

На правах рукописи



МОКРЯКОВА Мария Владимировна

**УЧАСТИЕ ПЕПТИДИЛ-ПРОЛИЛ ЦИС/ТРАНС ИЗОМЕРАЗ
ARABIDOPSIS THALIANA
ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА С ПАТОГЕНОМ**

(специальность 03.02.07 – генетика)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2013

Работа выполнена в лаборатории функциональной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва.

Научный руководитель: кандидат биологических наук
БРУСКИН Сергей Александрович,
зав. лаб. функциональной геномики
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Институт общей генетики
им. Н.И. Вавилова Российской академии наук,
г. Москва.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
ДЕЙНЕКО Елена Викторовна,
зав. лаб. биоинженерии растений Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии
наук, г. Новосибирск

доктор биологических наук, доцент
ОДИНЦОВА Татьяна Игоревна,
зав. лаб. молекулярно-генетических основ
иммунитета растений Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки Институт общей генетики им. Н.И.
Вавилова Российской академии наук, г. Москва.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего профессионального образования
Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А.
Тимирязева, г. Москва

Защита состоится «12» декабря 2013 г. в 13 часов на заседании
диссертационного совета Д.002.214.01 в Институте общей генетики им.
Н.И.Вавилова РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Губкина, 3. Тел. (499)135-
62-13, факс: (499)132-89-62, e-mail: aspirantura@vigg.ru, адрес в Интернете:
www.vigg.ru.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на
сайте Института.

Автореферат разослан «___» ноября 2013 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Синельщикова Т.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы диссертационной работы. Бактериальные болезни растений наносят огромный экономический ущерб, поражая ценные породы плодовых, эфиромасличных, технических и овощных культур. По данным FAO (продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН) ежегодные потери урожая от бактериальных заболеваний в сельском хозяйстве составляют примерно 30% от общих потерь урожая по всему миру, причем бактериозы могут поражать растения на огромных площадях.

Важную роль в предотвращении заражения растения патогенами играет врожденный иммунитет растения, который включает в себя три барьера. Первый из них – структурный: многие патогены не способны преодолеть внешние поверхности растения. Второй – основывается на транс-мембранных рецепторах, расположенных на поверхности клеток, которые распознают консервативные патоген-ассоциированные молекулы и индуцируют основной иммунный ответ растения. Третий барьер базируется на внутриклеточных R-белках (от англ. *resistance* – устойчивость) и направлен против патогенов, способных преодолеть второй барьер. Такой иммунитет получил название индуцируемого. Фитопатогенные бактерии способны подавлять как основной, так и индуцированный иммунитет за счет секреции факторов вирулентности внутрь растительной клетки. Механизм такого подавления начал изучаться сравнительно недавно и до сих пор точно не определен. Однако одним из главных инструментов патогенеза грамотрицательных бактерий являются белки-эффекторы, секретируемые при помощи транспортной системы третьего типа (ТЗСС) в клетки растения-хозяина. Белки-эффекторы важны для патогенности бактерий *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Ralstonia* и *Erwinia*, колонизирующих апопласт растений и способных вызывать гибель растительной клетки, таких как. Проникновение в клетку хозяина через ТЗСС сопряжено с полным или частичным разворачиванием белковой молекулы, что предполагает ее взаимодействие с шаперонами хозяина для восстановления структурной конформации и активации глобулы. В качестве таких шаперонов могут выступать пептидил-пролил цис/транс изомеразы клетки растения.

Пептидил-пролил цис/транс изомеразы (peptidyl-prolyl cis/trans isomerases, PPIase, иммунофилины) – большое семейство высококонсервативных белков, присутствующих у про- и эукариот, которые обеспечивают цис/транс изомеризацию полипептидной связи, предшествующей остатку пролина. Впервые они были обнаружены у млекопитающих, как рецепторы иммуносупрессирующего препарата циклоспорина А. В дальнейшем PPIase были идентифицированы у бактерий, грибов и высших растений. Осуществляя цис/транс-изомеризацию связи, они участвуют тем самым в различных клеточных процессах, в том числе, в фолдинге белков. Кроме того, было показано участие иммунофилинов в контроле термотолерантности, солевом и оксидативном стрессах. Несмотря на то, что в ряде работ отмечают участие отдельных PPIase млекопитающих,

бактерий и грибов в иммунных процессах, участие PPIase растений в защитных процессах остается слабо исследованным. Кроме того, ряд патогенов – вирусов и бактерий – используют PPIase хозяина для обеспечения конформационных изменений полипептидных молекул, секретируемых внутрь клетки хозяина. Основываясь на имеющихся данных, было предположено, что PPIase если не играют ключевую роль, то, по крайней мере, являются одними из важных элементов защитных процессов растения. В качестве объекта исследования нами были выбраны PPIase растения *Arabidopsis thaliana*, поскольку это модельное растение с полностью известной последовательностью генома. В геноме *A. thaliana* представлено 55 генов PPIase, для большинства из которых выполняемые функции остаются неизвестными.

Цель работы – изучение роли пептидил-пролил *цис/транс* изомераз растения *Arabidopsis thaliana* при взаимодействии с бактериями (*Xanthomonas* и *Pseudomonas*), в патогенезе которых участвуют белки-эффекторы, секретируемые транспортной системой третьего типа.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Отобрать пептидил-пролил *цис/транс* изомеразы, вовлеченные в защитный ответ *A. thaliana* при биотических стрессовых воздействиях, и оценить их роль в иммунном ответе на развития фитопатогенной бактериальной инфекции (*Xanthomonas* и *Pseudomonas*);
2. Проанализировать изменение уровня экспрессии отобранных генов пептидил-пролил *цис/транс* изомераз и установить активацию промоторных областей в норме и при заражении, а так же локализацию их белковых продуктов в клетке растения;
3. Определить механизм влияния изучаемых пептидил-пролил *цис/транс* изомераз на изменение устойчивости растений *A. thaliana* к инвазии патогена;
4. Выявить закономерности между составом генов, кодирующих белки-эффекторы, и физиологическими признаками бактериальных штаммов (расой, патовариантом и реакцией на них растений с известными генами резистентности) в естественной популяции бактерий рода *Xanthomonas*.

Научная новизна работы. Впервые были получены экспериментальные данные, указывающие на непосредственное вовлечение в ответ на инвазию патогена иммунофилинов *A. thaliana* *At2g16600*, *At4g33060* и *At5g48570*. В работе показано не только изменение их экспрессии при стрессовых воздействиях, но и непосредственная активация данных иммунофилинов в защитном ответе, продемонстрирована клеточная локализация трех исследованных PPIase. Кроме того, изучено влияние данных PPIase на изменение устойчивости растения к бактериальной инвазии. Впервые показано, что снижение чувствительности к фитопатогенам трансгенных растений с повышенной экспрессией исследованных PPIase связано с активацией в их тканях таких метаболических процессов, как накопление

активных форм кислорода и каллозы, а также с активацией каскадов салициловой кислоты.

Впервые определена корреляция между составом генов-эффекторов фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas* и возможной симптоматикой, распецифичностью бактерий, что не проводилось ранее. Был показан высокий уровень генетической изменчивости состава генов-эффекторов в пределах одного вида и его патовариантов, а также выявлена связь ряда генов-эффекторов с основными расами *X. campestris*. У ряда штаммов были обнаружены гены-эффекторы несвойственные типовым штаммам этого вида. Для двух штаммов *X. campestris* pv. *campestris* (В-94 и Егика-1) показано, что один из таких гомологичных генов (*XopAA*), присутствуя в геноме, полностью сохраняет свою последовательность, промоторную область и сигнальные домены, необходимые для секреции с помощью ТЗСС.

Декларация личного участия автора. Автор принимал личное участие на всех этапах выполнения работы, а именно: биоинформационном анализе данных, отборе гомозиготных линий инсерционных мутатов *A. thaliana*, подготовке векторных конструкций, получении трансгенных растений *A. thaliana*, проведении агробактериальной инфильтрации и заражения растений фитопатогенами, анализе растительного материала и распределения генов-эффекторов в популяции бактерий рода *Xanthomonas*.

Коллекцию штаммов *Xanthomonas*, принадлежащих к разным видам, расам и патовариантам, предоставила лаборатория бактериальных болезней ВНИИ фитопатологии РАСХН. Анализ видо- и расопринадлежности штаммов *Xanthomonas* и поиск корреляций между составом генов-эффекторов и физиологическими признаками бактерий проводился совместно с д.б.н. Игнатовым А.Н. (Центр «Биоинженерия» РАН, ВНИИ фитопатологии РАСХН). Автор лично проводила статистическую обработку полученных результатов и оформляла результаты в виде тезисов и докладов для научных конференций.

