

На правах рукописи



**ОМЕЛИЧКИНА**  
**Юлия Викторовна**

**ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ РАСТЕНИЙ НА ДЕЙСТВИЕ ФИТОПАТОГЕНА**  
***CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUS* ПРИ**  
**СОВМЕСТИМЫХ И НЕСОВМЕСТИМЫХ**  
**ВЗАИМООТНОШЕНИЯХ ОРГАНИЗМОВ**

**03.01.05 – физиология и биохимия растений**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**диссертации на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук**

**Иркутск — 2015**

Работа выполнена в лаборатории растительно-микробных взаимодействий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, г. Иркутск

**Научный руководитель:**

Кандидат биологических наук                      Шафикова Татьяна Николаевна

**Официальные оппоненты:**

Доктор биологических наук, профессор Дрюккер Валентин Валерьянович  
(Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Лимнологический институт Сибирского отделения РАН)

Доктор биологических наук                      Игнатов Александр Николаевич  
(Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр  
«Биоинженерия» РАН)

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, г. Уфа

Защита диссертации состоится «17» июня 2015 г. в 15<sup>00</sup> ч на заседании диссертационного совета Д 003.047.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском институте физиологии и биохимии растений СО РАН по адресу: 664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132, а/я 317. Факс (3952)510754, e-mail: matmod@sifibr.irk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН.

Текст автореферата размещен на сайте Института ([www.sifibr.irk.ru](http://www.sifibr.irk.ru)).

Автореферат разослан «    »                      2015 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 003.047.01  
кандидат биологических наук



Г.П. Акимова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Растения вынуждены сосуществовать с огромным разнообразием микроорганизмов, многие из которых являются патогенами. Инфекционные заболевания сельскохозяйственных растений, в том числе и кольцевая гниль картофеля, которую вызывает грамположительная бактерия *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*), приводят к значительным потерям урожая. Поиск методов борьбы с фитопатогенами, которые бы отвечали современным требованиям экологической безопасности, невозможен без изучения физиолого-биохимических основ взаимодействий растения и патогена, а также выявления ключевых звеньев, определяющих исход взаимоотношения партнеров. Реализация совместимых или несовместимых взаимоотношений в фитопатосистеме определяется сочетанием факторов вирулентности патогена и механизмов иммунитета растения. Согласно современным представлениям, защита растительного организма от воздействий патогена определяется функционированием многоуровневой иммунной системы с участием различных структур и механизмов врожденного иммунитета. Первый уровень фитоиммунитета – паттерн-активируемый иммунитет (PTI) является неспецифическим и активируется при распознавании растением молекулярных паттернов (MAMP), присущих всем без исключения микроорганизмам. Детекция эффекторных молекул патогена внутриклеточными рецепторами растения запускает второй уровень иммунитета – специфический эффектор-активируемый иммунитет (ETI) (Jones, Dangl, 2006). Активация реакций ETI на уровне клетки определяется следующими событиями: перераспределением ионов кальция в клетке, образованием активных форм кислорода и азота, остановкой движения цитоплазмы, отхождением от клеточной стенки и конденсацией протопласта с сохранением целостности плазматической мембраны. Описанные события иллюстрируют развитие программируемой клеточной смерти (ПКС), фенотипически проявляющейся как реакция сверхчувствительности (СЧ) – локальный некроз в месте инфицирования (Mur et al., 2008). Развитие упомянутых выше реакций ETI определяется доставкой факторов вирулентности патогена непосредственно в клетку растения. Для грамотрицательных фитопатогенов система доставки эффекторов в клетку растения детально изучена (Lee et al., 2013), в то время как для грамположительных фитопатогенов этот механизм практически не известен. Предполагается, что основные факторы патогенности у грамположительных бактерий присутствуют в экзометаболическом комплексе. В том числе это относится и к *Cms*.

К наименее изученным, но немаловажным факторам вирулентности относится способность фитопатогенов формировать биопленки, что определяет колонизацию растения и развитие симптомов заболевания. Так это происходит и при инфицировании картофеля *Cms* (Bae et al., 2014). Влияние факторов

резистентности растения на процесс образования фитопатогенами биопленок практически не исследовано. Также не изучены механизмы устойчивости растений, в реализации которых задействованы стрессовые белки, в том числе БТШ, играющие важную роль не только при тепловом шоке, но и при других видах стресса. Все вышесказанное определяет актуальность и обосновывает выбор цели работы.

**Цель и задачи исследования.** Цель – изучение развития ответных реакций растений на действие фитопатогена *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* на уровне клетки и целого растения при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить развитие ответных реакций культур клеток табака на действие *Cms*: изменение морфологии, жизнеспособности клеток и уровня внеклеточного пероксида водорода;

2. Определить развитие локальных и системных реакций на уровне целого растения в системе табак – *Cms*;

3. Выявить способность экзометаболитов *Cms* индуцировать развитие защитных реакций растений табака на уровне клетки и целого растения;

4. Изучить на клеточном уровне развитие защитных реакций растения в системе: картофель – *Cms*;

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

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

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

Установлено, что развитие реакций ЕТІ, таких как реакция СЧ, СПУ, двухфазное повышение уровня пероксида водорода, у растений табака вызывают как бактерии *Cms*, так и их экзометаболиты.

Показано двухфазное повышение уровня внеклеточного пероксида водорода при действии *Cms* на клетки растения-хозяина устойчивого сорта, что свидетельствует о развитии реакций ЕТІ в данной фитопатосистеме.

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

Выявлено, что БТШ модулируют развитие специфического эффектор-активируемого иммунитета растений.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Изучение ответных реакций растений на патоген на примере двух фитопатосистем – совместимой и несовместимой будет способствовать более полному пониманию механизмов многоуровневого фитоиммунитета, локальной и системной устойчивости, а также иммунной памяти, которая реализуется у следующих поколений растений. Наряду с чисто теоретическим, эти исследования имеют практическое значение, поскольку позволят обосновать новые экологически безопасные подходы защиты растений, заключающиеся в активации собственных иммунных сил растительного организма против патогенов.

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

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

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 292 работы, из них 23 отечественных и 269 зарубежных источников. Работа изложена на 162 страницах, содержит 37 рисунков и 1 таблицу.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали культуры фитопатогенных бактерий *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (штаммы: С1С 31, CsR14 (университет г.Турку, Финляндия), Ас-1405 (Всероссийская коллекция микроорганизмов г.Москва) и условно-патогенных для человека бактерий *Escherichia coli* (штамм XL-1Blue).

В работе были использованы: растения картофеля (*Solanum tuberosum* L.) *in vitro*, суспензионные культуры клеток картофеля (сорт Луговской (Украинский НИИ картофельного хозяйства) – устойчивый к *Cms*, сорт Лукьяновский (ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха) – восприимчивый к *Cms*, сорт Жуковский ранний (Украинский НИИ картофельного хозяйства) – среднеустойчивый к *Cms*);

Растения табака (*Nicotiana tabacum*), культивируемые *in vitro*, *in vivo*, суспензионная культура клеток табака; культура клеток, полученная из растений табака, трансформированных *Agrobacterium tumefaciens* штамм LBA 4400, несущих вектор pBiCaMV с генами *npt* и *hsp101* в смысловой ориентации под управлением 35Sпромотора, кодирующего белок теплового шока Hsp101 *Arabidopsis thaliana* (L. Heyn) (трансгенные растения *N. tabacum* были получены в лаборатории физиологии трансгенных растений СИФИБР СО РАН (Maximova et al., 2012));

Суспензионная культура клеток *A. thaliana* раса Columbia.

**Культивирование растений *in vitro*** осуществляли на агаризованной среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением витаминов и гормонов, (рН 5,8) при температуре 24 – 25°C днем и 19 – 20°C ночью, с освещенностью 5 – 6 кЛх и продолжительностью фотопериода 16 часов.

**Культивирование культур клеток растений** табака, картофеля и арабидопсиса осуществляли на среде МС с добавлением витаминов и гормонов, (рН 5,7 – 5,8) при 26°C, в темноте, с постоянной аэрацией путем качания. Культуры клеток поддерживали путем еженедельного шестикратного разведения выросшей суспензии свежей средой.

**Культивирование бактерий *Cms*** проводили на агаризованной среде С следующего состава: пептон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, глюкоза 5 г/л, NaCl 5 г/л (рН 7,2). Для эксперимента бактерии культивировали при 26°C без освещения с постоянной аэрацией путем качания в жидкой среде С.

