

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Ким Дебора

**Структура гликополимеров клеточной стенки как
хемотаксономический признак актинобактерий рода *Clavibacter***

1.5.11. Микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Тульская Елена Михайловна

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ЧАСТЬ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
Глава I. Гликополимеры клеточных стенок грамположительных бактерий: структуры и функции	11
1.1. Гликополимеры клеточной стенки грамположительных бактерий и их классификация.....	12
1.1.1. Фосфатсодержащие гликополимеры.....	13
1.1.2. Бесфосфатные гликополимеры	16
1.2. Биологическая роль связанных с пептидогликаном гликополимеров клеточных стенок актинобактерий.....	18
1.3. Гликополимеры клеточных стенок как хемотаксономический признак в таксономии актинобактерий.....	24
Глава II. Актинобактерии рода <i>Clavibacter</i> : таксономия, образ жизни, факторы патогенности, меры борьбы	29
2.1. Таксономия и филогения рода <i>Clavibacter</i>	29
2.2. Некоторые характеристики представителей рода <i>Clavibacter</i>	32
2.3. Экология представителей рода <i>Clavibacter</i>	33
2.3.1. Среда обитания.....	34
2.3.2. Фитопатогенность	35
2.3.3. Симптомы заражения растения-хозяина	38
2.3.4. Сапрофитные клавибактерии	38
2.4. Факторы патогенности у представителей рода <i>Clavibacter</i>	39
2.4.1. Роль экзополисахаридов в клетке	39
2.4.2. Факторы вирулентности, кодируемые плазмидой	41
2.4.3. Модуляция вирулентности	44
2.4.4. Диагностика и биоконтроль	45
2.4.5. Способы борьбы с фитопатогенами рода <i>Clavibacter</i>	46
ЧАСТЬ II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	49
Глава III. Объекты и методы исследования	49
3.1. Объекты исследования и накопление биомассы актиномицетов	49
3.2. Получение клеточных стенок	51
3.3. Выделение препаратов гликополимеров из клеточных стенок.....	51
3.4. Очистка и разделение гликополимеров	51
3.4.1. Ионнообменная хроматография гликополимеров.....	51
3.5. Кислотный гидролиз клеточной стенки и препаратов гликополимеров	52
3.6. Нисходящая хроматография и электрофорез на бумаге	52
3.7. Определение фосфора нуклеиновых кислот	53

3.8. Моносахаридный анализ полисахаридов	54
3.9. Определение абсолютной конфигурации моносахаридов.....	54
3.10. Методы ЯМР-спектроскопии для изучения первичной структуры гликополимеров.....	54
3.10.1. Условия проведения ЯМР-эксперимента.....	55
Глава IV. Моносахаридный состав и структуры гликополимеров клеточных стенок изучаемых актинобактерий ¹	56
4.1. Изучение клеточных стенок исследуемых актинобактерий.....	56
4.2. Гликополимеры клеточных стенок <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1403 ^Т	60
4.2.1. Изучение гликополимеров клеточной стенки химическими методами.....	60
4.2.2. ЯМР исследование структур полисахаридов 1 и 2	61
4.3. Гликополимеры клеточных стенок <i>C. insidiosus</i> ВКМ Ас-1402 ^Т и <i>C. nebraskensis</i> ВКМ Ас-1404 ^Т	68
4.3.1 Изучение клеточных стенок и гликополимеров из нее химическими методами.....	68
4.3.2. ЯМР-исследование структур полисахаридов 1 и 2.....	69
4.4. Гликополимеры клеточных стенок <i>Clavibacter</i> ВКМ sp. Ас-1371, <i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1372, <i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1374.....	73
4.4.1. Предварительное изучение клеточных стенок штаммов ВКМ Ас-1371, ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374 и препаратов гликополимеров из них химическими методами	74
4.4.2. Предварительное ЯМР-исследование препаратов I и II из штамма ВКМ Ас-1371	74
4.4.3. Предварительное ЯМР исследование препаратов II из штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374	76
4.4.4. ЯМР-исследование полисахаридов 1 и 2 из штамма ВКМ Ас-1371	76
4.4.6. ЯМР-исследование полисахаридов 1 и 2 препаратов II из штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374.....	82
4.5. Гликополимеры клеточных стенок <i>C. tessellarius</i> ВКМ Ас-1406 ^Т	89
4.5.1 Изучение клеточных стенок и гликополимеров из нее химическими методами.....	90
4.5.2 ЯМР исследования структур полисахаридов 1 и 2	90
4.6. Гликополимеры клеточных стенок <i>C. phaseoli</i> ВКМ Ас-2641 ^Т и <i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-2555.....	95
4.6.1. Предварительное изучение клеточных стенок из ВКМ Ас-2641 ^Т и ВКМ Ас-2555, а также гликополимеров из них химическими методами	96
4.6.2. Предварительное ЯМР-исследование препаратов из штаммов ВКМ Ас-2641 ^Т и ВКМ Ас-2555	96
Глава V. Обсуждение результатов.....	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
ВЫВОДЫ	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	114

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Бактериальная клеточная стенка представляет собой весьма сложную биологическую структуру, которая изолирует и одновременно защищает внутреннее содержимое клетки от внешнего воздействия окружающей среды, обеспечивает обмен веществ и вместе с тем – обмен информацией микробной клетки с внешней средой (Chapot-Chartier and Kulakauskas, 2014; Seltmann and Holst, 2014). Структура клеточной стенки грамположительных бактерий достаточно сложна, поскольку образует комплексную систему макромолекул (Silhavy et al., 2010). Среди последних – пептидогликан, окружающий цитоплазматическую мембрану, который декорирован другими гетерополимерами (Scheffers and Pinho, 2005).

Присутствие различных по составу и строению гетерополимеров позволяет отличить прокариоты от эукариотических организмов, а также дифференцировать бактерии на грамположительные и грамотрицательные.

Типы и структурные вариации пептидогликана хорошо известны как важнейшие хемотаксономические признаки таксонов актинобактерий разного уровня (Schumann, 2011). Вторичные гликополимеры бактерий в сравнении с пептидогликанами являются менее изученными в таксономическом аспекте. Однако имеющиеся в литературе сведения указывают на то, что состав, структуры и отдельные структурные компоненты гликополимеров могут быть также специфичными для видов, родов и высших таксонов актинобактерий (Naumova et al., 2001; Schumann et al., 2009; Evtushenko, Ariskina, 2015; Nouioui et al., 2018; Shashkov et al., 2020; Potekhina et al., 2021).

Хемотаксономические признаки, такие как «дифференцирующие сахара целых клеток» и «состав сахаров клеточной стенки», отражающие, в том числе состав структурных компонентов гликополимеров клеточной стенки, используются в систематике различных групп актиномицетов с 60-х годов прошлого века (Cummins, 1962; Lechevalier, Lechevalier, 1970; Goodfellow, Jones, 2012). Для видов рода *Clavibacter* в качестве диагностических сахаров указывались, в частности, галактоза, манноза, рамноза и фукоза (Davis et al., 1984), в то время как гликополимеры клеточных стенок у представителей рода ранее **не были изучены**.

Таким образом, выявление и описание гликополимеров у не изученных в этом отношении актинобактерий представляют интерес в связи с оценкой их структурного разнообразия; распространения у различных микроорганизмов; способствует пониманию механизмов взаимодействия бактерий внутри микробного сообщества и с внешней средой, включая высшие организмы (например, с организмом хозяина при патогенезе), а также в связи с возможностью их применения в хемотаксономии актинобактерий.

В рамках изучения биологического разнообразия актинобактерий, а также структурного разнообразия природных биополимеров, была поставлена работа по изучению углеводного состава клеточных стенок фитопатогенных подвигов (видов) рода *Clavibacter*, не изученных в этом отношении. Актинобактерии рода *Clavibacter* представляют собой группу грамположительных актинобактерий (семейство *Microbacteriaceae*, порядок *Micrococcales*, класс *Actinomycetes*). Восемь известных видов рода – специализированные возбудители сосудистых заболеваний растений, три из которых являются карантинными объектами во многих странах мира (<https://lpsn.dsmz.de/genus/clavibacter/> 2024; <https://gd.eppo.int>, 2024; Li et al., 2018). Кроме того, были предложены к изучению претенденты на новые виды рода *Clavibacter*, включая непатогенные эндофиты, что подчеркивает генетические и экологические различия внутри этого рода (Starodumova et al., 2018). Ранее гликополимеры клеточных стенок представителей этого рода не были изучены.