Апробация результатов работы. Результаты работы были представлены: на International Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics, dedicated to 120th anniversary of N.I. Vavilov (Киев, Украина, 2007); The 22nd Nordic PhD Course in Plant Pathology (Нуутиälä, Финляндия, 2008); 8th International Conference on Pseudomonas syringae and related pathogens (Оксфорд, Великобритания, 2010); 2-ой Международной школе-конференции молодых ученых "Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях" (Москва, Звенигород, Россия, 2011); XV International Congress IS-MPMI (Киото, Япония, 2012); на заседание профильного объединенного научного семинара по генетике растений Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН и на семинарах лаборатории функциональной геномики Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 141 страницах, содержит 39 рисунков, 12 таблиц и состоит из следующих

разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждений, выводов и списка литературы, включающего 171 цитируемых источника.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, из них статей в журналах, соответствующих Перечню ВАК – 2, тезисов докладов и материалов конференций – 16.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования:

Бактериальные штаммы: 53 штамма *Xanthomonas* из коллекции лаборатории бактериальных болезней ВНИИ фитопатологии РАСХН, принадлежащих к разным видам, расам и патовариантам. Штамм *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* DC3000. Кроме того, были использованы штамм XL1Blu *E. coli* (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺), *supE44*, *relA1*, *lac*, [F['], *proAB*⁺, *lac* I^qZΔM15, ::Tn10(Tet^r)] (“Stratagene”, США) и C58 *A. tumefaciens* (Rif^R, несет помощник Ti плазмиды pMP90RK, Km^R) (Koncz *et al.*, 1984).

Растения *Arabidopsis thaliana* экотип Col-0, а также инсерционные мутанты экотипа Col-0 по генам иммунофилинов *At5g48570* (SAIL_355_A02), *At2g16600* (SALK_063724) и *At4g33060* (SAIL_621_H11), полученные из коллекции ABRC, а так же растения *Nicotiana bentamiana*.

Анализ видо- и расопринадлежности исследованных штаммов *Xanthomonas* проводился с помощью MLSA анализа и по реакции растений-дифференциаторов.

Биоинформативный анализ генов-эффекторов *Xanthomonas* проводился с использованием программного алгоритма BLAST базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), и программных пакетов CLUSTALW v.1.75 (Thompson *et al.*, 1997), BioEdit v.7 (Hall, 1999) и Oligo v.6.01 («Premier Biosoft International», США).

Анализ инсерционных мутантов *A. thaliana* на гомозиготность проводился методом «TAIL»-ПЦР.

Трансформацию растений *A. thaliana* осуществляли на незрелых бутонах взрослых растений методом вакуумной инфильтрации (Logemann *et al.*, 2006).

В работе использованы стандартные **процедуры молекулярного клонирования**, которые проводились согласно методическому руководству Sambrook and Russell, 2001. Выделение геномной ДНК из *Xanthomonas* проводили по модифицированной методике SDS-СТАВ из растительного материала с использованием цетилтриметиламмоний бромида по методике Stewart and Via, 1993. РНК из растительного материала выделяли набором RNeasy Plant Kit фирмы Qiagen (Германия) в соответствии с инструкцией.

Бактериальная инфильтрация растений проводилась в случае *A. tumefaciens* по методике Lee and Yang, 2006. Заражение растения

фитопатогенами осуществляли по методике Swanson et al., 1988, с последующим подсчетом КОЕ на единицу площади листовой пластины.

Растительный материал анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии, по гистохимическому окрашиванию продуктов гена GUS, а также методом полуколичественного ПЦР в реальном времени.

Определение нуклеотидной последовательности гена ХорАА осуществляли методом инвертированного ПЦР и методом «прогулки по хромосоме».

Статистическую обработку данных осуществляли в программе «Statistica 6.0» (StatSoft, США) с помощью дискриминантного анализа и анализа по t-критерию Стьюдента. Данные в таблицах и на диаграммах представляют средние арифметические величины и стандартные ошибки, количество повторений указано для каждого случая отдельно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Определение роли пептидил-пролил *цис/транс*-изомераз *Arabidopsis thaliana* в защитной реакции на бактериальное заражение

Первоначальный отбор РРIase, вовлеченных в иммунный ответ *A. thaliana*, осуществлялся с помощью биоинформатического анализа изменения их экспрессии при биотических воздействиях. С помощью программных средств Genevestigator V3 (<https://www.genevestigator.ethz.ch>) и общедоступных баз данных были проанализированы все 55 предполагаемых генов иммунофилинов *A. thaliana* в 201 независимом эксперименте с использованием микрочипов. Эти эксперименты включали изменения в экспрессии генов как при биотических, так и при абиотических воздействиях. В результате было установлено, что 32 гена иммунофилинов *Arabidopsis* изменяли свою экспрессию в 2 и более раза (наиболее широко применимый порог изменения экспрессии в экспериментах по систематическому ответу). Таким образом, значительная доля иммунофилинов растения вовлечена в ответ на биотические и абиотические воздействия.

Для исследования функций РРIase растений, непосредственно связанных с защитой против растительных патогенов, наибольший интерес представляют гены, существенно увеличившие свою экспрессию в ответ на контакт с патогеном, что может свидетельствовать о запуске механизма защитного ответа растения, в котором иммунофилины являются компонентами защитной системы. В ходе биоинформативного анализа были отобраны три гена РРIase *A. thaliana*, экспрессия которых сильнее всего увеличивалась в ответ на взаимодействие с бактериями, в патогенезе которых участвуют белки-эффекторы ТЗСС:

- у гена *At5g48570* (пептидил-пролил-*цис/транс* изомеразы FKBP типа) в ответ на воздействие бактериями *P. syringae*, несущими гены *avrRpm1* и *avrRps4*, экспрессия увеличивается в 9,16 и 4,52 раза соответственно;

- у гена *At2g16600* (циклофилин ROC3) экспрессия увеличивается в 2,94 раза при воздействии *P. syringae*;
- у гена *At4g33060* (циклофилин) при взаимодействии с *P. syringae* (*avrRpm1*) экспрессия возрастает в 5,64 раза.

Для подтверждения данных, полученных при анализе *in silico*, было проведено измерение изменения экспрессии отобранных генов иммуофилинов при заражении растений *A. thaliana* фитопатогенными бактериями *Xanthomonas campestris pv. campestris* LMG8004 и *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000 с концентрацией 10^6 колониеобразующие единицы на миллилитр (кое/мл). Полученные результаты подтвердили активацию экспрессии исследованных генов в 2-5 раз по сравнению с контролем через 1-4 дня после инфильтрации фитопатогенами *X. campestris* и *P. syringae* (рисунок 1).

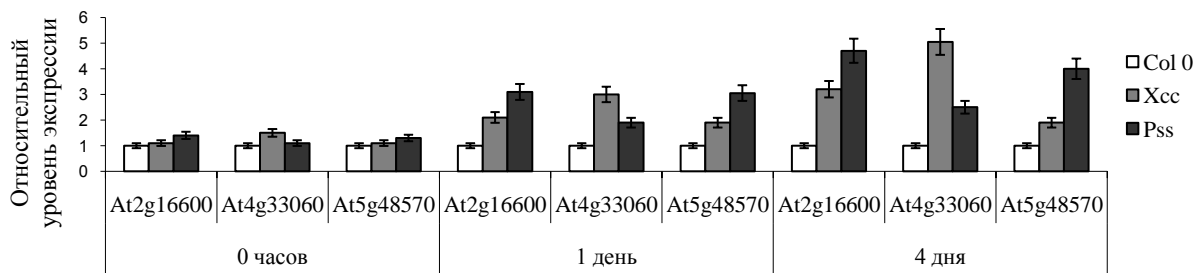


Рис. 1. Относительное изменение уровня экспрессии отобранных генов иммуофилинов при воздействии *X. campestris pv. campestris* LMG8004 (Xcc) и *P. syringae pv. tomato* DC3000 (Pss) через 3 часа, 1 день и 4 дня после заражения. Данные нормализованы на изменение экспрессии гена домашнего хозяйства *Act2*. Представлены значения уровня экспрессии относительно значений, полученных для контрольных растений (Col-0), подвергавшихся воздействию буферного раствора

Дальнейшее изучение возможного участия отобранных генов PPIase *At2g16600*, *At4g33060* и *At5g48570* в защитном ответе проводилось на гомозиготных линиях инсерционных мутантов. Была проведена их инокуляция бактериями *Xanthomonas campestris pv. campestris* LMG8004 (Xcc) и *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000 (Pss) с последующей оценкой скорости развития популяции патогена. Полученные результаты приведены на рисунке 2.