Для изучения влияния экзометаболитов *Cms* на развитие защитных реакций табака использовал следующие модификации: 1) фильтрат, лишенный бактериальных клеток (cell free culture filtrate, CF) – бактериальную суспензию центрифугировали 5 минут при 8 500 g и пропускали через мембранный фильтр (0,22 микрон); 2) термически инактивированная бактериальная суспензия (dead culture, DC) – бактериальную суспензию выдерживали 5 минут при 100°C.

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

**Заражение культур клеток и растений *in vitro*, *in vivo*** проводили суточной бактериальной суспензией *Cms* или *E. coli* (10<sup>7</sup>КОЕ/мл) и осуществляли с помощью метода инокуляции листьев, а также заражения растений через корневую систему путем внесения бактериальной суспензии шприцом в питательную среду.

**Температурная обработка.** Для суспензионной культуры клеток табака применяли следующие условия температурной обработки: 37°C в течение 120 мин, 39°C в течение 120 мин, 43°C в течение 60 мин, 46°C в течение 40 мин, 50°C в течение 10 мин.

Для предварительной тепловой обработки перед заражением бактериальной суспензией культуры табака и картофеля инкубировали в

течение двух часов при 37°C, затем в течение двух часов при 26°C и после этого инокулировали суспензией *Sms* (10<sup>7</sup> КОЕ/мл).

**Определение выживаемости клеток культур растений** после ко-культивирования с *Sms* проводили по реакции восстановления 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида (ТТХ) по методу (Еникеев и др., 1995).

**Изучение изменения морфологических параметров клеток растений при действии *Sms*** осуществляли с помощью методов световой и флуоресцентной микроскопии. Использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп AxioObserver Z1 (Германия) с цифровой монохромной камерой AxioCam MRm3 и пакетом программного обеспечения для захвата и анализа изображений AxioVision Rel.4.6. для микроскопического анализа растительных клеток после двойного окрашивания флуоресцеин диацетатом (FDA) и пропидий иодидом (PJ).

**Определение количества внеклеточного пероксида водорода** в культуре клеток табака и картофеля проводили спектрофотометрически с использованием индикатора ксиленоловый оранжевый. (Bindschedler et al., 2001).

**Электрофорез в ПААГ.** Выделение белка осуществляли по стандартной методике (Побежимова и др., 2004). Количество белка определяли по методу Лоури (Lowry et al., 1957). Электрофорез в ПААГ проводили по модифицированной системе Лэммли (Laemmli, 1970), на приборе Mini-PRONEAN III Electrophoretic Cell (Bio-Rad, USA).

**Вестерн-блоттинг.** Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (Sigma, США) проводили в приборе для блоттинга (Bio-Rad, США); использовали антитела против Hsp101 (Agrisera As 07253) Hsp60 (SPA-807, StressGen, США), Hsp70/Hsc70 (SPA-820, StressGen, США).

**Определение образования биопленок** осуществляли, используя метод статического культивирования микроорганизмов в 96-луночных пластиковых планшетах; образовавшиеся пленки окрашивали красителем Генциан Виолет. (Merritt et al., 2005).

**Статистическая обработка результатов.** Во всех случаях биологическая повторность экспериментов была 2 – 8 кратная. Полученные данные обработаны статистически: рассчитаны средние арифметические значения и их стандартные отклонения. Для оценки различий между отдельными показателями использовали расчет критерия Уилкоксона – Манна – Уитни (Ивантер, Коросов, 2010).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Ответные реакций растений табака при взаимодействии с *Sms*

При заражении бактериями *Sms* листьев табака, культивируемого *in vivo*, *in vitro* в месте инфицирования путем укола происходит развитие локальных точечных некрозов – проявление реакции СЧ. Инфицирование корневой

системы растений табака также сопровождалось развитием некрозов в месте контакта с патогеном (Рис. 1.).



Рис. 1. Локальные некрозы корней растений табака. А – инфицирование *Cms*; Б – внесение среды С.

Данное явление описано нами впервые. Некрозы по корню не распространялись, т.е. были локальны, что позволяет сделать вывод о возможности развитии реакции СЧ на корне растения, где, сверхчувствительной гибели, вероятно, подвергаются меристематические клетки. Некроз кончика корня сопровождался интенсивным образованием боковых корешков.

### Развитие системной приобретенной устойчивости у растений табака

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

Возможность развития СПУ изучалась у растений табака *in vitro* после заражения *Cms*. Для вторичного инфицирования использовали нетипичную для растений бактерию *E. coli* не способную вызывать развитие видимых ответных реакций, а именно СЧ реакцию у растений табака. Однако инъекция *E. coli* в листья растений табака, предварительно зараженных *Cms*, приводила к появлению локальных некрозов в месте вторичной обработки (Рис. 2.).

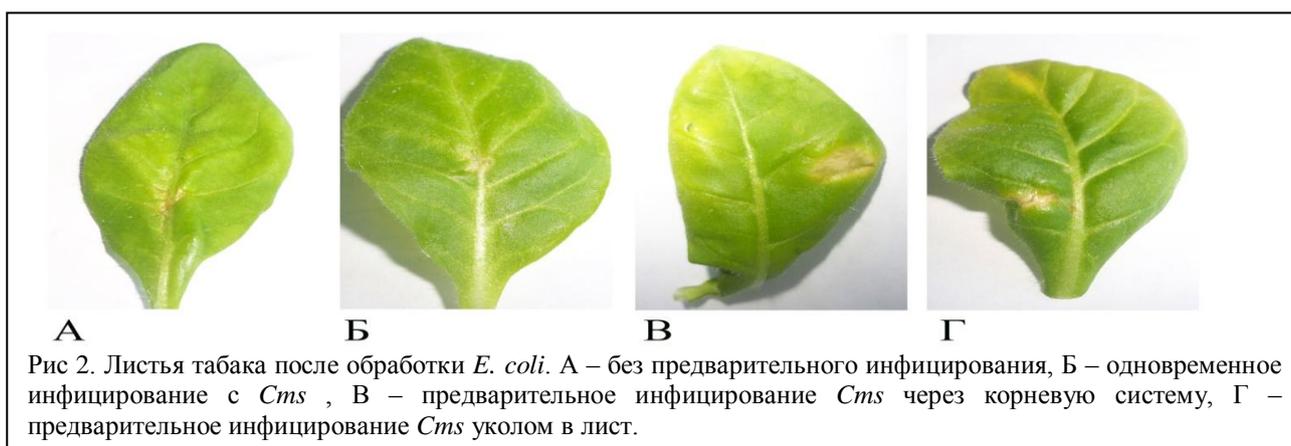


Рис 2. Листья табака после обработки *E. coli*. А – без предварительного инфицирования, Б – одновременное инфицирование с *Cms*, В – предварительное инфицирование *Cms* через корневую систему, Г – предварительное инфицирование *Cms* уколком в лист.

Способ первичного инфицирования *Cms* – инъекцией в лист или в прикорневую зону за 14 суток до внесения *E. coli* – не имел значения. В обоих случаях последующая обработка суспензией *E. coli* сопровождалась развитием СЧ реакции, что свидетельствует о развитии СПУ после первичного инфицирования *Cms*. Важно отметить тот факт, что для развития СПУ

необходимо время, о чем свидетельствует отсутствие реакции в месте обработки *E. coli* при одновременном инфицировании *Cms*.

### Влияние экзометаболитов *Cms* на развитие ответных реакций у растений табака

Факторами патогенности фитопатогенных бактерий, как правило, являются их метаболиты, секретируемые во внешнюю среду или непосредственно в клетку хозяина системами секреции. Для грамположительных патогенов не показано присутствие системы секреции

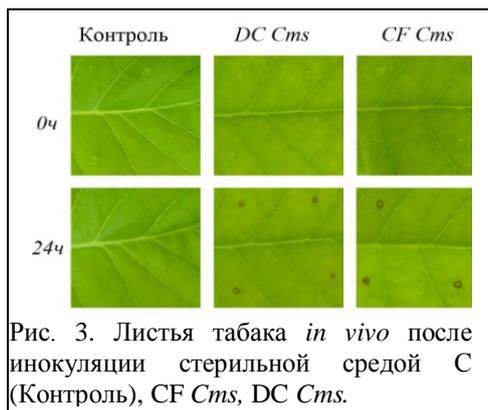


Рис. 3. Листья табака *in vivo* после инокуляции стерильной средой С (Контроль), CF *Cms*, DC *Cms*.

факторов патогенности непосредственно в клетку, и экзометаболиты секретируются во внешнюю среду, но, тем не менее, участвуют в модуляции защитных реакций растения (Setti et al., 2014). В связи с этим, было изучено участие экзометаболитов грамположительной бактерии *Cms* в индукции реакции СЧ у табака.