Цель и задачи работы

Целью работы явилось изучение моносахаридного состава и структур гликополимеров клеточных стенок некоторых представителей рода *Clavibacter* и оценка таксономической значимости признака «состав и структура гликополимеров клеточных стенок» для бактерий этого рода.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить клеточные стенки достаточной степени чистоты из клеток изучаемых актинобактерий рода *Clavibacter*.
2. Выявить в составе клеточных стенок набор моносахаридов, органических кислот, наличие/отсутствие фосфатсодержащих гликополимеров.
3. Получить препараты гликополимеров из клеточных стенок методами, обеспечивающими наиболее полное их извлечение.
4. Проанализировать полученные препараты гликополимеров клеточных стенок химическими методами (наличие/отсутствие фосфатсодержащих гликополимеров, моносахаридный состав, присутствие органических кислот, установление конфигурации моносахаридов).
5. Провести разделение гликополимеров методами гель-хроматографии.
6. Изучить структуры гликополимеров методами ЯМР-спектроскопии, проанализировать полученные данные, сравнив их с уже имеющимися в базах данных.

7. Провести сравнительный анализ структур гликополимеров у всех исследованных штаммов и сделать заключение о возможности их использования в таксономии бактерий рода *Clavibacter*.

Объекты исследования

Объектами исследования являлись 9 штаммов актинобактерий из рода *Clavibacter* (семейство *Microbacteriaceae*): пять типовых штаммов (фитопатогены *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T, *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T и *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T), и четыре штамма-претендента на новый вид (эндофиты *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371, *Clavibacter* sp ВКМ Ас-1372, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374).

Предмет исследования

Предметом исследования явилось сравнительное изучение химического состава и структур гликополимеров клеточных стенок вышеперечисленных актинобактерий.

Научная новизна исследования

• **Впервые** изучены структуры гликополимеров пяти типовых штаммов (*C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T, *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T и *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T), и четырех штаммов-претендентов на новый вид (*Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371, *Clavibacter* sp ВКМ Ас-1372, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374) определен и **уточнён состав** моносахаридов их клеточных стенок.

• **Впервые** установлено, что в состав клеточных стенок всех изучаемых актинобактерий входят по два бесфосфатных гликополимера, один из которых – пируватсодержащий галактоманнан. Во всех изученных клеточных стенках выявлен нейтральный (1→6)-связанный галактофуранан. Структуры галактофурананов различаются по топологии и моносахаридному составу бокового олигосахаридного остатка.

Все установленные в работе структуры гликополимеров описаны **впервые** для прокариотов.

• **Впервые** проведен сравнительный анализ состава и структур гликополимеров клеточных стенок представителей различных видов рода *Clavibacter* (результаты настоящей работы) с литературными данными (Li et al., 2018) по средней идентичности нуклеотидов (ANI) и цифровой ДНК-ДНК гибридизации (dDDH). Показано, что данные наших исследований хорошо согласуются с генетическими данными и полученными ранее фенотипическими

характеристиками этой группы фитопатогенных актинобактерий, что поддерживает реклассификацию каждого из подвигов *C. michiganensis* до видового статуса.

- **Впервые** установлено, что состав и структуры гликополимеров и их структурные компоненты (определяемые в кислотных гидролизатах клеточных стенок) могут служить хемотаксономическими маркерами рода и видов *Clavibacter*.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования

Полученные данные имеют важное теоретическое значение, поскольку расширяют представления о структурном разнообразии поверхностных гликополимеров и биосинтетическом потенциале микроорганизмов, в частности, актинобактерий. Кроме того, полученные данные о химическом составе и особенностях строения полимеров клеточной стенки могут служить основой для дальнейших исследований молекулярных механизмов взаимодействия бактерий с клеткой растения-хозяина и разработки методов борьбы с фитопатогенами.

Полученные данные могут быть использованы для создания более полной системы идентификации патогенов растений. Признак “наличие и структура гликополимеров клеточной стенки”, а также таксономическая специфичность некоторых структурных элементов, могут быть успешно применены в повседневной микробиологической практике при идентификации и описании новых представителей рода *Clavibacter*.

Результаты проведенных исследований пополняют базу данных Carbohydrate Structure Database (CSDB, веб-портал <http://csdb.glycoscience.ru> 2024) по углеводам прокариот, грибов и растений, что внесёт определённый вклад в гликологию, гликоинформатику и химическую микробиологию, и может быть использовано при анализе структур близких биополимеров другими исследователями.

Методология и методы исследования

Автором выполнены анализ современной литературы по исследуемой теме на русском и английском языках. На основании данных литературы было проведено планирование экспериментов. В работе использовали современные микробиологические и физико-химические методы. Полученные данные были собраны, проанализированы и изложены в тексте данной работы.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Все исследованные штаммы рода *Clavibacter* содержат в клеточных стенках галактозу и маннозу. Штаммы *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T содержат также глюкозамин; штаммы *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T и *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T – фукозу и рамнозу; штаммы *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374 – рибозу.

2. Клеточные стенки всех изученных представителей рода *Clavibacter* содержат по два бесфосфатных гликополимера с новыми, не описанными ранее, структурами. Первый – идентичный для всех штаммов пирувилированный (частично ацетилированный у некоторых штаммов) галактоманнан, второй – (1→6)-связанный галактофуранан, различающийся у разных штаммов структурой ди-, три- или тетрасахаридных заместителей.

3. Пирувилированный галактоманнан и (1→6)-связанный β-D-галактофуранан могут рассматриваться как признак, характерный для представителей рода *Clavibacter*.

4. Признаком, дифференцирующим виды *Clavibacter* являются особенности строения боковых ди- три- и тетрасахаридных заместителей в структуре галактофуранана.

Степень достоверности и апробация результатов работы

При выполнении диссертационного исследования использованы современные и адекватные поставленным задачам микробиологические, физико-химические методы. Достоверность представленных данных подтверждается достаточным количеством повторностей при проведении экспериментов. При написании обзора литературы и обсуждении результатов использованы современные источники по теме исследования в рецензируемых журналах. Достоверность полученных результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и международных журналах. Результаты диссертации были представлены на следующих международных и российских конференциях: 1) «1-й Российский микробиологический конгресс» (Пушино, 2017); 2) «Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019); 3) «Ломоносов» (Москва, 2020, 2021); 4) «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пушино, 2021); 5) «3-й Российский микробиологический конгресс» (Псков, 2021).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 5 статей в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова. В статьях, опубликованных в соавторстве, существенный и принципиальный вклад принадлежит соискателю.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 126 страницах и состоит из введения, пяти глав, включающих: обзор литературы (главы I и II); краткой характеристики объектов и методов исследований (глава III); изложения результатов собственных исследований (глава IV) и их обсуждения (глава V), а также общего заключения и выводов. Работа содержит 16 таблиц, 50 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 143 ссылки (из них 129 на английском языке).

Личный вклад соискателя

Личное участие автора заключалось в сборе и анализе литературных источников по теме исследования, определении цели работы, выполнении экспериментальных исследований, включая получение клеточных стенок, анализ клеточных стенок, выделение препаратов гликополимеров из клеточных стенок, их очистка и анализ гликополимеров клеточных стенок, пробоподготовка к инструментальным анализам (ГЖХ, ЯМР-спектроскопия), обобщении результатов и сравнении полученных данных с опубликованными в литературе, написании статей и тезисов, представлении результатов работы на конференциях.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность всему профессорско-преподавательскому составу кафедры микробиологии за знания и навыки, которые удалось приобрести за время обучения.