Отсутствие существенных различий в развитии инфекции между мутантными линиями и растениями дикого типа в течение первых суток после инокуляции объясняется постепенным увеличением массы бактериальных клеток за счет заселения апопласта и внедрением в клетку хозяина только при достижении определенной плотности популяции. Как видно из рисунка 2 растения, лишённые генов PPIase, более чувствительны к фитопатогенам *X. campestris* и *P. syringae*.

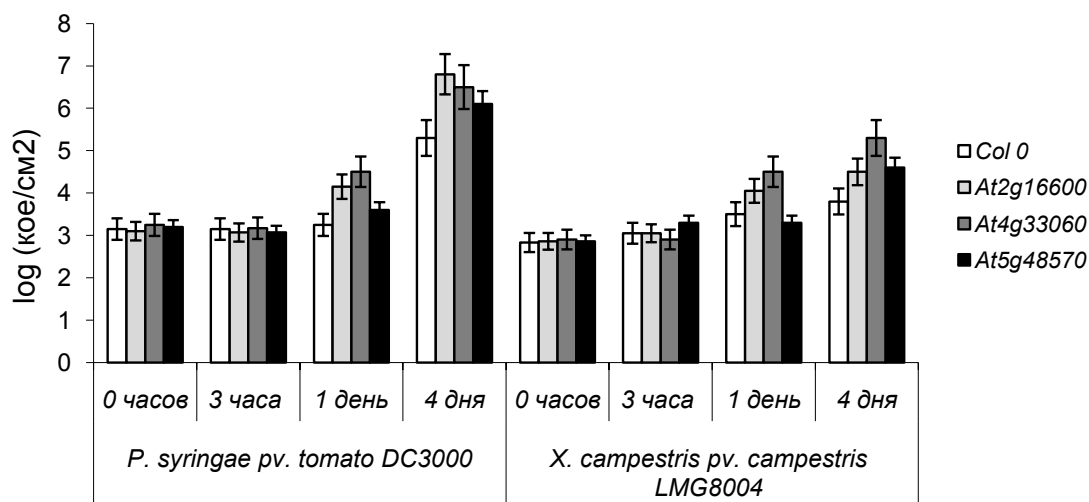


Рис. 2. Рост численности популяции бактериальных клеток *P. syringae pv. tomato DC3000* и *X. campestris pv. campestris LMG8004* в листьях гомозиготных линий инсерционных мутантов *Arabidopsis* по генам PPIase *At2g16600*, *At4g33060* и *At5g48570* по сравнению с контрольными растениями экотипа Col-0 через определенные временные интервалы после инокуляции. На диаграмме отражены средние значения и стандартные отклонения. Для статистической обработки использован критерий Стьюдента, $n=3$; $P<0,05$

Далее определялась степень влияния повышенной экспрессии отобранных генов PPIase на устойчивость к бактериальному заражению. Для этого была проведена инфильтрация фитопатогенов *X. campestris pv. campestris LMG8004* и *P. syringae pv. tomato DC3000* в листовые пластины *N. benthamiana* совместно с коэкспрессией отобранных генов PPIase под контролем сильного конститутивного промотора 35S CaMV (векторные конструкции представлены на рисунке 3 А).

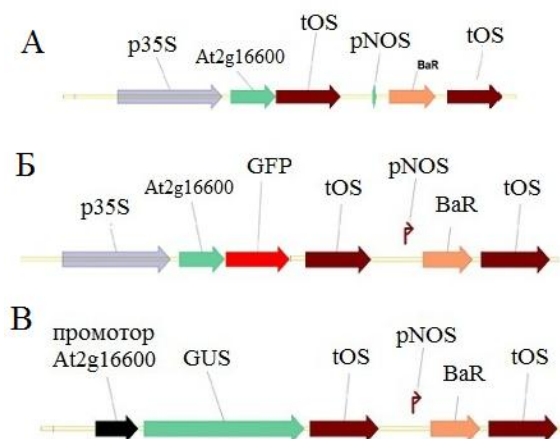


Рис. 3. Схема Т-ДНК трех типов векторных конструкций для трансформации растений на примере гена *At2g16600*: А – конструкция с сильной конститутивной экспрессией гена PPIase; Б – конструкция, в которой гены PPIase объединены в рамке считывания с геном, кодирующим зеленый флуоресцентный белок (GFP); В – конструкция с экспрессией гена β-глюкоронидазы (GUS) под контролем промотора PPIase. p35S – тетрамер промотора 35S вируса мозаики цветной капусты; tOS – терминатор октапинсинтазы *Agrobacterium*; pNOS – промотор нопалинсинтазы *Agrobacterium*; BaR – ген устойчивости к гербициду Баста

В ходе эксперимента отмечалось сниженное количество бактериальных клеток *X. campestris* при коинфильтрации с конструкциями, обеспечивающими повышенную экспрессию генов *At2g16600* и *At4g33060*, в то время как повышенная экспрессия гена *At5g48570* не оказала воздействия на развитие *X. campestris*. В то же время на развитие бактериальной инфекции, вызванной *P. syringae*, не оказывали воздействия коэкспрессия с геном *At4g33060*. Коинфильтрация с конструкциями, обеспечивающими повышенную экспрессию генов *At2g16600* и *At5g48570*, приводила к достоверному снижению численности популяции *P. syringae* по сравнению с развитием на контрольных растениях. Интересно также отметить, что через 3 дня после инфильтрации бактериальной суспензией на участках, не показывавших снижение концентрации клеток фитопатогенов в присутствии иммунофилинов, развивались значительные подверженные некрозу области, сопоставимые с симптомами, развивающимися на контрольных растениях (рисунке 4).

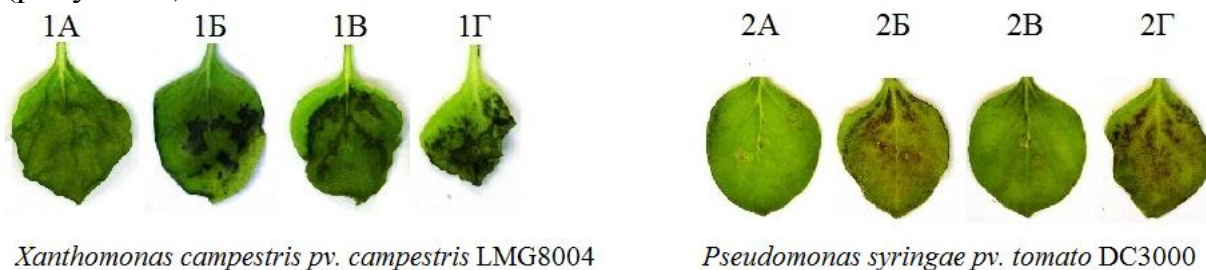


Рис. 4. Развитие симптомов на листьях *N. benthamiana* с повышенной экспрессией генов РРlase *At2g16600* (А), *At4g33060* (Б), *At5g48570* (В) при инфильтрации бактериальными клетками *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* LMG8004(1) и *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (2). В качестве контроля использовалась векторная конструкция без целевых генов (Г). Инфильтрация бактериальной суспензией с концентрацией клеток 10^3 - 10^4 коч/мл, 3-й день после инокуляции

Поскольку не было установлено снижения плотности популяции *P. syringae* и *X. campestris* при коэкспрессии с генами *At4g33060* и *At5g48570*, соответственно, можно предположить, что белковые продукты данных генов не вовлечены непосредственно в защитный ответ хозяина, а увеличение их экспрессии при биотическом стрессе связано с вторичными изменениями, происходящими в ответ на внедрение патогена.

Для доказательства непосредственного участия исследуемых РРlase в ответе на инвазию патогена была оценена экспрессия репортерного гена β -глюкоронидазы (GUS) под контролем эндогенных промоторов генов *At2g16600*, *At4g33060* и *At5g48570* (рисунок 5). Для этого проводили инфильтрацию фитопатогенов *X. campestris* pv. *campestris* LMG8004 и *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 в листовые пластины *N. benthamiana* с транзientной экспрессией векторных конструкций, в которых ген *GUS* находился под контролем эндогенных промоторов исследуемых генов (рисунок 3 В).