Инокуляция листьев растений табака *in vitro*, *in vivo* CF и DC *Cms* также показала развитие СЧ реакции в месте инъекции (Рис.3.).

Было установлено, что наряду с бактериальной суспензией *Cms*, фильтрат CF *Cms*, а также термически инактивированная бактериальная суспензия DC *Cms* индуцируют развитие локальных некрозов корня растений табака. В последующих экспериментах проверялась способность экзометаболитов *Cms* индуцировать развитие СПУ у растений табака (Рис. 4.).

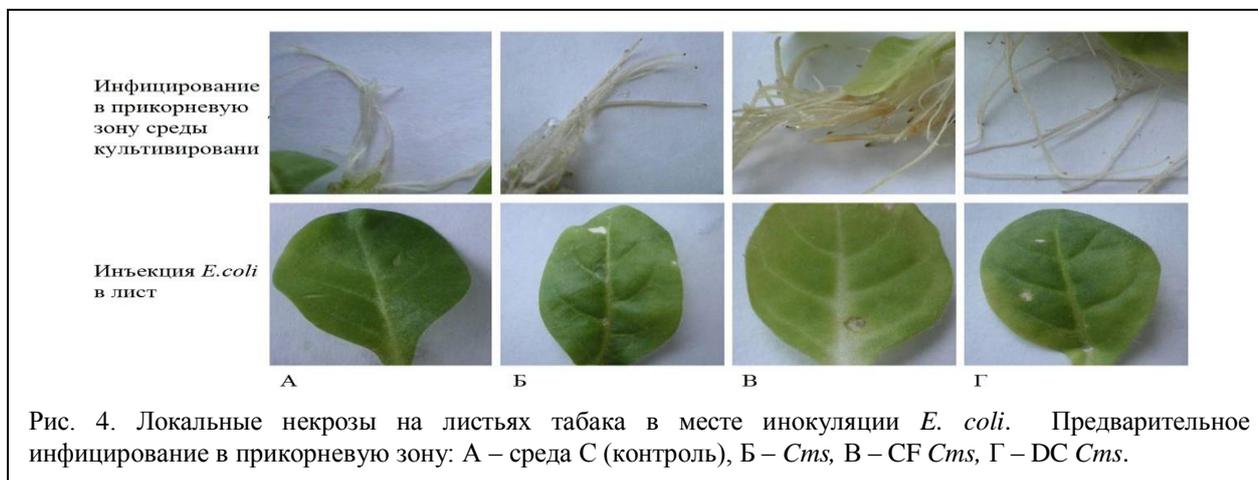


Рис. 4. Локальные некрозы на листьях табака в месте инокуляции *E. coli*. Предварительное инфицирование в прикорневую зону: А – среда С (контроль), Б – *Cms*, В – CF *Cms*, Г – DC *Cms*.

Из рисунка 4 видно, что инокуляция как CF *Cms*, так и DC *Cms* в корневую систему растений вызывала развитие реакции СЧ при последующем заражении *E. coli*, подобно суспензии *Cms*. Таким образом, метаболиты, которые выделяет в среду культивирования *Cms*, индуцируют развитие защитных реакций у растений табака, таких как реакция СЧ и сопутствующее ей развитие СПУ. Действие сохранялось и после термической обработки 100°C, что свидетельствует о термостабильности экзометаболитов

## Выживаемость клеток культуры табака при взаимодействии с *Cms*

Изучение параметров и темпов гибели проводили на суспензионной культуре клеток табака после инфицирования *Cms*.

Выживаемость растительных клеток после инфицирования оценивали по их способности восстанавливать ТТХ. В качестве контроля использовали культуру клеток табака без заражения данным фитопатогеном. Результаты представлены в виде процента от контроля (Рис.5.).

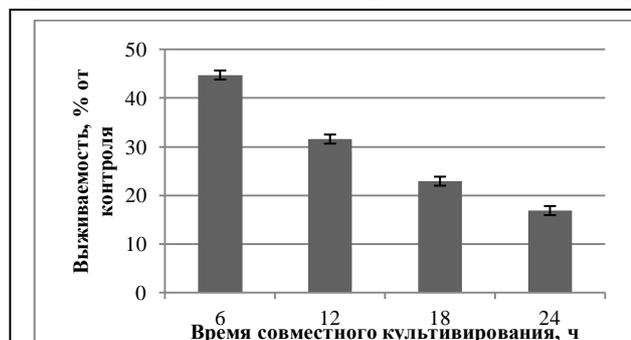


Рис. 5. Выживаемость клеток культуры табака в ходе совместного культивирования с *Cms*, процент от контроля.

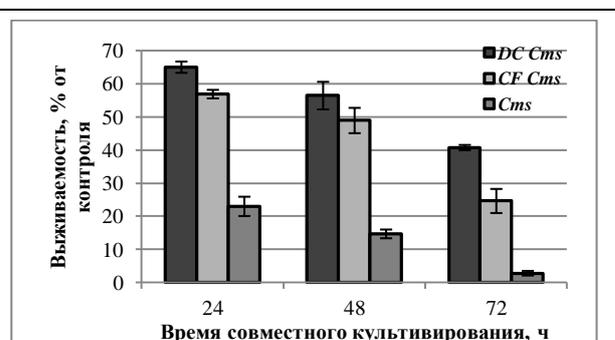


Рис. 6. Выживаемость клеток культуры табака в ходе совместного культивирования с *Cms*, *CF Cms*, *DC Cms*, процент от контроля.

Выживаемость клеток культуры табака через 6 часов после внесения бактериальной суспензии составляет 45%, через 12 часов – 30%, а через 24 часа культивирования составляет всего 18%. Скоротечность процесса гибели свидетельствует о специфичности протекающих реакций – механизмах развития ПКС.

Внесение *CF Cms* и *DC Cms* в культуру клеток табака также приводит к гибели растительных клеток (Рис. 6.). Но, если при внесении *Cms* процент гибели через 24 часа культивирования составляет около 80%, то при действии *CF Cms* и *DC Cms* только 45% и 35%, соответственно. В ходе дальнейшего культивирования процент мертвых клеток постепенно увеличивается, но и через 72 часа он не достигает 100%, как в случае с суспензией бактерий *Cms*.

## Выживаемость культуры клеток картофеля при действии *Cms*

Определение выживаемости клеток картофеля, различных по

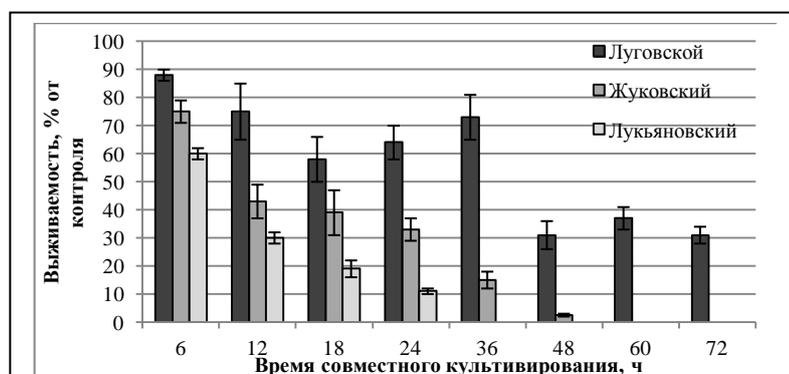


Рис. 7. Выживаемость клеток культуры картофеля (сорта Луговской, Жуковский ранний и Лукьяновский) при совместном культивировании с *Cms*, процент от контроля. Контроль – жизнеспособность клеток культуры картофеля при внесении среды С.

устойчивости к *Cms* сортов Луговской, Жуковский ранний и Лукьяновский в течение первых суток культивирования с *Cms* показало следующие результаты (Рис. 7.). Значительная гибель клеток восприимчивого сорта наблюдается уже через 6 часов культивирования (40%), и с течение времени

процент увеличивался: через 24 часа достигал 90%. В то время как у относительно устойчивого сорта процент живых клеток в первые сутки культивирования составлял 65 %, только к 3-им суткам снижался до 30%. Процент гибели клеток промежуточного по устойчивости сорта меньше, чем у восприимчивого, но больше, чем у устойчивого сорта. Очевидно, что у устойчивого сорта картофеля происходит развитие более эффективных защитных реакций, чем у восприимчивого.