Автор благодарит: сотрудников ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН, отдел «Всероссийская коллекция микроорганизмов» д.б.н. Евтушенко Людмилу Ивановну за ценные консультации и к.б.н. Дорофееву Любовь Владимировну за подбор штаммов и выращивание биомассы изучаемых актинобактерий и сотрудников Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН – д.х.н. Александра Степановича Шашкова, к.х.н. Андрея Сергеевича Дмитренко, к.х.н.

Софию Николаевну Сенченкову и к.х.н. А.В. Перепелова за подготовку образцов к ЯМР-спектроскопическому исследованию, а также съемку и расшифровку ЯМР-спектров; сотрудников группы биохимиков кафедры микробиологии д.б.н. Наталию Викторовну Потехину и к.б.н. Галину Матвеевну Стрешинскую за доброжелательное отношение и готовность в любой момент оказать помощь.

Автор благодарит научного руководителя выполненной работы д.б.н. Елену Михайловну Тульскую за чуткое руководство, внимательное отношение, постоянный контроль за выполняемой работой.

ЧАСТЬ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава I. Гликополимеры клеточных стенок грамположительных бактерий: структуры и функции

Большинство прокариотических клеток окружены клеточной стенкой, которая поддерживает форму клетки, защищает цитоплазматическую мембрану от осмотического разрушения. Кроме того, клеточная стенка выполняет и другие важные функции, необходимые для жизнедеятельности клетки (Seltmann and Holst, 2014).

Клеточные стенки состоят из гетерополимеров различных классов, что является важным отличительным признаком между прокариотами и эукариотами, а также позволяет классифицировать эубактерии на грамположительные и грамотрицательные (Woese, 1987). Среди гетерополимеров особое положение занимают гликополимеры, содержащие углеводные остатки (Stefanović et al., 2021). Их можно разделить на три основные группы:

1. Полимеры, гликановые цепи которых ковалентно связаны друг с другом, образуя большой макромолекулярный слой, характерны преимущественно для клеточных стенок грамположительных бактерий. Типичные представители данной группы – пептидогликан, а также присоединенные к нему другие гликополимеры, например, тейхоевые, тейхуроновые кислоты, нейтральные и кислые полисахариды. В тейхоевых кислотах и гликозил-1-фосфатных полимерах, повторяющиеся звенья связаны фосфодиэфирными связями.

2. «Бактериальные амфифилы» – группа полимеров, которые содержат углеводные цепи, связанные с липидной частью. Примерами таких полимеров являются липополисахариды грамотрицательных бактерий, липотейхоевые кислоты и липогликаны грамположительных бактерий, амфифилы, заякоренные гидрофобной частью молекулы в цитоплазматической мембране, и имеющие гидрофильную углеводную часть, расположенную в толще пептидогликана.

3. Экзополисахариды, синтезируемые как грамположительными, так и грамотрицательными бактериями. К ним относятся капсульные и поверхностные полисахариды, которые не соединены с пептидогликаном и выделяются в среду (Whitfield et al., 2020).

В область наших исследований входят гликополимеры клеточных стенок, ковалентно связанные с пептидогликаном, обнаруженные у актинобактерий, принадлежащих к классу *Actinomycetes* (грамположительные микроорганизмы, имеющие высокий процент Г+Ц в ДНК).

1.1. Гликополимеры клеточной стенки грамположительных бактерий и их классификация

Пептидогликан – основной компонент грамположительных клеточных стенок. Защита клетки от внешних механических повреждений, поддержание её формы, путём противодействия внутреннему тугору живой клетки, способствование диффузии веществ в клетку и из нее, участие в процессах морфогенеза клетки, защита клетки от внешних литических веществ и некоторых положительно заряженных антибиотиков – краткий перечень жизненно важных процессов, в которых основная роль отводится пептидогликану (Scheffers and Pinho, 2005).

Помимо пептидогликана, клеточные стенки грамположительных бактерий содержат некоторое количество полисахаридов и белков (Seltman and Holst, 2014). Цепи гликополимеров и мембранно связанных липотейхоевых кислот пронизывают всю клеточную стенку и могут выходить на поверхность клетки (Silhavy et al., 2010; Chapot-Chartier and Kulakauskas, 2014).

Долгое время считалось, что все полимеры, ковалентно связанные с пептидогликаном, играют незначительную роль в функционировании клеточной стенки, поэтому их называли «вторичными» или «неклассическими» полимерами клеточной стенки (Schäffer and Messner, 2005).

В настоящее время, опираясь на обширные сведения, накопленные за последние 40 лет, стало ясно, что эти соединения играют важную роль в функционировании, физиологии и вирулентности бактериальных клеток. Однако, сам термин «вторичные» полимеры остался и широко используется в литературе (Weidenmaier and Peschel, 2008).

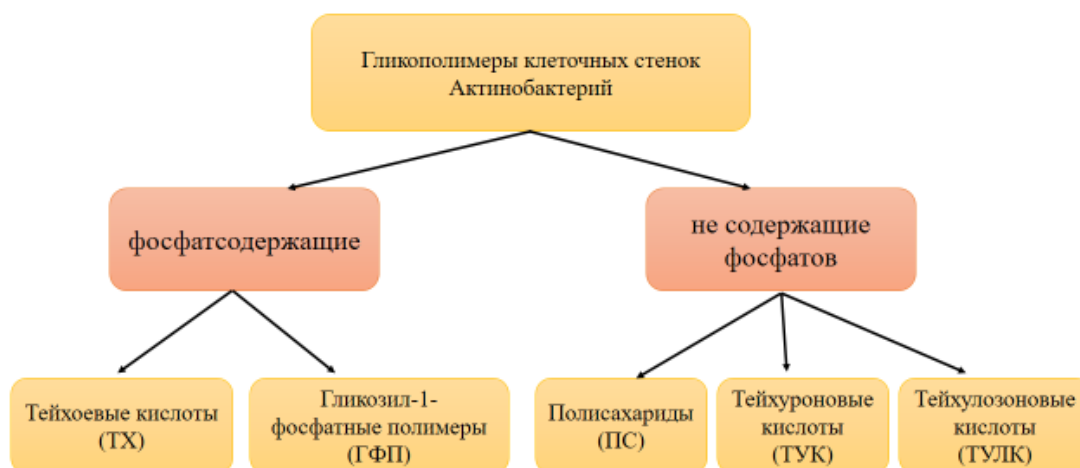


Рисунок 1. Схема: гликополимеры клеточных стенок грамположительных бактерий.

В настоящее время у актинобактерий и других грамположительных бактерий известны следующие гликополимеры клеточных стенок: фосфатсодержащие (тейхоевые кислоты, поли(гликозил-1-фосфаты) и бесфосфатные (тейхуроновые и тейхулозоновые кислоты, кислые и нейтральные полисахариды) (Рисунок 1).

1.1.1. Фосфатсодержащие гликополимеры

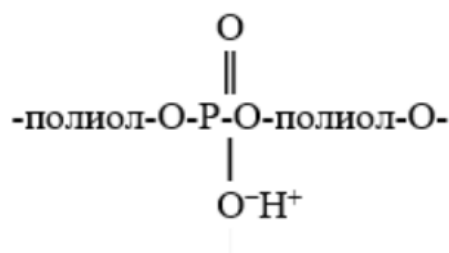
Отрицательный заряд фосфатсодержащих гликополимеров обеспечивается присутствием в их структуре остатков фосфорной кислоты.

1.1.1.1. Тейхоевые кислоты

Тейхоевые кислоты были открыты в 1950 х годах Джеймсом Баддли и его сотрудниками, и почти в то же время И. Б. Наумова и академик А. Н. Белозерский, при исследовании нуклеотидов у стрептомицетов, обнаружили наличие «лишнего фосфора», принадлежащий тейхоевой кислоте. С момента открытия тейхоевых кислот в клеточных стенках бацилл, стафилококков и лактобацилл список организмов, в которых были обнаружены эти уникальные соединения, значительно расширился. Их обнаружили у многих представителей родов *Actinomycetes* и родственных им организмов, а также у *Streptococcus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria*, *Clostridium* (Potekhina et al., 2011).