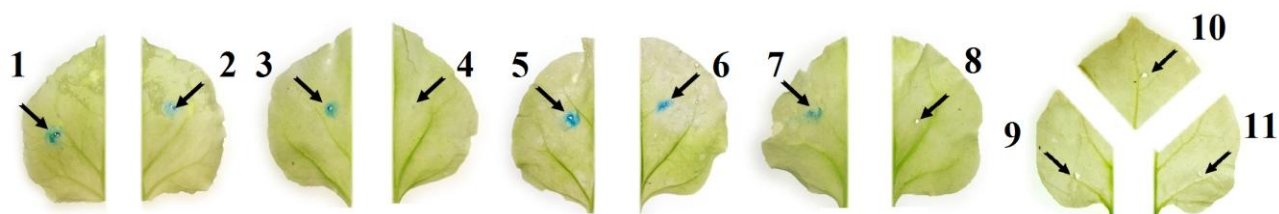


Рис. 5. Активация экспрессии гена *GUS* под контролем промоторных областей *At2g16600* (1 и 5), *At4g33060* (2 и 6) и *At5g48570* (3 и 7) в листовых пластинах растений *N. benthamiana*, с временной экспрессией соответствующих конструкций, после локальной инфильтрации *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* LMG8004 (1, 2, 3) и *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (5, 6, 7). Контрольные точки: 4 и 8 инфильтрации *X. campestris* (4) и *P. syringae* (8) в лист *N. benthamiana* без предварительной инфильтрации клетками *A. tumefaciens*; 9,10,11 – инфильтрация культурой клеток *A. tumefaciens*, несущих ген *GUS* под контролем промоторов *At2g16600* (9), *At4g33060* (10) и *At5g48570* (11) без последующего заражения фитопатогеном

В ходе эксперимента было определено, что при заражении как *X. campestris*, так и *P. syringae* в течение первых 24 часов после инвазии происходит активация промоторных областей генов *At2g16600*, *At4g33060* и *At5g48570*. Таким образом, в ответ на бактериальную инвазию происходит активация всех трех исследованных генов, что подтверждает их непосредственное вовлечение в защитный ответ растения хозяина.

Для определения локализации в клетке растения белковых продуктов трех отобранных генов РР1ase (*At2g16600*, *At4g33060* и *At5g48570*) проводилась инфильтрация листьев *N. benthamiana* векторными конструкциями, в которых ген иммунофилина был объединен в рамке считывания с геном, кодирующим зеленый флуоресцентный белок (GFP) так, что последний находился на С-терминальном конце химерного полипептида (рисунок 3 Б). Полученные данные представлены на рисунке 6.

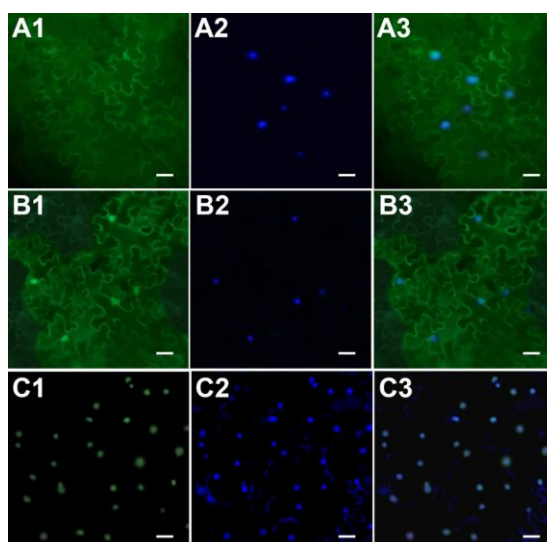


Рис. 6. Локализация *At2g16600*(А), *At4g33060*(В) и *At5g48570*(С), объединенных в рамке считывания с зеленым флуоресцентным белком (GFP), в клетках *N. benthamiana*. 1-свечение GFP;2-свечение клеточных ядер, окраска DAPI;3-наложение 1 и 2

В ходе проведенного анализа было установлено, что белковый продукт гена *At2g16600* локализован в цитоплазме, что согласуется с ожидаемой локализацией этого белка, предположенной на основе его доменной организации, а именно на наличии в его структуре только региона характерного для циклофилинов (He *et al.*, 2004) (рисунок 6 А1-3). Данные, полученные нами при определении клеточной локализации белковых продуктов гена *At4g33060*, также согласуются с его доменной организацией. Этот белок, помимо домена, характерного для циклофилинов, также содержит богатый аминокислотными остатками Arg\Lys регион, включающий два сайта ядерной локализации. Как видно на рисунке 6 (Б1-3), химерный белок был локализован как в цитоплазме, так и в ядре клеток. Что касается белкового продукта гена *At5g48570*, то, поскольку в его структуре присутствуют 3 FKBP домена, 3 тетратрикопептидных домена, кальмодулиновый мотив, ранее предполагалось, что данный пептид локализуется в клеточной цитоплазме и мембране (He *et al.*, 2004). В ходе нашего эксперимента было обнаружено, что белковый продукт гена *At5g48570* локализован преимущественно в ядре клеток (рисунок 6 В1-3). Известна только одна работа, в которой отмечалось присутствие белка *At5g48570* в клеточных ядрах *A. thaliana*, однако это наблюдалось при тепловом шоке (Meiri *et al.*, 2010). Поскольку данный пептид лишен сигналов ядерной локализации, то возможно предположить, что его перемещение в ядро, связано с образованием белковых комплексов за счет тетратрикопептидных и кальмодулиновых мотивов. Возможно, что такие комплексы образуются при стрессовых воздействиях и направлены на изменение экспрессии генов, вовлеченных в защитную реакцию клетки хозяина.

Для объяснения механизма влияния отобранных PPIase на защитные функции растения и поиск возможных взаимодействий, вызывающих повышение устойчивости растений к фитопатогенам, были получены трансгенные растения *A. thaliana* с повышенной экспрессией отобранных генов. Все полученные линии обладали повышенной экспрессией, соответствующих генов PPIase и фенотипически не отличались от дикого типа *A. thaliana* Col-0. Для оценки устойчивости полученных трансгенных растений к инвазии фитопатогена было проведено их заражение бактериями *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Уже через три дня после инокуляции отмечалось достоверное снижение численности бактериальной популяции по сравнению с контрольными растениями во всех трансгенных линиях. Поскольку снижение численности бактериальной популяции в растении может наблюдаться как в результате специфической защитной реакции на инвазию патогена, так и за счет неспецифического усиления иммунитета нами был проведен анализ накопления каллозы и пероксида водорода в трансгенных растениях с повышенной экспрессией отобранных генов PPIase. Полученные данные приведены на рисунке 7.

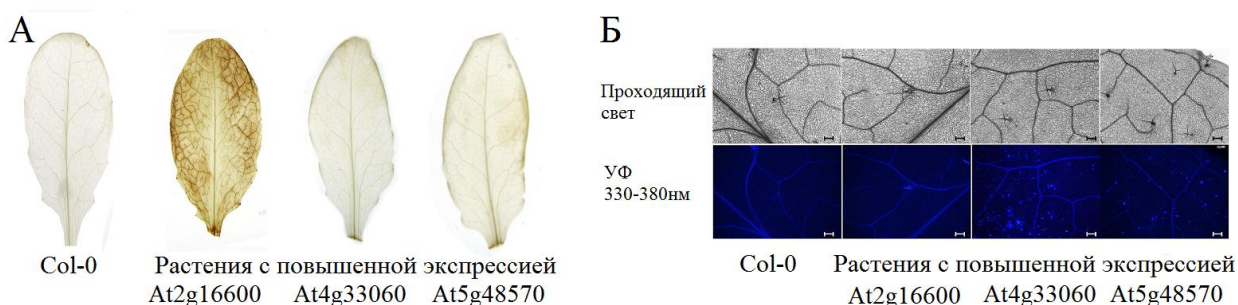


Рис. 7. Накопление H₂O₂ (А) и каллозы (Б) в растениях *A. thaliana* дикого типа Col-0 и трансгенных растениях с повышенной экспрессией генов *At2g16600*, *At4g33060* и *At5g48570*

Было обнаружено, что в трансгенных растениях с повышенной экспрессией гена *At2g16600* не происходило накопления каллозы, но наблюдалась значительная аккумуляция в тканях H₂O₂. В растениях же с повышенной экспрессией генов *At4g33060* и *At5g48570* наблюдалось повышенное накопление каллозы по сравнению с контролем. Накопление вторичных метаболитов, а именно каллозы, связывают с поздним защитным ответом растения. В связи с этим было определено, происходит ли в полученных трансгенных растениях активация основных компонентов известных сигнальных каскадов MAP киназ, а именно: MEKK1 (MAPK/ERK kinase kinase A1); PAD4 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 4); EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1); PR1 (PATHOGEN RELATED 1); WRKY33 (WRKY DNA-BINDING PROTEIN 33) и bG2 (β -GLUCANASE 2). Полученные результаты приведены на рисунке 8.