### **Выживаемость культуры клеток *Arabidopsis thaliana* при взаимодействии с *Cms***

Для подтверждения специфичности действия *Cms* изучалась выживаемость суспензионной культуры клеток *A. thaliana* после заражения данным патогеном. *A. thaliana* не является растением-хозяином для *Cms*, не отвечает запуском СЧ реакции на вторжение этого патогена и относится к семейству капустных (*Brassicaceae*), в то время как картофель и табак – представители семейства пасленовых (*Solanaceae*). Через сутки совместного культивирования процент живых клеток *A. thaliana* равен почти 100%, через 48 часов гибель клеток составляет 15%, и лишь на третьи сутки регистрируется значительный процент гибели (около 60%). Можно предположить, что *Cms* непосредственно не вызывает гибели клеток арабидопсиса ни путем СЧ-реакции, ни путем развития заболевания, но является опосредованной причиной гибели клеток в результате истощения питательной среды и токсического действия продуктов жизнедеятельности бактерий.

Таким образом, *Cms* обладает высокой специализацией, вызывая гибель клеток только у растения-хозяина картофеля, в результате развития заболевания, и у растений табака в ходе СЧ-реакции – гибели клеток по типу ПКС.

### **Морфологические параметры гибели растительных клеток при действии *Cms***

Реакция СЧ – гибель клеток в месте инфицирования по типу ПКС. Самым ранним морфологическим признаком развития ПКС является отхождение протопласта от клеточной стенки по всему периметру, чего не наблюдается при развитии некротических процессов гибели (Swidzinski et al., 2002). Деграция клеточного содержимого при развитии ПКС осуществляется в рамках целостной плазматической мембраны, в отличие от процессов неуправляемой некротической гибели, характеризующейся образованием пор в мембране, набуханием клетки и разрывом плазматической мембраны (Kroemer et al., 2009).

В первые часы совместного культивирования клеток табака с *Cms* было обнаружено отхождение протопласта от клеточной стенки, что свидетельствует о развитии гибели по типу ПКС.

Изучали морфологию клеток корневых волосков проростков табака при добавлении в среду культивирования *Cms* (Рис.8.). На представленных

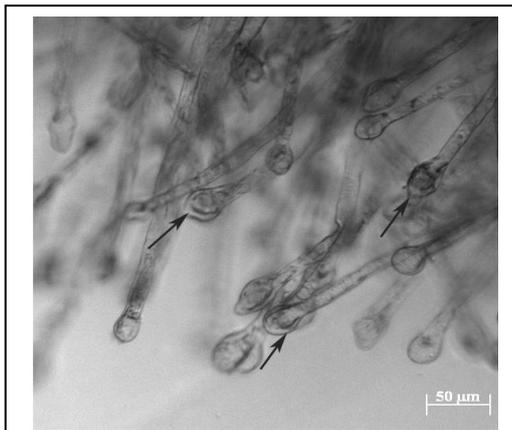


Рис. 8. Изменение морфологии клеток корневых волосков табака в ходе совместного культивирования с *Cms*.

микрофотографиях хорошо видно отхождение протопласта в клетках корневых волосков. Данные результаты согласуются с развитием реакции СЧ на корнях табака при действии *Cms*.

Таким образом, морфология гибели, как на уровне клеток культуры, так и на уровне клеток корневых волосков целого растения табака при действии *Cms* подтверждает активацию специфических реакций ЕТІ, а именно развитие ПКС, реализующейся в форме реакции СЧ у целого растения.

Изучение изменения морфологии клеток картофеля при совместном культивировании с *Cms* не выявило отхождение протопласта. Гибель клеток проходила по типичному некротическому пути: наблюдался разрыв клеточной стенки и плазматической мембраны и выход содержимого клетки во внешнюю среду.

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

В результате контакта микроорганизма с растительной клеткой происходит активация генерации АФК. Этот процесс наблюдается как в результате восприятия неспецифического патогена и запуска РТІ, так и в результате действия специфичного патогена и активации ЕТІ, но с различной интенсивностью. Таким образом, изучение динамики и интенсивности накопления АФК позволяет судить об активируемых механизмах.

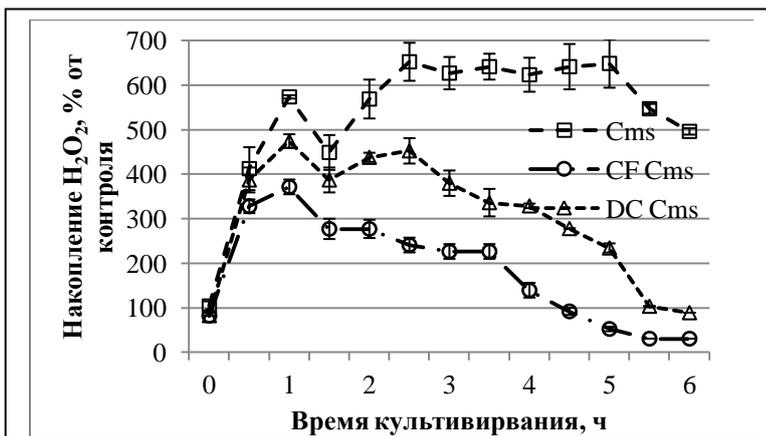


Рис. 9. Динамика накопления внеклеточной перекиси водорода в культуре клеток табака при совместном культивировании с *Cms*, *CF Cms*, *DC Cms*, процент от контроля. Контроль – уровень перекиси водорода в культуре клеток табака при внесении среды С.

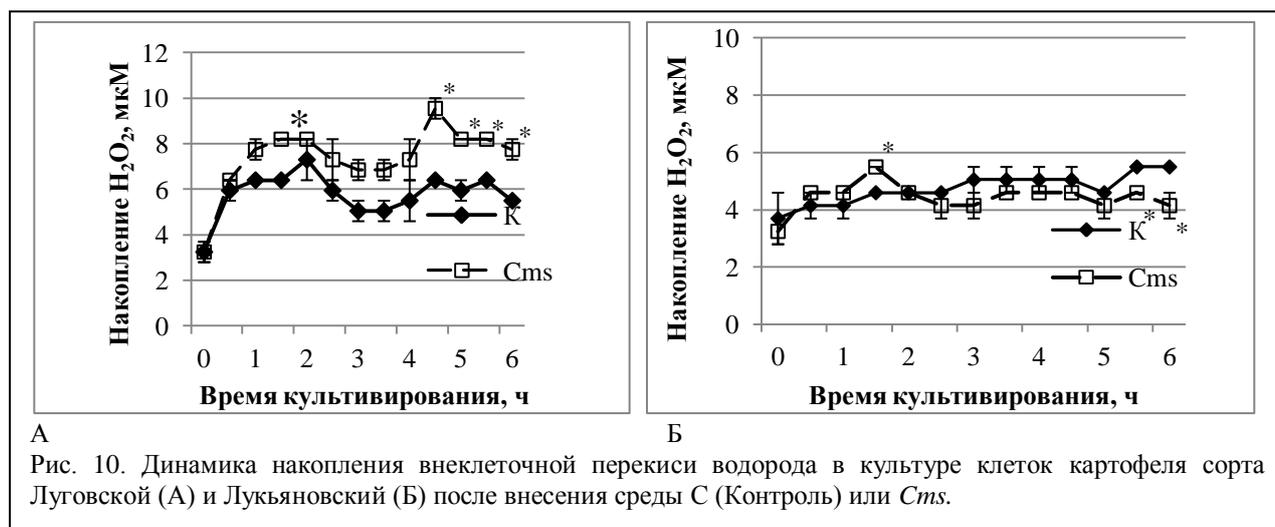
Из рисунка 9 видно, что сразу после инокуляции в культуру клеток табака *Cms*, в клеточную среду активно начинает выделяться пероксид водорода, уже через 1 час количество внеклеточных АФК составляет 35 мкМ – практически 600% от контроля, но затем концентрация начинает снижаться. Повышение уровня пероксида через час культивирования и затем его снижение можно наблюдать и

при внесении *CF Cms* и *DC Cms*. Второй пик повышения концентрации пероксида наблюдали через 3 часа после внесения бактерий в культуру табака. Вместе с тем, методом цейтраферной съемки была зарегистрирована остановка

движения цитоплазмы через 4 часа после инокуляции бактерий, что свидетельствует в пользу того, что идут активные процессы развития гибели клетки по типу ПКС. К 6 часам совместного культивирования содержание пероксида водорода начинает постепенно снижаться, и, как указывалось выше, наблюдается снижение жизнеспособности растительных клеток до 45%.