В последующие десятилетия было выяснено, что эти полимеры играют важную роль в функционировании клеточных стенках грамположительных бактерий. Работы Заслуженного деятеля науки, профессора И.Б. Наумовой и возглавляемой ею междисциплинарной исследовательской группы сотрудников, проводимые в течение многих лет, внесли значительный вклад в изучение распространения тейхоевых кислот у представителей порядка *Actinomycetales*, а также в детализацию структур этих полимеров, особенно в связи с применением ЯМР-спектроскопических методов исследования (Наумова, 1964; 1973; 1979; Naumova et al., 1980; Евтушенко и др., 1984; Наумова и Шашков, 1997; Naumova et al., 2001).

Основными компонентами тейхоевой кислоты являются полиол (многоатомный спирт) и остатки фосфорной кислоты, причем остатки фосфорной кислоты связывают остатки полиола в цепи различной длины фосфодиэфирными связями и определяют их кислотные свойства:



К собственно тейхоевым кислотам относится класс полимеров, которые содержат в качестве повторяющейся единицы цепи полиолфосфатов (Brown et al., 2013).

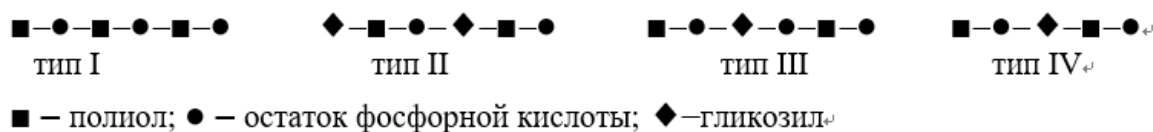


Рисунок 2. Структурные типы тейхоевых кислот: тип I – поли(полиолфосфат); тип II – поли(гликозилполиолфосфат); тип III – поли(полиолфосфат-гликозилфосфат); тип IV – смешанный тип, поли(полиолфосфат-гликозилполиолфосфат) (Потехина, 2006)

Возможны и другие вариации структур тейхоевых кислот, в интегральную цепь которых, кроме полиольных остатков, входят гликозильные. Тейхоевые кислоты делятся на 4 структурных типа, каждый из которых содержит несколько подтипов, в зависимости от элементов, составляющих фосфодиэфирную связь (Potekhina et al., 2011).

Тейхоевые кислоты имеют широкое структурное разнообразие, которое обусловлено различной природой остатков полиола и сахаров (аминосахаров), которые могут входить в интегральную часть полимерной цепи или быть ее боковыми ответвлениями, присоединенными гликозидными связями разной конфигурации к полиольным остаткам; различным положением фосфодиэфирных связей; положением связей между сахарными компонентами в олигосахаридных заместителях; различными О-ацильными остатками. А также существуют цепи и без гликозильных или ацильных заместителей (Тульская, 2009; Potekhina et al., 2011).

Поли(полиолфосфатные) тейхоевые кислоты – I тип. Тейхоевые кислоты этого типа наиболее распространены. Этот тип характеризуется широким разнообразием полиолов, гликозильных и ацильных заместителей. Фосфодиэфирные связи соединяют полиольные остатки в цепочки линейной структуры. Полиольные остатки обычно имеют различные заместители: гликозильные (глюкоза, галактоза, рамноза и N-ацетилированные аминоксахара) или ацильные (O-D-аланил, O-L-лизил, O-ацетил, O-сукцинил, O-L-глутаминил или пируват-кетальные группы). Разновидности каждого подтипа тейхоевой кислоты основаны на вариации перечисленных заместителей в составе структуры, а также положении и расположении гликозильных связей. Встречаются и незамещенные цепи тейхоевых кислот. Наиболее широко распространены глицерин- и рибиттейхоевые кислоты. Маннит-, эритрит-, арабит- и 6-О-метилгалактитсодержащие полимеры выявлены в единичных случаях (цит. по Тульская, 2009).

Поли(гликозилполиолфосфаты) – II тип. Во II типе тейхоевых кислот в состав интегральной цепи входят полиолы и остатки сахаров. Фосфодиэфирная связь всегда локализуется по гидроксильным группам при С-3 глицерина или С-5 рибита, как следует из путей

биосинтеза глицерин- и рибиттейхоевых кислот, соответственно (Baddiley, 1972; Archibald, 1974; Fischer, 1988).

Полимеры этого типа делятся на несколько подтипов в зависимости от природы полиола (глицерин или рибит) и сахара, локализации связи между сахаром и полиолом и фосфодиэфирной связи на сахарном остатке. Так фосфодиэфирная связь может осуществляться по С-3, С-4 и С-6 сахарного остатка, а гликозидная связь в основной цепи полимера обычно связывает гликозидный гидроксил сахарного и С-1 полиольного остатков, однако иногда может осуществляться по С-2 глицерина или С-2,4 рибита (Brown et al., 2013).

Поли(гликозилфосфат-полиолфосфаты) – III тип. Данный тип тейхоевых кислот относится к смешанным полимерам и содержит элементы полиолфосфатов (*I тип*) и гликозил-1-фосфатов. Такой тип тейхоевых кислот обнаружен в клеточных стенках *Staphylococcus lactis* 13, а также в клеточных стенках других стафилококков *S. hyicus* subsp. *hyicus* NCTC 10350 и *S. sciuri* DSM 20352 (цит. по Тульская, 2009).

Поли(полиолфосфат-гликозилполиолфосфат) – IV тип. (Рисунок 2). Этот тип тейхоевых кислот выявлен в начале 90-х годов (Naumova et al., 2001). Он включает в себя полимеры смешанного типа, содержащий в структуре, как элементы полифосфатов (*I тип*), так и элементы поли(гликозилполиолфосфатов) (*II тип*). Тейхоевые кислоты подобной структуры найдены только у некоторых представителей рода *Nocardiosis*, а именно у группы *N. dassonvillei*, в которую входят виды *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei*, *N. synnematoformans*, *N. halotolerans* (Tul'skaya et al.2014)



Итак, тейхоевые кислоты полиолфосфатной природы (*I тип*) являются наиболее распространенными типами полимеров, характеризуется широким разнообразием полиолов, гликозильных и ацильных заместителей. Тейхоевые кислоты II, III и IV типов содержат углеводный компонент в интегральной цепи полимера, и это является их общим свойством. Среди них тейхоевые кислоты поли(гликозилполиолфосфатной) природы (*II тип*), имеющие широкое разнообразие структур, наиболее распространены, и включают полимеры шести подтипов. В качестве сахарных компонентов в интегральной цепи они в основном содержат глюко- и галактопиранозные остатки в β - и α -конфигурации, иногда в виде дисахарида линейной или разветвленной структуры. Кроме того, в составе тейхоевых кислот II типа найдены остатки маннозы, рибофуранозы и галактофуранозы, в редких случаях – остатки D-аланина, фосфорилхолина и органических кислот.

1.1.1.2. Гликозил-1-фосфатные полимеры

В некоторых клеточных стенках грамположительных бактерии содержатся анионные полимеры, в которых повторяющиеся моно- или олигосахаридные звенья связаны фосфодиэфирными связями. Собственно остатки фосфорной кислоты и создают отрицательный заряд этих полимеров. Эти полимеры локализованы в клеточной стенке и соединены с пептидогликаном ковалентной связью, как и тейхоевые кислоты. Таким образом, гликозил-1-фосфатные полимеры являются аналогами тейхоевых кислот с сахарными остатками, вместо полиольных остатков. Эти полимеры не так широко распространены среди клеточных стенок грамположительных бактерий (Shashkov et al., 2016).

1.1.2. Бесфосфатные гликополимеры

К бесфосфатным гликополимерам клеточных стенок грамположительных бактерий относятся тейхуроновые, тейхулозоновые кислоты и полисахариды.