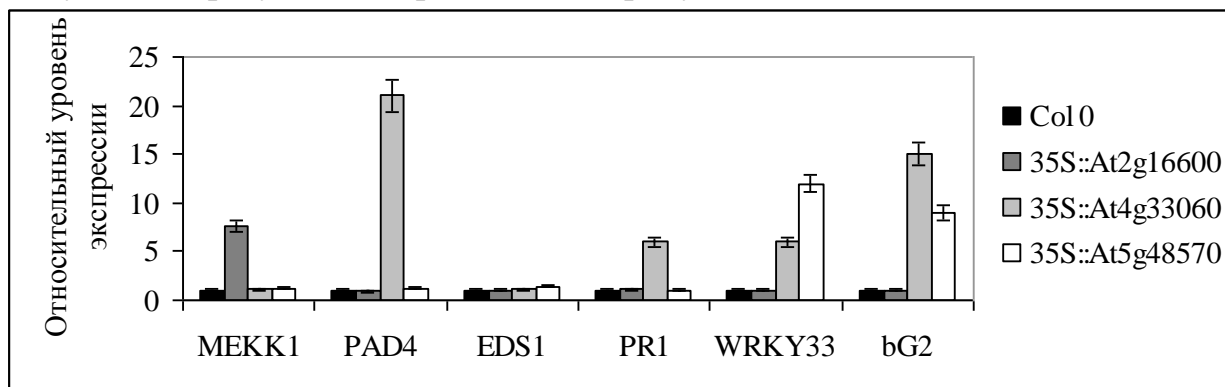


Рис. 8. Относительный уровень экспрессии генов MEKK1, PAD4, EDS1, PR1, WRKY33 и bG2, в трансгенных растениях *A. thaliana* с повышенной экспрессией генов PPIase (*At2g16600*, *At4g33060* и *At5g48570*). Определение проводили методом qPCR, данные нормализованы на изменение экспрессии гена домашнего хозяйства *Act2*. Представлены значения уровня экспрессии относительно значений, полученных для контрольных растений (*A. thaliana*)

Как оказалось, в трансгенных растениях с конститутивной повышенной экспрессией гена *At2g16600* происходит увеличение уровня экспрессии *MEKK1* в 7,6 раз, в то время как экспрессия других исследованных генов оставалась сопоставимой с данными для дикого типа. Известно, что киназа MEKK1 играет ключевую роль в каскаде MAP киназ и непосредственно вовлечена в регуляцию раннего защитного механизма растения, в основе

которого лежит развитие окислительного взрыва (Nakagami *et al.*, 2006). Таким образом, полученные данные подтвердили наше предположение о непосредственном участии *At2g16600* в процессах накопления в клетках активных форм кислорода.

В трансгенных растениях в повышенной конститутивной экспрессией гена *At4g33060* отмечалось увеличение уровня экспрессии генов *PAD4*, *PR1*, *WRKY33* и *bG2* соответственно в 21, 6, 6 и 15 раз по сравнению с растениями дикого типа. Наблюдаемые изменения интересны тем, что комплекс EDS1+PAD4 вовлечен в защитный каскад, приводящий к накоплению салициловой кислоты (Zhu *et al.*, 2011). В то же время PR1 считают маркером активации защитного каскада салициловой кислоты (Ahmad *et al.*, 2011). Поскольку повышенная экспрессия *At4g33060* не влияла на EDS1, было предположено, что действие этой PPIase направленно на PAD4. Активация же *WRKY* и *bG2* может быть объяснена изменениями, характерными для защитного ответа, происходящими в ответ на салициловую кислоту (Zhang and Liu, 2001).

В трансгенных растениях с повышенной экспрессией гена *At5g48570* было установлено увеличение уровня экспрессии *WRKY33* и *bG2*, что, как и в случае с *At4g33060*, согласуется с полученными данными о накоплении каллозы в листьях. Поскольку при определении внутриклеточной локализации белкового продукта *At5g48570* была определена его преимущественно ядерная локализация, то возможно предположить, что данный белок за счет образования белкового комплекса перемещается в ядро, где оказывает воздействие на факторы транскрипции, отвечающие за процесс накопления каллозы.

Полученные результаты и предположения о возможном участии исследованных PPIase в защитных процессах представлены схематически на рисунке 9.

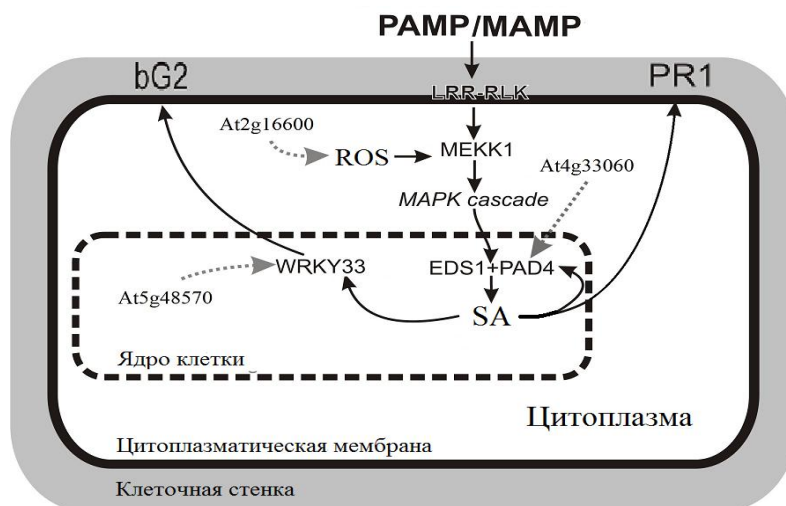


Рис. 9. Возможная схема участия PPIase *At2g16600*, *At4g33060* и *At5g48570* в иммунных процессах растения. ROS – активные формы кислорода; SA – салициловая кислота

Таким образом, нами впервые были получены экспериментальные данные, указывающие на непосредственное вовлечение в ответ на инвазию патогена иммунофилинов *Arabidopsis thaliana* *At2g16600*, *At4g33060* и *At5g48570*. Показано не только изменение их экспрессии при стрессовых воздействиях, но и непосредственная активация данных иммунофилинов в защитном ответе. Кроме того, нами отмечено влияние данных пептидил-пролил *цис/транс* изомераз на изменение устойчивости растения к бактериальной инвазии. В ходе проведенного исследования впервые были получены экспериментальные, а не теоретически предположенные, данные о клеточной локализации трех исследованных иммунофилинов: белковый продукт гена *At2g16600* локализуется в цитоплазме, гена *At5g48570* – преимущественно в ядре, гена *At4g33060* – в как в цитоплазме, так и в ядре.

Было установлено, что снижение чувствительности к фитопатогенам трансгенных растений с повышенной экспрессией исследованных PPIase объясняется активацией в их тканях таких метаболических процессов, как накопление активных форм кислорода и каллозы, а так же активации каскадов салициловой кислоты. Было показано, что *At2g16600* вызывает активацию сигнального пути, приводящего к накоплению активных форм кислорода в отсутствие патогена, в то время как *At4g33060* и *At5g48570* обеспечивали накопление каллозы в ходе активации процессов зависимых и независимых от салициловой кислоты соответственно.

2. Изучение генов-эффекторов в естественной популяции *Xanthomonas*

Изучение генетического разнообразия генов-эффекторов в популяции *Xanthomonas*

С целью изучения генетического разнообразия генов-эффекторов была выбрана популяция *Xanthomonas*, включающая в себя 34 штамма *X. campestris* pv. *campestris* (группа «кампестрис»), и 18 штаммов (группа «другие виды»), относящихся как к другим патовариантам вида *X. campestris*, так и к ряду основных видов *Xanthomonas*, представленных в России. Такой подбор был не случаен. Известно, что до 40% генов в геномах ксантомнад, вероятно, горизонтально привнесены в этот род из других таксонов (Qian *et al.*, 2005), кроме того, у бактерий распространен обмен генами вирулентности среди штаммов одного рода.

На момент проведения данной работы были известны полные нуклеотидные последовательности восьми геномов *Xanthomonas* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>). Для оценки генетического разнообразия был проведен поиск гомологов всех известных генов-эффекторов и отобраны только те гены, которые имели гомологов (схожесть аминокислотной последовательности более 80%) более, чем в двух различных геномах. Таким образом, были отобраны 19 генов-эффекторов – *avrBs3*, *avrXacE1*, *avrXacE2*, *avrXccA2*, *avrXccC*, *avrBs1*, *avrBs1.1*, *avrXccE1*, *avrXccB*, *AvrRxv*, *AvrRxo1*, *HopPtoH*, *xopAA*, *xopB*, *xopC*, *xopD*, *xopJ*, *xopF2*, и *xopO*.