### Генерация пероксида водорода в культуре клеток картофеля при взаимодействии с *Cms*

На следующем этапе работы был определен уровень накопления АФК в патосистеме картофель - *Cms*, в которой реализуются совместимые взаимоотношения организмов (Рис. 10.).



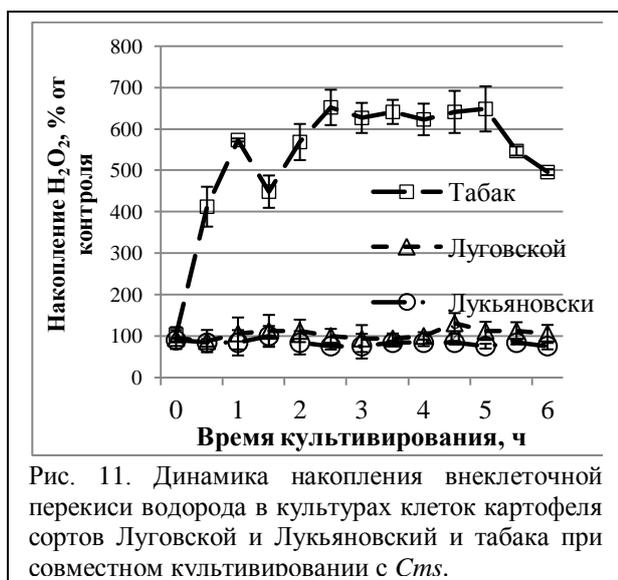
А

Б

Рис. 10. Динамика накопления внеклеточной перекиси водорода в культуре клеток картофеля сорта Луговской (А) и Лукьяновский (Б) после внесения среды С (Контроль) или *Cms*.

При заражении культуры клеток картофеля устойчивого сорта *Cms* наблюдалось образование незначительного количества пероксида водорода (Рис.10А.). Максимальная концентрация отмечалась через 4,5 часа после инокуляции патогеном и составляла чуть меньше 10  $\mu M$ . Значимое отличие от контроля концентрации пероксида регистрировали в точке 1,5 часа и после 4,5 часов культивирования. Таким образом, у устойчивого сорта картофеля наблюдается слабо выраженное двухфазное увеличение концентрации АФК, которое, вероятно, и вызывает задержку в развития процессов заболевания.

Содержание внеклеточного пероксида водорода в культуре клеток картофеля восприимчивого сорта после внесения *Cms* колебалось в диапазоне от 3 до 6  $\mu M$  и с течением времени практически не изменялось (Рис. 10Б.). При этом установлено, что в точке 1,5 часа совместного культивирования наблюдалось увеличение концентрации пероксида, значимо отличающееся от контроля. Можно предполагать, что это первый неспецифический пик генерации АФК. В дальнейшем концентрация не увеличивалась, и даже снижалась по сравнению с контрольным вариантом (достоверно меньше в точках 5,5 и 6 ч.), что говорит о гашении защитных реакций в данной системе.



Интенсивность генерации пероксида в системе табак-*Cms* значительно выше, чем в системе картофель - *Cms*, что свидетельствует в пользу запуска ЕТІ и объясняет развитие реакции СЧ (Рис. 11.).

### Влияния теплового шока на индукцию БТШ и выживаемость клеток культуры табака

Инфицирование патогеном, также как и другие виды стресса, приводит к индукции синтеза белков теплового шока Hsp70, Hsp90, и Hsp100 (Swindell

et al., 2007). Важно выяснить, принимают ли участие БТШ в развитии ответных реакций на патоген, установить их роль в развитии защитного ответа при развитии совместимых и несовместимых взаимоотношений.

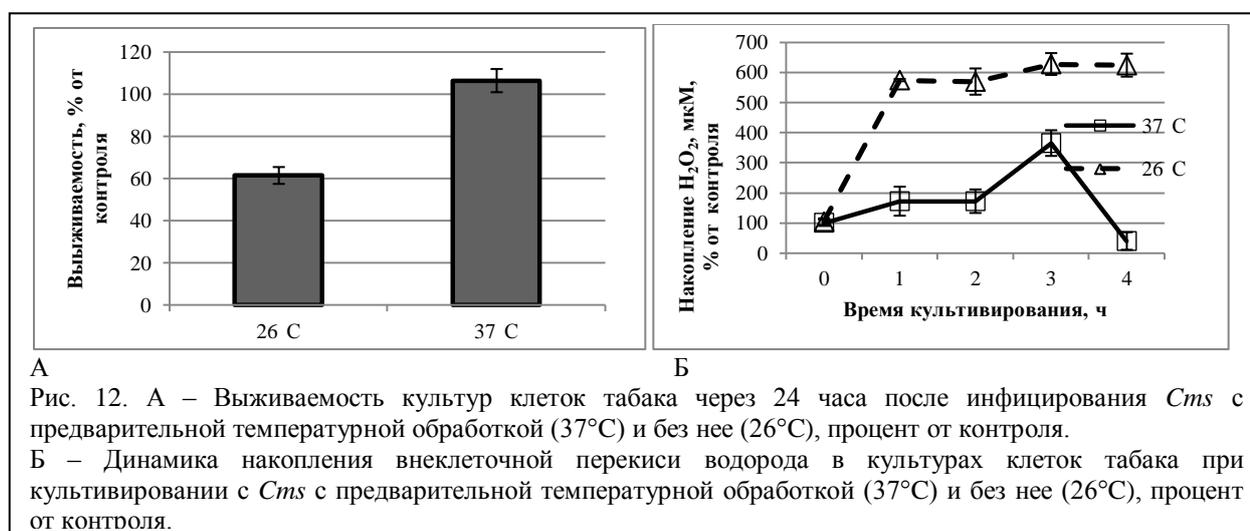
Синтез БТШ индуцировали посредством умеренного теплового воздействия на культуры клеток табака; с помощью трансформации растений табака геном *hsp101*.

Предварительно устанавливали температуру, оптимальную для индукции синтеза БТШ, а также определяли температурный порог, при котором начинается гибель клеток. Для этого была изучена экспрессия БТШ и жизнеспособность клеток растений при воздействии теплового шока различной интенсивности.

При культивировании клеток табака в нормальных условиях (26°C) регистрируется минимальное присутствие конститутивно синтезируемого митохондриального белка Hsp60, с увеличением температуры инкубации увеличивается и уровень синтеза белка Hsp60. Синтез белков Hsp70 и Hsp101 впервые регистрируется при температуре 37°C, и имеет максимальное значение в двух точках эксперимента – при температуре инкубации 37°C и 39°C. При более высоких температурах синтез Hsp101 не регистрируется, а уровень синтеза Hsp70 ниже, чем при температурах 37°C и 39°C. Жизнеспособность клеток табака при действии температуры 37°C была сопоставима с жизнеспособностью клеток в нормальных условиях культивирования (26°C), чего нельзя сказать о температурной обработке 39°C. Температурное воздействие 39°C не только не снижало жизнеспособность клеток табака, но даже значительно повышало ее, активируя неизвестные механизмы. При обработке температурой 43°C и выше жизнеспособность клеток табака снижалась. На основании полученных результатов, для активации синтеза БТШ использовали температуру 37°C.

## БТШ и их участие в защитном ответе табака на действие *Sms*

Для изучения функций БТШ в процессе развития ПКС табака при действии несовместимого с ним патогена *Sms* использовалась следующая схема эксперимента. Культуру клеток инкубировали при 37°C в течение 120 минут, затем выдерживали при 26°C в течении 120 минут, что необходимо для синтеза и накопления БТШ, и инокулировали *Sms*. Выживаемость клеток растений оценивали по реакции восстановления ТТХ через 24 часа культивирования с *Sms*. Результаты рассчитывали в виде процента от контроля. Контролем считали выживаемость растительных клеток подвергнутых данной тепловой обработке, но не зараженных бактериями *Sms*. Полученные данные сравнивали с выживаемостью растительных клеток без воздействия температуры перед заражением *Sms* (Рис. 12А.).



А

Б

Рис. 12. А – Выживаемость культур клеток табака через 24 часа после инфицирования *Sms* с предварительной температурной обработкой (37°C) и без нее (26°C), процент от контроля.

Б – Динамика накопления внеклеточной перекиси водорода в культурах клеток табака при культивировании с *Sms* с предварительной температурной обработкой (37°C) и без нее (26°C), процент от контроля.

Обнаружено, что гибель клеток табака без предварительного температурного воздействия при заражении *Sms* составляла примерно 40% от контроля. В то время как при заражении культуры клеток табака после инкубации при температуре 37°C гибель клеток не регистрировалась. Таким образом, температурное воздействие 37°C в течение 120 минут и выдерживание 120 минут при температуре 26°C способствовали развитию защитных механизмов, направленных на подавление гибели клеток в результате СЧ-реакции.