1.1.2.1. Тейхуроновые кислоты

Тейхуроновые кислоты (ТУК) – анионные углеводсодержащие полимеры, которые содержатся в клеточных стенках грамположительных бактерий. Они содержат карбоксильные группы остатков уроновых кислот, придающие им кислотные свойства, которые совместно с аминасахарами и нейтральными моносахаридами объединяются в полимер гликозидными связями (Тульская и др., 2011). Остатки органических кислот, включая аминокислоты, и глицерофосфата, также могут присутствовать в этих полимерах (Ward, 1981). По сравнению с тейхоевыми кислотами, тейхуроновые кислоты не так широко распространены в клеточных стенках исследованных актинобактерий. Во многих случаях биосинтез ТУК связан с дефицитом фосфора в питательной среде. Структуры тейхуроновых кислот, выявленных на сегодняшний день, разнообразны, хотя и не всегда разрешены полностью. Структурные вариации зависят от 1) вида остатков уроновых кислот (глюкуроновые, галактуриновые, мануриновые, а также их амино- и диаминопроизводные); 2) вида сахарных остатков (идентифицировано до 13 различных углеводных компонентов), входящих в состав этих полимеров; 3) количества гликозильных остатков, входящих в состав повторяющегося звена и числа мономерных звеньев; 4) форма повторяющегося звена может быть линейной или разветвленной структуры; 5) от наличия в составе повторяющегося звена остатков органических кислот, аминокислот или глицерофосфата; 6) от типа гликозидных связей внутри повторяющегося звена (обычно это (1→3)- и (1→4)-связи, реже (1→6)-гликозидные связи и практически не встречаются (1→2)-связи) (Тульская и др., 2011). Недавно при исследовании гликополимеров клеточных стенок представителей порядка

Micrococcales были обнаружены новые структуры ТУК. У *Promicromonospora* sp. ВКМ Ас-1028 выявлена ТУК с кетально связанной пировиноградной кислотой в качестве ацильного заместителя на глюкуроновой кислоте (Dmitrenok et al., 2017). У представителей рода *Rathayibacter* (типичные штаммы) обнаружены ТУК, в составе которых кроме глюкуроновой или галактурановой кислот, выявлены моносахариды (D- или L-Rhap, D-Manp, D-Glcp и D-Galp), пировиноградная и молочная кислоты, что усиливает анионные свойства этих полимеров (Shashkov et al., 2021; Potekhina et al., 2023).

1.1.2.2. Тейхулозоновые кислоты

Тейхулозоновые кислоты (ТУЛК) – это гликополимеры клеточных стенок грамположительных бактерий, обязательным компонентом которых являются альдулозоновые кислоты. Известные к настоящему времени ТУЛК представляют собой гликополимеры двух типов, содержащие остатки или Kdn (3-дезоксид-D-глицеро-D-галакто-нон-2-улозоновой кислоты), или Pse (N,N'-диацилпроизводных 5,7-диамино-3,5,7,9-тетрадезоксид-L-глицеро-L-манно-нон-2-улозоновой кислоты) (Тульская и др., 2011).

ТУЛК с остатками Kdn. Основная цепь ТУЛК этого типа состоит из остатков, соединенных α - или β -(2→4)-гликозидными связями и замещенных по О-8 и/или О-9 остатками глюкопиранозы, галактопиранозы, 3-О-метилгалактопиранозы или N-ацетилглюкозамина. Описаны как олигомеры, так и полимеры Kdn.

Недавно были найдены новые по структуре Kdn-содержащие ТУЛК. В основной цепи полимеров остатки Kdn гликозилированы либо по О-9 остатками галактозы, либо по О-8 остатками глюкозы. В свою очередь, остатки шестиуглеродных моносахаридов в цепи гликозилированы остатками Kdn либо по О-6, либо по О-3 (Shashkov et al., 2012; 2016 а; 2016 б). Также впервые в природе описана структура ТУЛК из клеточной стенки *Promicromonospora citrea* ВКМ Ас-665^T, где остаток Kdn нес по положению О-7, 9 кетально связанную пировиноградную кислоту, а остаток глюкозы – по положению О-3 – остаток серной кислоты (Dmitrenok et al., 2017).

ТУЛК с остатками Pse (N,N'-диацил-производных 5,7-диамино-3,5,7,9-тетра-дезоксид-L-глицеро-L-манно-нон-2-улозоновой кислоты, Тульская и др., 2011). ТУЛК этого типа обнаружены в клеточных стенках представителей рода *Kribbella* и *Actinoplanes utahensis* ВКМ Ас-674^T. В основной цепи всех изученных полимеров присутствуют остатки Pse, ацилированные по N-7 остатками 4-гидрокси- или 3,4-дигидроксимасляной кислоты, которые гликозилированы по О4 остатком Pse или другим моносахаридом, входящим наряду с Pse в основную цепь полимера. Гидроксильная группа при С4 Pse, как правило, замещена остатками моносахаридов,

среди которых идентифицированы α -D-Galp, α -D-Galp3OMe, α -D-Galp2,3OMe и β -L-Rhap (Тульская и др., 2011).

1.1.2.3. Полисахариды

Полисахариды – гликополимеры клеточных стенок актинобактерий, в которых остатки моносахаридов, связаны гликозидными связями разной конфигурации и разной топологии.

В единичных случаях в литературе есть сообщения о кислых полисахаридах у актиномицетов: отрицательный заряд этих полимеров обусловлен остатками серной кислоты в структуре полимера. В основном в клеточных стенках актиномицетов найдены нейтральные полисахариды с моно-, ди-, три-, гексасахаридным линейным или разветвленным повторяющимся звеном. Такие полимеры найдены в клеточных стенках термофильных и фитопатогенных стрептомицетов, представителей родов *Kribbella*, *Arthrobacter*, *Kineosporia*, *Curtobacterium* (Тульская, 2009, Зайчиков с соавт., 2021).

Нейтральные полисахариды

→ Моносахарид → Моносахарид → Моносахарид →

Кислые полисахариды

→ Моносахарид → Моносахарид → Моносахарид →

|

Остаток кислоты

В исследованиях (Шашков и др., 2018) было показано, что в клеточных стенках фитопатогенных актинобактерий представителей родов *Rathayibacter*, *Curtobacterium* найдены нейтральные полисахариды с Rhap в D- и L-конфигурации. Отметим, что присутствие рамнозы в D-конфигурации является уникальным явлением для грамположительных бактерий. Скорее всего, присутствие гликополимеров с рамнозой в D-конфигурации – является характерным признаком рода *Rathayibacter* (Potekhina et al., 2023).

1.2. Биологическая роль связанных с пептидогликаном гликополимеров клеточных стенок актинобактерий

Углеводы (в нашем случае это гликополимеры клеточных стенок актинобактерий) – важные носители биологической информации, наряду с белками и нуклеиновыми кислотами. Углеводы выполняют структурные, энергетические, регуляторные и защитные функции в клетках, определяют ответ макроорганизма на заражение патогенами и участвуют в

установлении иммунитета. Однако полная картина роли углеводов в биологических процессах всё ещё не до конца выяснена. Данный раздел обозначает ряд известных функций, которые выполняют в микробной клетке изучаемые гликополимеры.

Среди описанных в предыдущем разделе гликополимеров, пожалуй, до сих пор **наиболее изученными** как в плане структур, так и относительно выполняемых ими функций, являются **тейхоевые кислоты**. Однако, так называемые “вторичные гликополимеры клеточной стенки”, сведений о которых в связи с расширением массива изучаемых актинобактерий, а также совершенствования современных методов исследований, привлекают к себе в плане изучения структур и их функций в микробной клетке всё больше внимания. Исследователи приходят к выводу, что функции любых известных в настоящее время гликополимеров клеточных стенок в целом универсальны (Weidenmaier and Peschel, 2008; Knirel, 2011). В связи с вышесказанным, обозначим некоторые из известных функций (Potekhina et al., 2023).

- Тейхоевые кислоты и другие отрицательно заряженные гликополимеры участвуют в **связывании и хранении положительно заряженных ионов**, в частности катионов магния, и передаче его в мембранную зону для создания определенного ионного окружения, необходимого для биосинтетической активности мембранных ферментов (Neuhaus and Baddiley, 2003; Weidenmaier and Peschel, 2008; Brown et al., 2013).

Следует отметить, что на способность отрицательно заряженных гликополимеров связывать ионы Mg^{2+} влияют остатки различных боковых заместителей в структуре полимера. Например, остатки O-D-Ala, по-видимому, регулируют присоединение катионов к ТК посредством прямой конкуренции за отрицательно заряженные фосфатные группы (Neuhaus and Baddiley, 2003).