В ходе исследования, проведенного совместно с д.б.н. Игнатовым А.Н. (Центр «Биоинженерия» РАН, ВНИИ фитопатологии РАСХН), была обнаружена различная частота встречаемости изучаемых генов-эффекторов как во всей исследованной популяции, так и внутри групп «кампестрис» и «другие виды». Как видно из рисунка 10, исследуемые гены-эффекторы можно разделить на три группы по частоте встречаемости у представителей патоварианта *X. campestris* pv. *campestris* (группа «кампестрис»):

1. гены, присутствующие с высокой частотой (более 40%) у всех проанализированных штаммов популяции как в группе «кампестрис», так и в группе «другие виды» (*xopD*, *avrXccE1*, *HopPtoH*);
2. гены, присутствующие во всех штаммах, относящихся к группе «кампестрис», с частотой более 50% и практически не встречающиеся (частота менее 10%) у других видов (*avrXccC*, *avrBs1*, *avrBs1.1*, *avrXccB*, *avrXccA2*);
3. гены, ранее не аннотированные в геноме *X. campestris* pv. *campestris*, присутствующие только у ряда штаммов и, возможно, связанные с проявлением специфической вирулентности или характером симптомов. Вероятно, эти гены были горизонтально привнесены в геномы исследуемых штаммов (*avrBs3*, *avrXacE1*, *avrXacE2*, *xopC*, *XopF2*, *xopAA*).

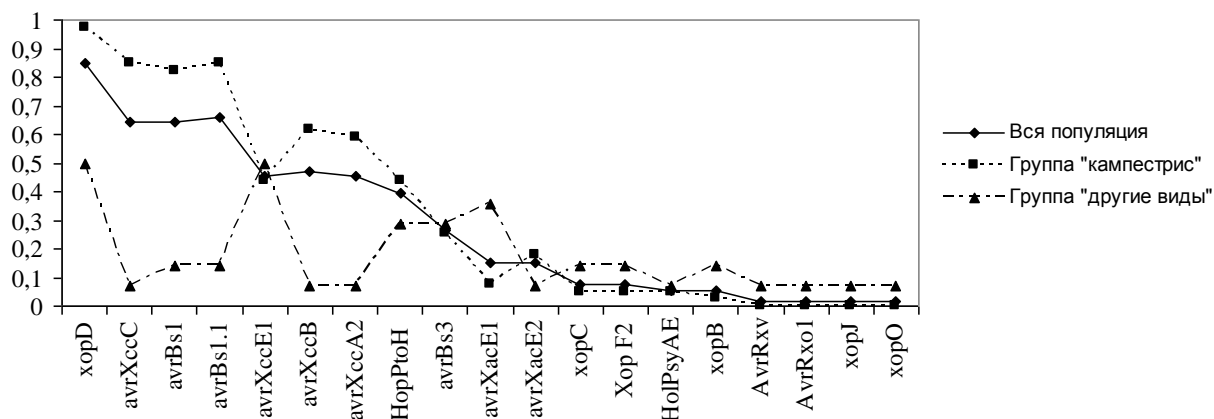


Рис. 10. Частоты встречаемости консервативных фрагментов специфичных для исследуемых генов-эффекторов в анализируемой популяции ксантомонад: во всей популяции, только в группе «кампестрис», только в группе «другие виды»

Кроме того, необходимо отметить ряд закономерностей для отдельных генов-эффекторов. Так, у 85% штаммов исследуемой популяции присутствовал ген *xopD*, причем его высокая частота встречаемости отмечалась как среди *X. campestris* pv. *campestris* (более чем у 90% штаммов), так и у других видов (50% штаммов) ксантомонад. Это может свидетельствовать о возможной существенной значимости белка XopD для патогенеза *Xanthomonas*. Важно отметить наличие и другого гена-эффектора с известными функциями – *avrBs3*, - который был представлен у 30% штаммов популяции. Ранее никем не отмечалось присутствие представителей семейства AvrBs3 у *X. campestris* pv. *campestris*, хотя у другого патоварианта

X. campestris pv. *armoraciae* они и присутствовали (Kay *et al.*, 2005). Известно, что белки этого семейства имитируют эукариотические факторы транскрипции хозяина (Lahaye and Bonas, 2001). Зачастую такое проявление способствует предотвращению развития некрозов и избыточному разрастанию тканей. А для штамма *X. campestris* pv. *campestris* было предположено наличие связи присутствия белков семейства *avrBs3* с проявлением симптомов листовой пятнистости.

В работе отмечено, что, практически, у всех штаммов *X. campestris* pv. *campestris* присутствовали гены *avrBs1.1*, *avrBs1* и *avrXccC*. При этом ген *avrXccC* в исследованной популяции встречался только у штаммов *X. campestris* pv. *campestris*, и поэтому может служить маркером для рас 1-5 этого патоварианта.

Кроме того, нами было обнаружено присутствие у ряда штаммов *X. campestris* pv. *campestris* консервативных фрагментов генов-эффекторов, ранее не ассоциированных с этим видом. Так, консервативные фрагменты генов *avrXacE1* и *avrXacE2* присутствовали у ряда штаммов *X. campestris* pv. *campestris*, хотя ранее были аннотированы только у *X. campestris* pv. *vesicatoria* str. 85-10 и карантинного объекта *X. citri* str. 306. В ходе проведенного исследования было определено присутствие у *X. campestris* pv. *campestris* консервативных фрагментов некоторых представителей группы генов, ранее ассоциированных с группой видов «*X. axonopodis*» (*X. citri*, *X. phaseoli*, *X. euvesicatoria*). Нами были найдены штаммы *X. campestris* pv. *campestris*, у которых присутствовали консервативные фрагменты *XopC*, *XopF2*, *XopB*, *XopAA* (*HolPsyAE*). Так как указанные гены отсутствуют в полностью секвенированных геномах *X. campestris* pv. *campestris*, было предположено, что их наличие в некоторых изученных штаммах, вероятнее всего, связано с горизонтальным переносом из других видов бактерий.

В ходе исследования был проведен статистический анализ корреляции распределения генов-эффекторов, представленных у исследованных штаммов, с известной ранее реакцией на эти штаммы растений-дифференциаторов рода *Brassica*, несущих три основных гена устойчивости *Rxcc1*, *Rxcc3*, *Rxcc4*. Нам не удалось обнаружить строгого соответствия между реакцией растений-дифференциаторов и составом генов-эффекторов у отдельных штаммов, что может быть связано с необходимостью учитывать различия в аллельном составе и уровень экспрессии генов, которые невозможно обнаружить с помощью обычного ПЦР анализа. Однако были найдены статистически достоверные закономерности между присутствием ряда генов-эффекторов у проанализированных штаммов и их реакцией с растениями-дифференциаторами. Было обнаружено достоверное соответствие между авирулентностью к гену *Rxcc1* и наличием генов *avrXccC*, *avrXacE1* и отсутствием гена *XopB* (дискриминантный анализ), а также наличием генов *avrXccC* и *HopPtoH* (анализ по t-критерию). Также было показано достоверное соответствие между вирулентностью к гену *Rxcc3* и наличием гена *avrXccC* и отсутствием генов *avrXccE1*, *avrXacE1* и

XopB (анализ по t-критерию), *avrXccE1* и *XopB* (дискриминантный анализ). Авирулентность к гену *Rxsc4* достоверно коррелировала с наличием генов *avrBs1.1*, *avrXccB*, *avrXccA2* (анализ по t-критерию) и с генами *avrXccA2*, *avrXacE2*, *xopC* (дискриминантный анализ).

Таким образом, на данном этапе работы нами был проведен поиск генов-эффекторов, обнаруженных при помощи анализа полных геномов бактерий рода *Xanthomonas*, в коллекции штаммов *X. campestris* pv. *campestris* и некоторых родственных ксантомонад, и был показан высокий уровень генетической изменчивости состава генов-эффекторов в пределах одного вида и его патовариантов. У ряда штаммов *X. campestris* pv. *campestris* были обнаружены гены-эффекторы, не свойственные типовым штаммам этого вида, и высказано предположение о связи ряда генов с симптомами вызываемых поражений на растении-хозяине, а также показана связь числа генов-эффекторов с основными расами патогена. Ряд генов, присутствующих у *X. campestris* pv. *campestris*, возможно, связаны с горизонтальным переносом из бактерий других видов и даже родов. Полученные результаты были использованы нами для дальнейшего изучения роли отдельных бактериальных генов во взаимоотношении патогена с растением-хозяином.

Горизонтальный перенос гена-эффектора ТЗСС хорАА в геном Xanthomonas campestris.

В ходе анализа разнообразия генов-эффекторов в естественной популяции *Xanthomonas campestris* было обнаружено у некоторых штаммов патоварианта *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* присутствие консервативных фрагментов генов-эффекторов (*avrBs3*, *avrXacE1*, *avrXacE2*, *xopC*, *XopF2*, *xopAA*), ранее у него не аннотированных. Анализируя эти данные, было предположено возможный горизонтальный перенос указанных генов.