Определяли образование апопластного пероксида в культуре клеток табака с предварительной тепловой обработкой при действии *Sms* (Рис. 12Б.). Интенсивность генерации пероксида при действии *Sms* в культуре клеток табака, предварительно подвергнутой действию температуры 37°C ниже, чем в культуре при стандартных условия культивирования. Вероятно, синтез БТШ модулирует развитие ПКС и понижает интенсивность генерации АФК.

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

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

Для сравнения представлена выживаемость клеток нетрансформированного табака. Процент живых клеток нетрансформированного табака резко снижался в первые сутки культивирования с *Cms*: к 24 часам она составляла только 15%, в то время как выживаемость клеток трансформированного табака – 90% и постепенно начинала снижаться только к третьим суткам культивирования (Рис. 13А.).

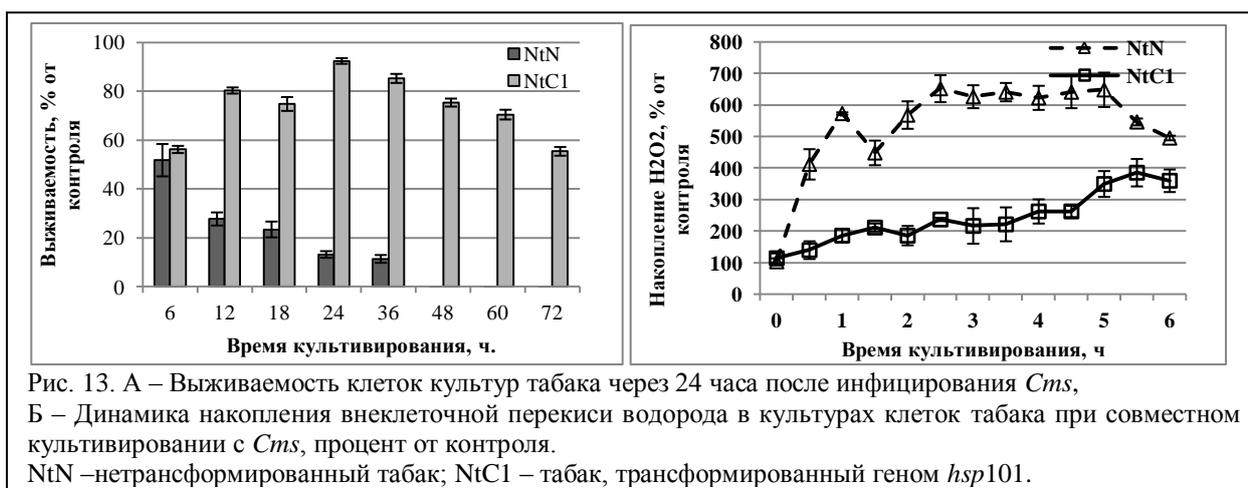


Рис. 13. А – Выживаемость клеток культур табака через 24 часа после инфицирования *Cms*, Б – Динамика накопления внеклеточной перекиси водорода в культурах клеток табака при совместном культивировании с *Cms*, процент от контроля. NtN – нетрансформированный табак; NtC1 – табак, трансформированный геном *hsp101*.

Полученные результаты дают основания предполагать, что Hsp101 может быть задействован в механизмах развития ЕТІ растений. Интенсивность генерации перексида водорода при действии *Cms* в культуре клеток табака, трансформированного геном *hsp101*, значительно ниже, чем у нетрансформированного табака (Рис. 13Б.). Методом цейтраферной съемки регистрировали движение цитоплазмы в культуре клеток трансформированного табака через 4 часа после внесения *Cms*, в то время как у нетрансформированного табака в это момент наблюдалась остановка движения цитоплазмы.

Таким образом, высокий уровень Hsp101 в трансформированной культуре подавляет развитие ПКС и резко снижает уровень внеклеточного перексида.

Специфичность защитных функций БТШ, т.е. участие именно в иммунных реакциях, определяли по оценке жизнеспособности культур клеток трансформированного и нетрансформированного табака в ходе культивирования с *E. coli* – возбудителя заболеваний человека и животных. Внесение *E. coli* влияло на жизнеспособность растительных клеток, причем практически одинаково снижало в клетках нетрансформированного (55%) и трансформированного табака (50%). *E.coli*, являясь патогеном животных, а не фитопатогеном, не обладает эффекторами, которые специфично активируют иммунные реакции растения, в том числе запускают СЧ-реакцию. Этому патогену, вероятно, присущи консервативные для всех бактерий паттерны

(MAMP), которые распознаются рецепторами растений и активируют базовый неспецифичный иммунитет РТІ, и эффекторы, активные в отношении клеток животных, но не узнаваемые рецепторами растений. Таким образом, отсутствие какого-либо эффекта сверхэкспрессии Hsp101 на жизнеспособность клеток табака при действии *E. coli*, в отличие от описанного выше повышения жизнеспособности при действии *Cms*, говорит в пользу участия Hsp101 в активации реакций специфического эффектор-активируемого иммунитета.

#### **Участие БТШ в защитных реакциях картофеля при заражении *Cms***

Для изучения роли БТШ в процессе гибели растительной клетки при развитии заболевания суспензионную культуру клеток картофеля сорта Жуковский ранний инкубировали при температуре 37°C в течение 120 минут, после периода 120 минут при 26°C культуру заражали *Cms*. Выживаемость растительных клеток оценивали сразу после заражения и через 24 часа культивирования по реакции восстановления ТТХ по ранее описанному методу.

Процент живых клеток культуры картофеля после 24 часов культивирования с *Cms* составляет около 40%. Предварительная инкубация растительной культуры при 37°C увеличивала процент живых клеток примерно до 70%. Полученные результаты позволяют предполагать протекторную функцию БТШ в системе совместимых взаимоотношений картофель – *Cms*.

#### **Влияние устойчивости растений на способность фитопатогена *Cms* формировать биопленки**

Бактерии *Cms*, как и другие васкулярные фитопатогены, способны к формированию биопленок в сосудистой системе растений картофеля (Вае et al., 2014), способность к образованию биопленок у васкулярных патогенов является одним из факторов вирулентности, так как способствует увеличению резистентности к растительным антимикробным соединениям и блокированию ксилемного тока (Mansfield et al., 2012).

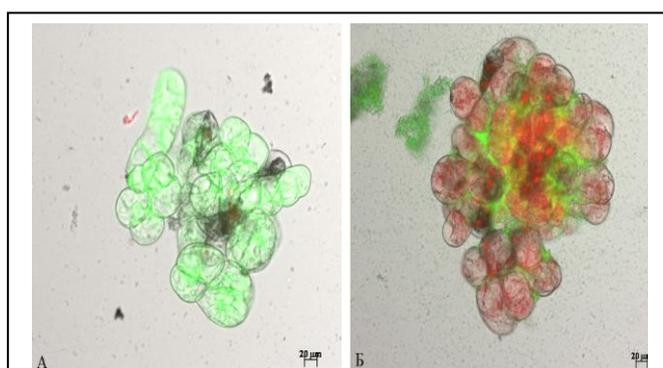
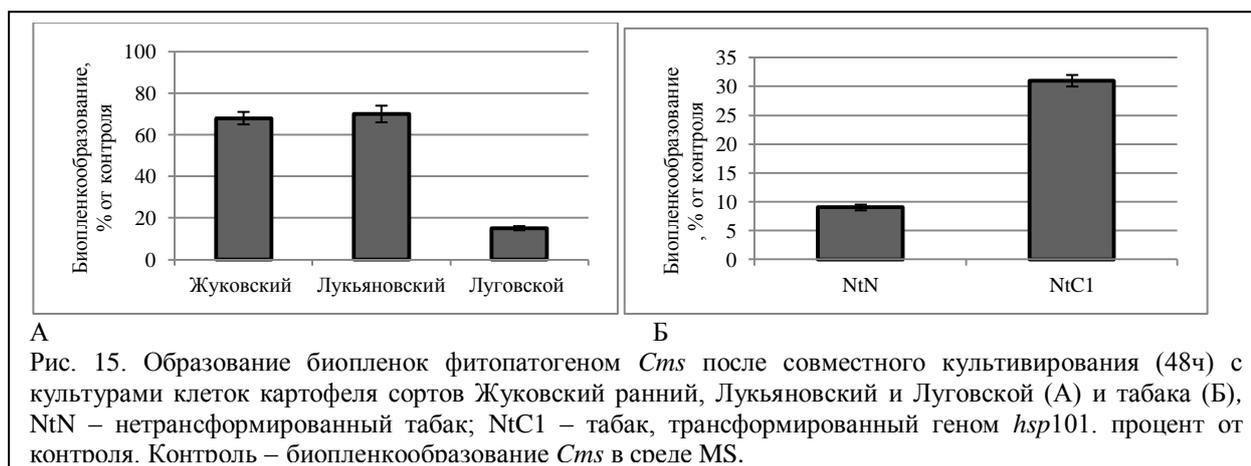


Рис.14. Жизнеспособность растительных и бактериальных клеток при агрегации фитопатогена *Cms* на клетках культуры табака после 24ч совместного культивирования. А – контроль (внесение среды С); Б – культивирование с *Cms*. Флуоресцентная микроскопия (10мг/мл PJ – мертвые клетки красный канал, 10mM FDA – живые клетки зеленый канал).