Эксперименты с мутантным штаммом *Micrococcus luteus*, утратившим способность к биосинтезу тейхуроновой кислоты, показали, что для роста этому штамму требуется более высокая концентрация ионов магния, чем его родительскому штамму, который нормально синтезировал тейхуроновую кислоту (Yamada et al., 1975). Эти опыты подтверждают участие тейхуроновых кислот в связывании катионов магния. Стоит обратить внимание, что у мутанта был подавлен процесс деления клеток, который осуществляется автолитическими ферментами. Это наблюдение позволяет предположить, что тейхуроновая кислота микрококка является полимером, локализирующим автолизины в клеточной стенке (Robson and Baddiley, 1977).

- Последний вывод уже относится к другой функции, а именно – способности гликополимеров регулировать активность автолизина. В этом случае, весьма важны конформационные соответствия гликополимера и автолизина.

Автолизины, проводя гидролиз собственного пептидогликана, играют важную роль в жизнедеятельности бактериальной клетки, а именно: рост самой клетки, что приводит к

обновлению клеточной стенки, деление клетки – образование перегородки между дочерними клетками, разделение дочерних клеток, что необходимо для распространения микроорганизма в окружающей среде с целью захвата новых источников питания, а также хемотаксис, секреция протеинов, дифференциация клеток. С ними также связывают степень патогенности, генетическую компетентность и устойчивость к бактериофагам (Brown et al., 2013).

Для демонстрации способности анионных полимеров регулировать активность автолизина был проведен ряд исследований на примере тейхоевой кислоты клеточных стенок стрептококков и пневмококков. Стеночная тейхоевая кислота *Streptococcus pneumoniae* представляла собой поли(рибитфосфат), несущий фосфорилхолиновые остатки. Такое же строение имела гидрофильная часть липотейхоевой кислоты (Fischer et al., 1993, цит. по Тульская, 2009). Отметим, что тейхоевые кислоты, содержащие холиновые остатки, играют важную роль в **поддержании нормальной морфологии и физиологии клетки** (Brown et al., 2013).

Streptococcus pneumoniae, вырастили на среде содержащий холин, а также на среде с этаноламином (аналог холина). В первом случае стрептококки включали холин в состав тейхоевой кислоты и синтезировали клеточную стенку, чувствительную к автолизину в данном случае к L-аланинамидазе. А во втором случае этаноламин вошел в структуру тейхоевой кислоты, и, как следствие, клетка не была подвержена автолизу (Brown et al., 2013). Эти данные свидетельствовали о взаимосвязи между автолитическим процессом и структурой ТК пневмококков и важной роли холиновых остатков в регуляции активности ферментов.

- Тейхоевые кислоты (анионные гликополимеры) принимают участие **в создании и регуляции плотности отрицательного заряда клеточной поверхности**. Известно, что плотность отрицательного заряда поверхности грамотрицательных и грамположительных бактерий выше, чем в окружающей среде (Seltmann and Holst, 2014). В зависимости от индивидуальных особенностей самого организма, и от ионного состава окружающей среды, плотность заряда варьирует от организма к организму.

Именно на этом свойстве основано измерение общего заряда поверхности микроорганизмов, а также изменение поверхностных свойств клеток при взаимодействии их с вирусами, белками и антибиотиками (Bayer and Sloyer, 1990, цит. по Тульская, 2009).

Используя положительно заряженный ферритин для определения анионных групп на поверхности клетки *Bacillus subtilis*, коллективу авторов (Sonnenfeld et al., 1985a, цит. по Тульская, 2009) удалось показать, что: 1) отрицательный заряд поверхности клетки осуществляется за счет фосфатных групп тейхоевых кислот, так и карбоксильных групп пептидогликана; 2) карбоксильные группы направлены к внешней поверхности клеточной

стенки; 3) отрицательные заряды в слое клеточной стенки распределены асимметрично, благодаря ориентации тейхоевых кислот и пептидных субъединиц пептидогликана в направлении к ее внешней поверхности, поверх плоскости гликанового слоя.

Те же авторы (Sonnenfeld et al., 1985, цит. по Тульская, 2009) открыли, что меченый ферритин имеет большее сродство к полюсам клетки *Bacillus subtilis*. Они объяснили, что это явление связано либо с неоднородным распределением полимеров в различных частях палочковидной клетки, либо с изменением конформации гликановых цепей пептидогликана и тейхоевых кислот, что приводит к экспонированию фосфатных и карбоксильных групп на полюсах. Также другие авторы демонстрировали, что отрицательные заряды характеризуются различной плотностью в разных областях клеточной поверхности (Seltmann and Holst, 2014).

Таким образом, отрицательный заряд в клеточной стенке, по всей видимости, распределён неравномерно. Такая неоднородность может быть достигнута различными путями. Во-первых, в структуре тейхоевых кислот бацилл присутствует D-аланин, который может частично нейтрализовать заряд фосфатных групп цепи (Neuhaas and Baddiley, 2003). Очевидно, ту же функцию могут выполнять O-L лизильные остатки, и, возможно, более эффективно, имея две свободные аминогруппы, или неацетилированные глюкозаминильные заместители в тейхоевых кислотах актиномицетов. Во-вторых, регуляция заряда различных зон может достигаться за счет локализации в них различных по структуре полимеров.

• Гликополимеры клеточных стенок грамположительных бактерий **играют важную роль в процессе межклеточной адгезии** (Seltmann and Holst, 2014). Некоторые исследования указывают на значимость гликополимеров клеточных стенок в способности грамположительных бактерий прилипать и заражать клетки-хозяева (Weidenmaier and Peschel, 2008).

Адгезия является неотъемлемым этапом большинства инфекций. Например, тейхоевые кислоты в отдельных случаях осуществляют прилипание патогенных микроорганизмов к эпителию хозяина.

Возможно, ионные взаимодействия одной клетки (положительно заряженной) со специфическими рецепторами другой могут влиять на процессы межклеточной адгезии. Тейхоевые кислоты в частности могут послужить такими рецепторами (цит. по Тульская, 2009). К примеру, было обнаружено, что мутант *Staphylococcus aureus*, у которого был удален ген *tagO*, отвечающий за биосинтез N-ацетилглюкозамин-1-фосфат трансферазы, и, соответственно, не способный синтезировать тейхоевую кислоту, не мог колонизировать носовую полость хлопковых крыс. Это подтверждало предположение о том, что тейховая кислота является фактором вирулентности (Weidenmaier and Peschel, 2008).

Впервые ТУЛК были найдены в клеточных стенках фитопатогенных стрептомицетов (Shashkov et al., 2000; Shashkov et al., 2002; Тульская и др., 2011). Было высказано предположение,

что наличие Kdn-содержащих соединений на поверхности клетки оказывает существенное влияние в патогенезе, и способствует адгезии фитопатогена к клетке растения-хозяина на первых этапах инфекции. Ранее сообщалось об адгезивных свойствах по отношению к тканям растения-хозяина полимеров, в структуре которых идентифицированы остатки Kdo (3-дезоксид-манноокт-2-улозоновой кислоты), также принадлежащей к семейству высших 3-дезоксидальд-2-улозоновых кислот (Тульская и др., 2011; Schade, Weidenmaier, 2016)

Отмечено наличие ТУЛК в клеточных стенках представителей почвенной микрофлоры ряда родов класса *Actinobacteria* (*Streptomyces*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, *Kribbella*, *Actinoplanes*), фитопатогенные свойства которых описаны не были (Тульская и др., 2011). Наличие ТУЛК в клеточной стенке может свидетельствовать о способности почвенных актиномицетов колонизировать растение, что, в свою очередь, приводит либо к их симбиотическому существованию, либо к развитию патогенеза.

• **Анионные гликополимеры клеточных стенок участвуют в связывании положительно заряженных пептидов.** На анионных свойствах клеточной поверхности, определяемых, в частности, анионными гликополимерами, основаны некоторые механизмы действия защитных систем человека и животных. Многие животные и человек при поражении бактериями начинают вырабатывать положительно заряженные пептиды как компонент природного иммунитета.