Для подтверждения гипотезы о возможном горизонтальном переносе *xopAA* был проведен анализ, направленный на определение полной нуклеотидной последовательности данного гена у двух штаммов *X. campestris* pv. *campestris* (В-94, Ерука-1) с использованием адаптеров и специфичных праймеров на консервативный регион, выявленный при оценке разнообразия генов-эффекторов.

В ходе проведенного анализа были определены как последовательности, гомологичные ранее аннотированным последовательностям *xopAA*, так и пограничные участки. Стоит отметить, что фрагменты, граничащие непосредственно с геном, обладали высокой степенью гомологии с соответствующими участками у *X. oryzae* (около 300 п.о., предшествующих гену, и порядка 50 п.о. после гена). Это имеет важное значение, поскольку предполагает сохранение промоторной и терминаторной областей. Области же, расположенные на большем расстоянии от гена, были гомологичны транспозазам как *X. oryzae*, так и *X. campestris*. Было определено, что исследуемый ген у штаммов *X. campestris* pv. *campestris* (В-94 и Ерука-1) был на 98% гомологичен генам из *X. oryzae* pv. *oryzae*. В полученных

последовательностях отсутствовали инсерции или делеции как отдельных нуклеотидов, так и значительных участков, которые могли бы вызывать сдвиги рамки считывания, то есть предполагаемая аминокислотная последовательность, обнаруженных гомологов, сохранена полностью. Кроме того, анализ предположительных аминокислотных последовательностей гомологов *XopAA* у штаммов В-94 и Eruka-1 показал, что в них сохранены домены, необходимые для транспорта через ТЗСС.

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей гомологов *xopAA* показал, что они образуют довольно тесную группу менее чем с 20 аминокислотными заменами на 100 а.о., что может указывать на высокую консервативность функций, выполняемых гомологами белка-эффектора ХорАА (рисунок 11).

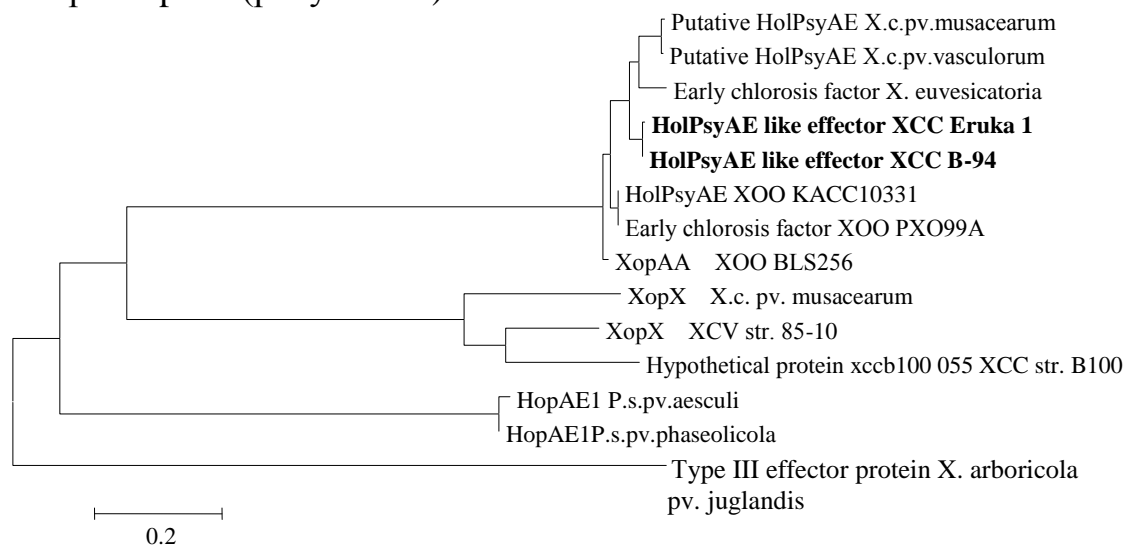


Рис. 11. Филогенетическая дендрограмма на основе данных сравнительного анализа аминокислотных последовательностей гомологов *xopAA*, построенная с использованием алгоритма "метод объединения соседей" (Neighbor-joining method). Масштаб соответствует 20 заменам на 100 аминокислот (эволюционное расстояние)

Таким образом, было показано, что в геноме двух штаммов *X. campestris pv. campestris* (В-94 и Eruka-1) присутствуют последовательности с высокой степенью гомологии к гену *XopAA*, которые сохраняют свою промоторную область, аминокислотную последовательность и сигнальные домены, необходимые для секреции с помощью ТЗСС. Эти данные в совокупности с данными о присутствии мобильных элементов в пограничных с данными гомологами областях подтверждают нашу гипотезу о горизонтальном переносе последовательностей, гомологичных *XopAA* в геном двух штаммов *X. campestris pv. campestris* (В-94 и Eruka-1).

Заключение

Проведенное исследование позволило выявить гены пептидил-пролил *цис/транс* изомераз *Arabidopsis thaliana*, участвующие в защитном ответе на биотические стрессовые воздействия, вызванные бактериями, в патогенезе которых существенная роль отводится белкам-эффекторам, секретируемым через третью транспортную систему секреции. Впервые было проведено исследование роли генов PPIase *A. thaliana* *At2g16600*, *At4g33060* и *At5g48570* и показано не только изменение их экспрессии при стрессовых воздействиях, но и непосредственное участие данных иммунофилинов в защитном ответе. Кроме того, нами отмечено влияние изменения экспрессии изученных генов на устойчивость растения к бактериальному заражению фитопатогенными бактериями *X. campestris* и *P. syringae*, а именно: растения, лишенные исследованных генов PPIase сильнее подвергались бактериальному заражению, в то время как повышенная экспрессия данных генов вызывала достоверное снижение численности бактериальной популяции. В ходе проведенного исследования впервые были получены экспериментальные, а не теоретические данные о внутриклеточной локализации трех исследованных иммунофилинов. Они были локализованы в различных компартментах – один белок (продукт гена *At5g48570*) локализовался в ядре клеток, другой (белковый продукт гена *At2g16600*) - в цитоплазме, а третий (белковый продукт гена *At4g33060*) - как в ядре, так и в цитоплазме. Данные, полученные при изучении функций растительных PPIase, позволили установить роль данных ферментов в развитии защитных реакций растения в ответ на бактериальные заражения. Было установлено, что снижение чувствительности к фитопатогенам трансгенных растений с повышенной экспрессией исследованных PPIase объясняется активацией в их тканях таких метаболических процессов, как накопление активных форм кислорода (*At2g16600*) и каллозы (*At5g48570*), а также активации каскадов салициловой кислоты (*At4g33060*). Изучение механизмов иммунной системы растений, а также молекул патогенов, на которые она отвечает, позволяет понять принципы распознавания патогенов и процессы, происходящие при патогенезе. Таким образом, полученные знания могут быть использованы в получении сельскохозяйственных растений с повышенной устойчивостью к бактериальным инфекциям.

Проведенный анализ естественной популяции бактерий *X. campestris* показал высокую генетическую изменчивость состава генов-эффекторов в пределах одного вида и его патовариантов. Были выявлены достоверные соответствия между реакцией растений-дифференциаторов с локусами устойчивости (*Rxcc1*, *Rxcc3*, *Rxcc4*) и присутствием отдельных генов-эффекторов у штаммов *Xanthomonas campestris*. Впервые у ряда штаммов *X. campestris* pv. *campestris* были обнаружены гены-эффекторы, несвойственные типовым штаммам этого вида, и сделано предположение о связи данного явления с горизонтальным переносом из бактерий других видов и даже родов. Анализ выявленных последовательностей, обладающих высокой