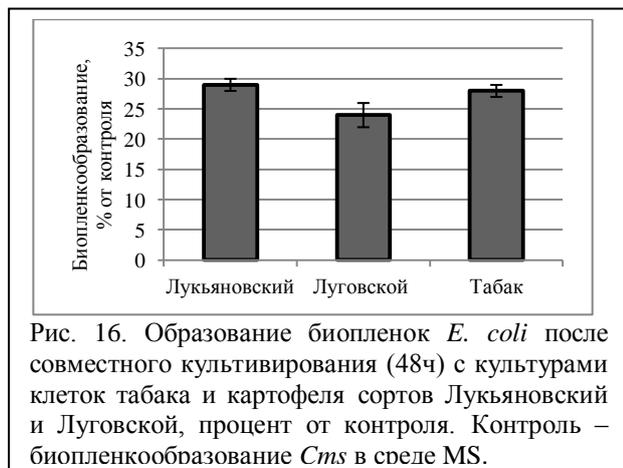
С помощью методов микроскопии было показано, что фитопатоген *Cms* образует биопленки не только в сосудах ксилемы, но и на клетках культуры табака. Флуоресцентная микроскопия с использованием двойного окрашивания флуоресцеин диацетатом (FDA) и пропидий йодидом (PJ) позволила определить жизнеспособность растительных и бактериальных клеток при формировании биопленочных образований (Рис.14.).

При агрегации фитопатогена на растительных клетках происходит гибель клеток, о чем свидетельствует флуоресценция пропидий йодида в красном канале.

Проводили количественную оценку способности *Cms* к биопленкообразованию после ко-культивирования с культурами клеток картофеля, различных по устойчивости сортов с помощью метода статического культивирования и использования красителя Генциан виолет (Рис. 15А.).



Выявлено, что наибольшее образование биопленок *Cms* происходило после взаимодействия бактерий с восприимчивыми (неустойчивыми) к патогену сортами картофеля: Лукьяновский и Жуковский ранний (70% и 67% соответственно). При взаимодействии фитопатогена с устойчивым сортом Луговской биопленкообразование было низкой интенсивности – составляло только 15% от контроля. Следовательно, процесс образования пленок фитопатогеном зависит от влияния растения-хозяина и определяется сортовой устойчивостью картофеля к данному патогену. Культивирование клеток табака и бактерий *Cms* значительно подавляет способность патогена к биопленкообразованию (9% от контроля). Трансформированный геном *hsp101* табак оказывал меньший эффект на снижение способности к образованию биопленок у фитопатогена *Cms* (30%), вероятно за счет низкого уровня генерации пероксида (Рис.15Б.).



При культивировании патогена *E. coli* с культурами клеток табака и картофеля регистрировалось образование биопленок в диапазоне 20-30% от контроля, при этом биопленкообразование не зависело от сорта и вида растений (Рис. 16.).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе изучены ответные реакции на действие *S. michiganensis* ssp. *sepedonicus* у картофеля, как растения-хозяина, и табака, как растения-нехозяина, при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов. При заражении *Sms* листьев табака в месте инфицирования происходит развитие локальных некрозов – проявление реакции СЧ. Выявлено, что реакция эта проявляется как на листьях, так и на корнях растения, где ПКС подвергаются меристематические клетки, гибель которых подавляет апикальное доминирование и активирует точки роста боковой меристемы. В результате этого наблюдалось интенсивное образование боковых корешков, что компенсирует потерю функций апикальной меристемы, заключающихся в регуляции гормонального баланса растений. Данный эффект образования боковых корешков позволяет растению не ограничивать рост корня и дальнейшее поступление воды и питательных веществ. В работе установлено, что развитие реакции СЧ как на листьях, так и на корнях, сопровождается индукцией долговременной СПУ растения к широкому кругу патогенов, в том числе к нетипичному для растений патогену – возбудителю заболеваний человека и животных *E.coli*.

Действие *Sms* на клетки культуры табака приводит к двухфазному накоплению пероксида водорода, остановке движения цитоплазмы, отхождению протопласта от клеточной стенки и быстрой гибели клеток, что свидетельствует об активации механизмов ЕТІ. Табак значительно подавлял способность *Sms* к образованию биопленок, что является свидетельством эффективности иммунных реакций этого растения, так как биопленкообразование является фактором вирулентности фитопатогенов, колонизирующих сосудистую систему растений.

Экзометаболиты *Sms* вызывают у табака развитие реакций ЕТІ, что проявляется в развитии реакции СЧ в месте инокуляции и СПУ в целом растении. При этом в культуре клеток экзометаболиты вызывают значительное накопление АФК (пероксида) и быстро развивающийся процесс гибели клеток. Данные, полученные на двух уровнях организации растительного организма, подтверждают друг друга и позволяют полагать о наличии эффекторов в составе экзометаболитного комплекса возбудителя кольцевой гнили.

У растения-хозяина картофеля происходит развитие защитных реакций на действие *Sms* в зависимости от сортовой устойчивости к данному патогену. В основе устойчивости лежат механизмы специфического уровня врожденного иммунитета, а именно присутствие *R*-генов и их продуктов, способных распознать эффекторную молекулу патогена и своевременно активировать защитные механизмы. Отсутствие СЧ реакции, как фенотипического проявления ЕТІ, у растений картофеля при действии *Sms* говорит о низкой эффективности защитных реакций. В пользу данного предположения свидетельствует низкий уровень генерации пероксида у устойчивого сорта картофеля. При этом прослеживается двухфазность этого процесса,

свидетельствующая об индукции механизмов ЕТІ, но интенсивность данных реакций не достаточна для развития СЧ реакции. У восприимчивого сорта наблюдается незначительное повышение содержания АФК, соответствующее неспецифической реакции на стресс, а также подавление специфических защитных механизмов. Гибель клеток восприимчивого сорта картофеля происходит в результате развития болезни по типу неуправляемого некроза. Резистентность сортов картофеля влияет на способность *Cms* к биопленкообразованию: устойчивый сорт снижает способность патогена к формированию биопленок при совместном культивировании, что вызвано развитием защитных реакций ЕТІ; восприимчивые сорта не подавляют биопленкообразование *Cms*. Влияние растений на биопленкообразование обусловлено отличием в развитии защитных реакций у сортов картофеля, различающихся по степени резистентности к *Cms*.

В защитных реакциях растений на патоген задействовано множество молекулярных участников. Усиление экспрессии БТШ при температурном воздействии приводило к снижению эффективности защитных реакций табака на действие *Cms*, таких как накопление пероксида. Полученные результаты позволяют предполагать участие БТШ в реализации иммунных механизмов в несовместимой системе. Менее интенсивная генерация пероксида, более поздняя остановка движения цитоплазмы при действии *Cms* на культуру трансформированного табака с повышенным синтезом Hsp101 подтверждает это предположение. Менее выраженный ингибирующий эффект на биопленкообразование у трансформированной *hsp 101* культуры табака, по сравнению с нетрансформированной, свидетельствует о меньшей эффективности защитных реакций трансгена. В то же время, сверхэкспрессия Hsp101 не оказывала ни какого эффекта на жизнеспособность культуры табака при культивировании с *E. coli* – нетипичного патогена, который не активирует специфичные защитные реакции в клетках табака. Таким образом, Hsp101 модулируют развитие специфического эффектор-активируемого иммунитета растений, подавляя СЧ реакцию в условиях искусственного повышения их экспрессии в модельной системе.