Мутанты *S. aureus* с повышенной чувствительностью к иммунным пептидам, имели более высокий отрицательный заряд на клеточной поверхности из-за потери остатков D-Ala тейхоевыми кислотами. D-аланирование ТК, характерное для многих патогенных бактерий, по-видимому, в значительной степени влияет на их устойчивость к защитным системам человека и животных (Потехина, 2006).

• **Тейхоевые кислоты принимают участие в образовании биопленок.** Известно, что тейхоевые кислоты играют важную роль на первом этапе формирования биопленки. Процессы взаимодействия ТК с искусственными поверхностями (ИП) происходят под влиянием ионных и ван-дер-ваальсовых сил, которые могут быть как притягивающими, так и отталкивающими.

Потеря остатков D-Ala тейхоевыми кислотами у мутантов *S. aureus* приводит к значительному повышению общего отрицательного заряда на поверхности клеток. Это повышение отрицательного заряда приводит к увеличению отталкивающих сил, что препятствует образованию бактериальных пленок на полистироле и стекле. Вероятно, возникающее при этом электростатическое отталкивание мешает адгезии. Следовательно, остатки D-Ala, которые нейтрализуют общий отрицательный заряд, способствует формированию стафилококками фиксированных пленок на искусственных поверхностях (цит. по Потехина, 2006).

• **Тейхоевые кислоты обладают иммунологическими свойствами.** При исследовании большой группы молочнокислых бактерий, содержащих глицерин- и рибит-ТК, была обнаружена корреляция между природой ТК клеточной стенки и серологическими свойствами бактерий. Это позволяет предположить, что природа полиола и гликозильных заместителей в составе ТК может определять антигенные свойства бактерий (цит. по Потехина, 2005).

Иммунологическими детерминантами могут служить некоторые структурные элементы молекулы ТК, а именно: углеводные заместители, остатки D-Ala и сам полиолфосфатный остов молекулы (Knox et al., 1973 цит. по Потехина, 2006).

В зависимости от степени замещенности гидроксильных групп полиольных единиц тейхоевой кислоты и индивидуальных особенностей инфицированных животных, решается какие антитела будут образовываться – специфичные для полиолфосфатных цепей или углеводных заместителей (Wicken et al., 1975, цит. по Потехина, 2006). К тому же, ТК одного микроорганизма способны стимулировать образование нескольких антител, специфичных к разным детерминантам. Однако активность антител, специфичных к полиолфосфату, определяется степенью его замещенности углеводными остатками. Чем выше степень замещенности, тем меньше антител образуется к полиолфосфатной цепи (Hausmann et al., 1975, цит. по Потехина, 2006).

• **Гликополимеры участвуют в рецепции фагов.** При связывании с клеткой, у многих бактериофагов проявляется специфичность к некоторым макромолекулам клетки.

Важную роль при этом играет окружение макромолекулы, обеспечиваемое целостностью клетки или клеточной стенки. В состав рецепторов для многих фагов, инфицирующих грамположительные бактерии, входят пептидогликан и тейхоевые кислоты (Weidenmaier and Peschel, 2008), но именно тейхоевые кислоты определяют специфичность связывания. При замене ТК на ТУК в условиях фосфатного голодания клетки фаги SP 50 и SP59 теряют способность инфицировать *Bacillus subtilis* W23, а восстановление ТК в клеточной стенке возвращает клетке чувствительность к фагу (Archibald et al., 1976; Anderson et al., 1978, цит. по Потехина, 2006).

Поверхностное положение гликополимеров – важное и необходимое условие, обеспечивающее способность клетки к **фаговой рецепции** (Weidenmaier and Peschel, 2008). Изучение некоторых бактерий и их мутантов (либо не содержащих ТК, либо несущих изменения в их структуре) показало, что некоторые бактериофаги реагировали на гликозильные заместители тейхоевых кислот, другим же для адсорбции было достаточно присутствия в клетке только поли(глицеринфосфатных) цепей.

Гликополимеры клеточной стенки наряду с пептидогликаном формируют участки фаговой рецепции на поверхности клетки. Специфичность связывания, как правило, определяют гликозильные заместители на интегральных цепях полимеров.

- ТУЛК, содержащие Kdp и Pse, являются предположительно одним из **факторов патогенности** бактерий благодаря структурному сходству этих сахаров с сиаловыми кислотами – производными 5-амино-3,5-дидезокси-D-глицеро-D-галакто-нон-2-улозоновой (нейраминовой) кислоты (широко распространенного компонента гликопротеинов и гликолипидов животных). Кроме того, полученные данные выявляют сходные этапы биосинтеза альдулозоновых кислот у микроорганизмов и сиаловых кислот у высших организмов (Тульская и др., 2011).

- Присутствие рамнозы в составе гликополимеров клеточной стенки связывают с **патогенностью** и/или **адгезивными свойствами** бактерий, их способностью колонизировать растения (Riley et al., 2014; Mistou et al., 2016; Murray et al., 2017). Можно предположить, что эти свойства присущи и рамнозосодержащим полисахаридам представителей рода *Rathayibacter* – с учетом биологии и экологии этой группы бактерий (Murray et al., 2017).

1.3. Гликополимеры клеточных стенок как хемотаксономический признак в таксономии актинобактерий

К настоящему времени исследованы клеточные стенки более 600 организмов, принадлежащих к различным порядкам, семействам, родам и видам класса *Actinomycetes* (Тульская и др., 2011). Обнаружено, что члены большинства изученных родов содержат тейхоевые, тейхуроновые, тейхулозоновые кислоты, а также гликозил-1-фосфатные полимеры и полисахариды в различных сочетаниях (Таблица 1).

Тейхоевые кислоты обычно свойственны организмам с хорошо развитым воздушным мицелием и сложными репродуктивными структурами, реже встречаются у нокардиоформных и палочковидных организмов и не выявлены у кокковых форм.

Тейхуроновые кислоты, ранее считавшиеся характерными полимерами клеточной стенки бацилл (Наумова, Шашков, 1997), в настоящее время обнаружены у представителей актинобактерий (Тульская и др., 2011; Шашков и др., 2018; Dmitrenok et al., 2017), что расширило представление о распространенности этих полимеров в мире микробов.

Новый класс гликополимеров, содержащих в повторяющемся звене остатки Kdp или Pse, **тейхулозоновые кислоты**, благодаря отрицательному заряду карбоксильных групп альдулозоновых кислот ТУЛК, как и ТУК, обладают сильно выраженными анионными свойствами, и можно предполагать, что они играют аналогичную роль в жизнедеятельности микробной клетки. Впервые ТУЛК обнаружены в клеточных стенках стрептомицетов-патогенов картофеля и корнеплодов (Shashkov et al., 2000). В настоящее время выявлены у значительного количества актинобактерий, обитающих в почве (Тульская и др., 2011).

В клеточной стенке нокардио- и коринеформных организмов обычно выявляются **бесфосфатные гликополимеры**, среди которых найдены нейтральные и кислые полисахариды и тейхуроновые кислоты. Показано (Шашков и др., 2018, Potekhina et al., 2023), что характерной особенностью клеточных стенок представителей рода *Rathayibacter* является наличие гликополимеров с D- и L-рамнопиранозой в структуре.

Таблица 1. Распространение гликополимеров у представителей различных родов класса *Actinomycetes*

Род	Гликополимеры				
	ТК	СФП	ТУК	ПС	ТУЛК
<i>Actinocorallia, Actinomadura</i>	+				
<i>Actinoplanes</i>	+	+	+	+	+
<i>Agromyces</i>	+				
<i>Arthobacter, Glutamicibacter</i>	+	+			
<i>Bifidobacterium</i>	+	+		+	
<i>Brachybacterium</i>	+				
<i>Brevibacterium</i>	+	+	+		+
<i>Glycomyces, Herbidospora, Microbispora, Nocardiopsis, Nocardioides, Nonomuraea</i>	+				
<i>Planotetraspora</i>	+	+		+	
<i>Streptomyces</i>	+	+	+	+	+
<i>Spirilliplanes</i>	+	+	+		
<i>Thermobifida</i>	+		+		
<i>Thermomonospora</i>	+				
<i>Citrinospora</i>	+				
<i>Kineosporia</i>	+			+	
<i>Corynebacterium, Catellatospora, Propionibacterium</i>	-		+		
<i>Kribbella</i>	-			+	+
<i>Micrococcus</i>	-	+	+		
<i>Clavibacter, Geodermatophilus</i>	-			+	
<i>Promicromonospora</i>	-		+	+	+
<i>Rathayibacter</i>	-		+	+	
<i>Paenarthrobacter</i>	-			+	

Ещё на ранних этапах изучения гликополимеров клеточных стенок **наличие и структуры ТК** предлагалось использовать в таксономии грамположительных бактерий. Ниже приведём примеры.