степенью гомологии к гену *ХорАА* из *X.oryzae pv. oryzae*, показал не только полное подобие нуклеотидной последовательности с сохранением промоторной и терминаторной областей, аминокислотной последовательности и сигнальных доменов, необходимых для секреции с помощью ТЗСС, но и соседство обнаруженных последовательностей с мобильными элементами. Полученные данные подтверждают гипотезу о вероятном горизонтальном переносе гена-эффектора *ХорАА*.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены гены пептидил-пролил *цис/транс* изомераз *Arabidopsis thaliana* (*At2g16600*, *At4g33060* и *At5g48570*), вовлеченные в защитный ответ клетки на биотические стрессовые воздействия. Установлено, что *At2g16600* вызывает активацию сигнального пути, приводящего к накоплению активных форм кислорода, в то время как *At4g33060* и *At5g48570* обеспечивали накопление каллозы в ходе активации процессов зависимых и независимых от салициловой кислоты соответственно.
2. Установлено, что растения, лишённые генов пептидил-пролил *цис/транс* изомераз *At2g16600*, *At4g33060* и *At5g48570*, проявляют повышенную чувствительность к инвазии фитопатогенов *X. campestris* и *P. syringae*. При этом повышенная экспрессия данных генов вызывала достоверное снижение роста численности популяции *P. syringae* по сравнению с контролем. Снижение же темпов роста численности популяции *X. campestris* вызывала повышенная экспрессия генов *At2g16600* и *At4g33060*.
3. Впервые показана активация промоторных областей исследованных генов *At2g16600*, *At4g33060* и *At5g48570* в ответ на заражение растения фитопатогенными бактериями *X. campestris* и *P. syringae*.
4. Определена клеточная локализация белковых продуктов исследованных генов PPIase: белок *At2g16600* локализуется в цитоплазме, *At5g48570* – преимущественно в ядре, а *At4g33060* – как в цитоплазме, так и в ядре.
5. Показан высокий уровень генетической изменчивости состава генов-эффекторов в пределах вида и патоварианта *X. campestris pv. campestris*, а также достоверные соответствия между реакцией растений-дифференциаторов с локусами устойчивости (*Rxcc1*, *Rxcc3*, *Rxcc4*) и присутствием отдельных генов-эффекторов у штаммов *X. campestris*.
6. Выявлены гены-эффекторы (*avrXacE1*, *avrXacE2*, *ХорС*, *ХорF2*, *ХорВ* и *ХорАА*), ранее не аннотированные у типовых штаммов *X. campestris pv. campestris*. Показан возможный горизонтальный перенос гена *ХорАА* в геномы двух штаммов *X. campestris pv. campestris* (В-94, Eruka 1).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах, соответствующих Перечню ВАК

1. Абдеева, И.А. Экспериментальные модели трансгенных растений, перспективных для новейших биотехнологий. [Текст] / И.А. Абдеева, И.В.Голденкова-Павлова, М.В. Мокрякова, Л.В. Волкова, В.Г.Богуш, К.В.Сидорук, Н.О. Юрьева, В. Г.Дебабов, Э.С.Пирузян. // **Цитология и генетика**. - 2007. - № 3. - С. 55-61.
2. Мокрякова, М. В. Разнообразие генов-эффекторов у бактерий рода *Xanthomonas* [Текст] / М. В. Мокрякова, И. А. Абдеева, Э. С. Пирузян, Н. В. Шаад, А. Н. Игнатов // **Микробиология**. – 2010. - том 79. - № 1. - С. 63–71

Тезисов докладов и материалов конференций

1. Мокрякова, М.В. Состав генов эффекторов III транспортной системы в популяции фитопатогенных бактерий *Xanthomonas campestris* (Pam.) Dow. [Текст] / Мокрякова, М.В., Кромина, К.А., Абдеева, И.А., Пирузян, Э.С., Игнатов, А.Н. // 11-ая Международная пушинская школа – конференция молодых ученых «Биология-наука XXI века», 28 октября – 2 ноября 2007, Пушино, с. 101.
2. Kromina, K.A. The repertoire of PPI-ases in genomes of plant pathogenic bacteria. [Текст] / Kromina, K.A., Ignatov, A.N., Abdeeva, I.A., Mokryakova, M.V., Volkova, L.V., Piruzian, E.S. // International Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics, dedicated to 120th anniversary of N.I. Vavilov, 20 – 22 September 2007, Kyiv, Ukraine, p. 24.
3. Mokryakova, M.V. Diversity of III transport system effectors in population of plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* (Pam.) Dow. [Текст] / Mokryakova, M.V., Kromina, K.A., Abdeeva, I.A., Piruzian, E.S., Ignatov, A.N. // The 6th Plant Genomics European Meeting, 3 – 6 October 2007, Tenerife, Canary Islands, Spain, p. 176.
4. Мокрякова, М.В. Локусное и аллельное разнообразие генов белков-эффекторов среди бактерий рода *Xanthomonas*. [Текст] / Мокрякова, М.В., Абдеева, И.А., Пирузян, Э.С., Игнатов, А.Н. // Международная научная школа-конференция молодых ученых "Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях», Звенигород, 7 – 12 декабря, 2008, с. 50.
5. Mokryakova, M.V. Characterisation of effector repertoire in population of pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* (Pam.) Dow. [Текст] / Mokryakova, M.V., Kromina, K.A., Abdeeva, I.A., Piruzian, E.S., Ignatov, A.N. // The 22nd Nordic PhD Course in Plant Pathology, 4 – 11 May 2008, Huuhtälä, Finland, p.43.
6. Abdeeva, I. The Development of Vector Systems for Expression of Defensin Gene from *Helianthus annuus* in Plants. [Текст] / Abdeeva, I., Mokryakova, M., Mirakhorli, N., Piruzian, E. // XX International Congress of Genetics “Genetics – Understanding living systems” Berlin, Germany, 12 – 17 July 2008, p. 86.
7. Mokryakova, M.V. Design of plant systems for modified defensin gene from sunflower. [Текст] / Mokryakova, M.V., Kromina, K.A., Mirakhorli, N., Abdeeva, I.A., Piruzian, E.S. // Abstract book 33rd FEBS Congress and 11th IUBMB Conference Biochemistry of Cell Regulation, 28 June – 3 July 2008, Athens, Greece, p. 32.

8. Игнатов, А.Н. Основные направления развития методов диагностики фитопатогенных микроорганизмов [Текст] / Игнатов, А.Н., Корнев, К.П., Пунина, Н.В., Мокрякова, М.В., Мазурин, Е.С., Карлов, А.Н. // Доклады ТСХА. 2009. Вып.281. С.22 – 24.
9. Pogorelko, G.V. Human genes in plants-what do they do there? [Текст] / Pogorelko, G.V., Мокрякова, М.В., Abdeeva, I.A., Piruzian, E.S. // Abstract of International Conference “Overcoming distance in signaling networks”, Maale Nachamisha, Jerusalem Hills, Israel, 15 – 19 March 2009, p.85.
10. Pogorelko, G. The role of plant immunophilins in host-pathogen interactions. [Текст] / Pogorelko, G., Мокрякова М., Abdeeva I., Abdeev R., Piruzian E. // Abstract book 22nd New Phytologist Symposium Effectors in plant-microbe interactions, Paris, France 13 – 16 September 2009, p.60
11. Мокрякова, М.В. Probability of horizontal transgenesis of effector genes among bacterium genus *Xanthomonas*. [Текст] / Мокрякова М.В., Ignatov A.N., Piruzian E.S. // Abstract book 8th International Conference on *Pseudomonas syringae* and related pathogens, Oxford, UK 31 August – 3 September 2010, p.47
12. Мокрякова, М.В. Анализ генов-эффекторов третьей транспортной системы при взаимодействии патоген-хозяин. [Текст] / Мокрякова, М.В., Брускин С.А., Пирузян Э.С. // Материалы Четвертой Международной школы молодых ученых по молекулярной генетике «Геномика и биология клетки» – Звенигород, 29 ноября – 3 декабря 2010г.
13. Мокрякова, М.В. Роль пептидил-пролил цис/транс-изомераз во взаимодействии растение хозяин-патоген. [Текст] / Мокрякова М.В., Погорелко Г.В., Абдеева И.А., Пирузян Э.С. // Материалы первых международных Беккеровских чтений (научно-практической конференции) – Волгоград, 27 – 29 мая 2010 г.
14. Мокрякова, М.В. Трансгенные растения *Arabidopsis thaliana* с повышенной экспрессией генов пептидил-пролил цис-транс изомераз более устойчивы к фитопатогенам. [Текст] / Мокрякова М.В., Погорелко Г.В., Брускин С.А. // Трансгенные Материалы 2-ой Международной школы-конференции молодых ученых "Генетика и селекция растений, основанная на современных генетических знаниях и технологиях" - Москва, Звенигород, 5 – 10 декабря 2011г.
15. Мокрякова, М.В. HORIZONTAL TRANSFER OF holPsyAE TTSS EFFECTOR GENE IN *Xanthomonas campestris* STRAINS [Текст] / Мокрякова, М.В., Ignatov A.N., Bruskin S.A. // Program and abstracts IS-MPMI 2012 XV International Congress, Kyoto, Japan 29 July – 2 August 2012, p.216 – 217.
16. Мокрякова, М.В. Иммунофилины и их роль в защитном ответе растения [Текст] / Мокрякова, М.В., Погорелко Г.В. // Материалы международной научной конференции "Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы", Минск, 2012, с.88.