Повышение температуры культивирования для индукции синтеза БТШ, при инфицировании культуры клеток картофеля восприимчивого сорта способствует большей выживаемости клеток растения. Так как в совместимой системе подавлены механизмы ЕТІ, повышение жизнеспособности клеток растений происходит в результате реализации неспецифических функции комплекса БТШ в качестве белков-шаперонов. Таким образом, БТШ влияют на развитие иммунитета при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов.

Эволюцию взаимоотношений возбудителя кольцевой гнили картофеля с растениями можно представить следующим образом. *Cms*, как и любой микроорганизм, обладает консервативными МАР, которые узнаются паттерн-распознающими рецепторами растительных клеток. Их детекция приводит к

активации паттерн-активируемого неспецифического иммунитета. Считается, что фитопатоген *Sms* произошел от непатогенной эндофитной бактерии, не вызывающей патологический процесс у растений. Вероятно, произошло это в результате приобретения патогеном в ходе эволюции факторов патогенности и эффекторов, способных подавить неспецифические защитные реакции. Результатом взаимодействия обладающей эффекторами бактерии *Sms* и растения является развитие заболевания – совместимый тип взаимоотношений растения и микроорганизма. В изучаемой нами системе этот тип взаимоотношений иллюстрирует пара *Sms* – картофель восприимчивого сорта. Эволюция со стороны растений, а также направленная селекция, привела к появлению относительно устойчивых сортов картофеля. Устойчивость таких сортов можно объяснить развитием защитных реакций, активация которых стала возможной при появлении рецепторов, распознающих эффекторные молекулы патогена. Как показали результаты нашего исследования, интенсивность защитных реакций не достаточна для активации абсолютной устойчивости. Возможно, происходит это за счет присутствия нескольких типов эффекторных молекул (что часто встречается у многих патогенов), некоторые из них могут не распознаваться в растительной клетке, что снижает интенсивность защитных реакций и в итоге приводит к задержке развития заболевания (латентная фаза болезни). У табака, представителя семейства пасленовых, очевидно, присутствуют рецепторы к большему количеству различных эффекторов *Sms*, что определяет развитие защитных реакции большей интенсивности, достаточной для развития СЧ-реакции и СПУ и реализации несовместимого типа взаимоотношений растения и микроорганизма. Данную гипотезу можно проверить с помощью биоинформационного анализа на основании поиска и сравнения предполагаемых генов устойчивости у представителей семейства пасленовых, а также генов вирулентности у представителей рода *Clavibacter*, большинство из которых являются фитопатогенами для растений данного семейства.

## ВЫВОДЫ

1. В системе несовместимых взаимоотношений табак - *Sms* происходит индукция специфического эффектор-активируемого иммунитета, о чем свидетельствует развитие реакции СЧ, а также формирование СПУ

2. Экзометаболиты *Sms* у растений табака определяют индукцию специфического эффектор-активируемого иммунитета с развитием характерных реакций: накопление пероксида водорода, быстрое развитие процесса гибели, развитие реакции СЧ и СПУ. Предполагается, что экзометаболитный комплекс *Sms* содержит ряд молекул эффекторной природы, некоторые из них являются термостабильными.

3. Действие *Sms* на устойчивый сорт картофеля Луговской приводит к двухфазному повышению уровня пероксида водорода, свидетельствующему в

пользу индукции эффектор-активируемого иммунитета, что характеризует несовместимый тип взаимоотношений.

4. У восприимчивых сортов картофеля при действии *Sms* происходит подавление защитных специфических реакций (образование пероксида водорода), а также гибель клеток в результате неуправляемого некротического процесса, что характеризует совместимый тип взаимоотношений.

5. Комплекс БТШ обеспечивает повышение жизнеспособности клеток картофеля при действии *Sms* за счет реализации неспецифических функций в качестве белков-шаперонов. Сверхэкспрессия *Hsp101* в трансформированной культуре табака увеличивает выживаемость клеток при действии *Sms*, принимая участие в регуляции механизмов эффектор-активируемого иммунитета. Таким образом, БТШ влияют на развитие иммунитета при совместимых и несовместимых взаимоотношениях организмов.

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

#### Список работ, опубликованных по теме диссертации

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

1. **Omelichkina Yu.V.** Induction of systemic acquired resistance of plants by exometabolites of causal agent of potato ring rot / Yu.V. Omelichkina, S.V. Boyarkina, T.N. Shafikova // In the World of Scientific Discoveries. – 2014. – № 10(58). – P. 156–167.

2. Шафилова Т.Н. Трансформированная геном *hsp101* культура клеток табака обладает повышенной выживаемостью при заражении *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* / Т.Н. Шафилова, Ю.В. Омеличкина, А.С. Солдатенко, А.Г. Еникеев, Т.В. Копытина, Т.М. Русалёва, О.Д. Волкова // Доклады академии наук. – 2013. – Т.450, № 5. – С. 621–623.

3. **Омеличкина Ю.В.** Ответные реакции растений и культуры клеток табака на заражение *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* / Ю. В. Омеличкина, Т. Н. Шафилова, А. Л. Алексеенко, Ю. А. Маркова, А. Г. Еникеев, Е. Г. Рихванов // В Мире Научных Открытий. – 2010. – № 1-4. – С. 89–94.

4. **Омеличкина Ю.В.** Действие возбудителя кольцевой гнили картофеля на суспензионные культуры клеток табака и картофеля / Ю.В. Омеличкина, Т.Н. Шафилова, Е.Г. Рихванов, А.Г. Еникеев, А.С. Романенко // Известия ИГУ. Серия: Биология. Экология. – 2008. – Т.1, №1. – С. 63–67.

5. Бояркина С.В. Применение метода ПЦР в диагностике возбудителя кольцевой гнили картофеля / С.В. Бояркина, Ю.В. Омеличкина, Т.Н. Шафилова // Известия ИГУ. Серия: Биология. Экология. – 2008. – Т.1, №2. – С. 41–44.

6. **Омеличкина Ю.В.** Ответные реакции растений на воздействие *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* при совместимых и несовместимых взаимоотношениях / Ю.В. Омеличкина, С.В. Бояркина, А.Г. Еникеев, Т.Н. Шафикова // Материалы Всерос. науч. конф. с междунар. участием: Экосистемы озера Байкал и Восточной Азии. – Иркутск: Изд-во ИГУ, 2014. – С. 69 – 72.

7. Бояркина С.В. Сравнительный анализ развития ответных реакций растения на воздействие биотрофных и некротрофных патогенов / С.В. Бояркина, **Ю.В. Омеличкина**, Т.Н. Шафикова // Материалы Всерос. науч. конф. с междунар. участием: Экосистемы озера Байкал и Восточной Азии. – Иркутск: Изд-во ИГУ, 2014. – С. 56 – 58.

8. **Омеличкина Ю.В.** Индукция экзометаболитами *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* системной приобретенной устойчивости растений / Ю.В. Омеличкина, А.С. Солдатенко, С.В. Бояркина, Т.Н. Шафикова // сборник трудов международного симпозиум «Биохимия – основа наук о жизни». – Казань: ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 2013. – С. 111–112.

9. Шафикова Т.Н. Влияние растений на образование биопленок *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* / Т.Н. Шафикова, О.А. Орлова, **Ю.В. Омеличкина**, А.Г. Еникеев, О.Д. Волкова // сборник трудов международного симпозиум «Биохимия – основа наук о жизни». – Казань: ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 2013. – С. 139–140.

10. Алексеенко А.Л. Особенности взаимодействия растений с *Escherichia coli* / А.Л. Алексеенко, Ю.А. Маркова, **Ю.В. Омеличкина**, Т.Н. Шафикова, А.С. Романенко // VII Съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» и Международная научная школа «Инновации в биологии для развития биоиндустрии сельскохозяйственной продукции». Материалы докладов (в двух частях). Ч.1. Нижний Новгород, 2011. – С. 40–42.

11. Алексеенко А.Л. Особенности взаимодействия условно-патогенной *Escherichia coli* с растениями / А.Л. Алексеенко, Ю.А. Маркова, **Ю.В. Омеличкина** и др. // Проблемы экологии: чтения памяти М. М. Кожова: тез. докл. междунар. науч. конф. и междунар. шк. для молодых ученых. – Иркутск: Изд-во Иркут. гос. ун-та, 2010. – С. 314

12. **Омеличкина Ю.В.** Развитие локального и системного защитного ответа у растений и культуры клеток табака на заражение *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* / Ю.В. Омеличкина, А.С. Солдатенко, Т.Н. Шафикова // Актуальные проблемы права, экономики и управления: Сборник статей международной научно-практической конференции – Иркутск: РИО САПЭУ, 2010. – Вып. VI., Т II. – С. 230–233.