- Для разделения представителей рода *Lactobacillus* (на уровне серотипа) (Baddiley et al., 1961),
- Для разделения представителей рода *Staphylococcus* (на уровне вида) (Davison et al., 1963),
- Для разделения родов *Micrococcus* и *Staphylococcus*; (Schleifer et al., 1983),

- *Arthrobacter* на уровне обособленных кластеров - *A. nicotianae* группа / *A. globiformis* группа (Fiedler et al., 1987),
- Признак **наличие/отсутствие ТК** рекомендован как полезный признак для дифференциации родов в порядке *Micrococcales*, а также как ценная характеристика, рекомендованная при описании представителей класса *Actinomycetes* в определителе Bergey's **2012** (Schumann et al., 2009).

Анализ работ по изучению гликополимеров клеточных стенок актинобактерий за последние 40 лет показал, что структурное разнообразие этих биополимеров, необходимых для функционирования клеток, и их комбинации в клеточной стенке отражают многообразие организмов класса *Actinomycetes* и, отличают одни группы актинобактерий от других на разных таксономических уровнях.

Приведём некоторые примеры:

Структуры и комбинация тейхоевых кислот в клеточных стенках актиномицетов **рода *Nocardioopsis*** хорошо согласуются с филогенетической классификацией этих организмов, основанной на данных анализа генов 16S рРНК и данными ДНК-ДНК гибридизации. И в то же время, филогенетически близкие организмы (сходство генов 16S рРНК до 99,9%) различаются по составу анионных полимеров (Таблица 2, Tul'skaya et al., 2014).

Таблица 2. Тейхоевые кислоты клеточных стенок видов и подвидов рода *Nocardioopsis* (Tul'skaya et al., 2014).

Тейхоевая кислота	<i>N. dassonvillei</i> ssp. <i>dassonvillei</i>	<i>N. symmetatofor-mans</i>	<i>N. halotolerans</i>	<i>N. dassonvillei</i> ssp. <i>albirubida</i>	<i>N. alba</i> (3 strains)	<i>N. listeri</i>	<i>N. metallica</i>	<i>N. prasina</i>	<i>N. lucenensis</i>	<i>N. composita</i>	<i>N. trehalosi</i>	<i>N. tropica</i>
	Группа <i>N. dassonvillei</i>				Группа <i>N. alba</i>							
Поли(глицерофосфат-β-N-ацетилгалактозаминилглицерофосфат)/ связь -3-P-3 –	◆	◆◆										
Поли(глицерофосфат-β-N-ацетилгалактозаминилглицерофосфат)/ связь -3-P-4 –		◆	◆									
Поли(глицерофосфат-β-N-ацетилгалактозаминил-глицерофосфат)/ связь -3-P-3 –, с пируват-кетальной группой			◆◆									
Поли(глицерофосфат-β-N-ацетилгалактозаминил-глицерофосфат)/ связь -3-P-4 –, с O-сукцинильным остатком				◆								
Незамещенный 3,5-поли(рибитфосфат) ТК1					◆			◆				
1,5-Поли(рибитфосфат) с 2,4- пируват-кетальной группой ТК3					◆	◆	◆◆					
1,3-Поли(глицерофосфат) с α-N-ацетилглюкозаминном ТК2					◆	◆◆	◆	◆	◆	◆		
1,3- Поли(глицерофосфат) с β-глюкозой											◆	
1,5- Поли(рибитфосфат) с боковыми глицерофосфатными олигомерами												◆

◆ – основная (преобладающая) тейхоевая кислота

В клеточных стенках 15 изученных штаммов аспорогенных нокардиоформных актиномицетов рода *Kribbella* (семейство *Nocardioideae*) найдены необычные гликополимеры. Анионные гликополимеры представлены тейхуроновыми (ТУК) и тейхулозоновыми (ТУЛК) кислотами, а нейтральный гликополимер – разветвленным маннаном (Таблица 3, Тульская и др., 2011; Автух и др., 2023).

Сравнение полученных данных с результатами изучения нуклеотидных последовательностей 16S рРНК генов, фрагментов гиразных генов (*gyrB*), спектров целых клеток, полученных с использованием метода масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI TOF), и физиолого-биохимических характеристик штаммов показало, что изученные организмы относятся к нескольким новым видам рода *Kribbella* (Автух и др., 2023). Штаммы, принадлежащие к разным видам рода, имеют разный состав и структуру

Таблица 3. Гликополимеры клеточных стенок изученных штаммов криббелл (Тульская и др., 2011)

Группа	Под-группа	Штаммы <i>Kribbella</i> sp. ВКМ	Гликополимеры					
			Маннан НПС	Тейхуроновые к-ты		Тейхулозоновые кислоты		
				ТУК-1	ТУК-2	ТУЛК-1	ТУЛК-2	ТУЛК-3
I	1	Ac-2539	◆	◆				
	2a	Ac-2538	◆		◆			
		Ac-2540	◆		◆			
		Ac-2569	◆		◆			
	Ac-2574	◆		◆				
26*		Ac-2570	◆		◆			
		Ac-2571	◆		◆			
		Ac-2573	◆		◆			
		Ac-2566	◆		◆			
II	1	Ac-2541	◆			◆		
	2	Ac-2500	◆				◆	
		Ac-2568	◆				◆	
	Ac-2575	◆				◆		
	3	Ac-2527	◆					◆
III	1	Ac-2572	◆	◆			◆	

*- в клеточных стенках штаммов подгруппы дополнительно выявлено незначительное количество поли(глицерофосфата).

гликополимеров клеточных стенок, в то время как штаммы одного вида имеют одинаковые полимеры. Однако организмы, предположительно принадлежащие к разным видам, могут иметь схожий состав полимеров (например, штаммы ВКМ Ас-2500, ВКМ Ас-2568, ВКМ Ас-2575).

* * *

Ранее различные типы гликополимеров клеточных стенок, обсуждаемые в данном разделе работы, обычно не рассматривались как углеводы “единой семьи”. Однако, очевидные сходства в химической природе, расположении, присоединении к акцепторным сайтам и пути их биосинтеза предполагают, что эти гликополимеры, являются вариациями на общую тему. Несмотря на огромное структурное разнообразие, объединяющие концепции возникают из недавних бактериологических, биохимических и иммунологических исследований. Тем не менее, разные гликополимеры, вероятно, имеют только частичные функциональные перекрытия, что может быть одной из причин наличия двух или более разных гликополимеров в одном конкретном бактериальном штамме. Определение наиболее значимых ролей и связывание этих ролей с определенным составом и структурой гликополимеров являются основными проблемами для будущих исследований (Weidenmaier and Peschel, 2008). Особое внимание следует уделить изучению распространения, состава и структур гликополимеров **в связи с использованием в таксономических целях.**

Глава II. Актинобактерии рода *Clavibacter*: таксономия, образ жизни, факторы патогенности, меры борьбы

2.1. Таксономия и филогения рода *Clavibacter*

Ряд важных патогенов растений относятся к грамположительным бактериям и имеют коринеформную морфологию. Первоначально все эти грамположительные бактерии были объединены в род *Corynebacterium* в основном по морфологическим признакам. С развитием хемотаксономических, а затем и молекулярных методов дифференциации бактерий стало ясно, что не существует тесного родства фитопатогенных видов с *Corynebacterium*, и эти бактерии были переклассифицированы в несколько новых родов (Davis et al., 1984) (Рисунок 3).

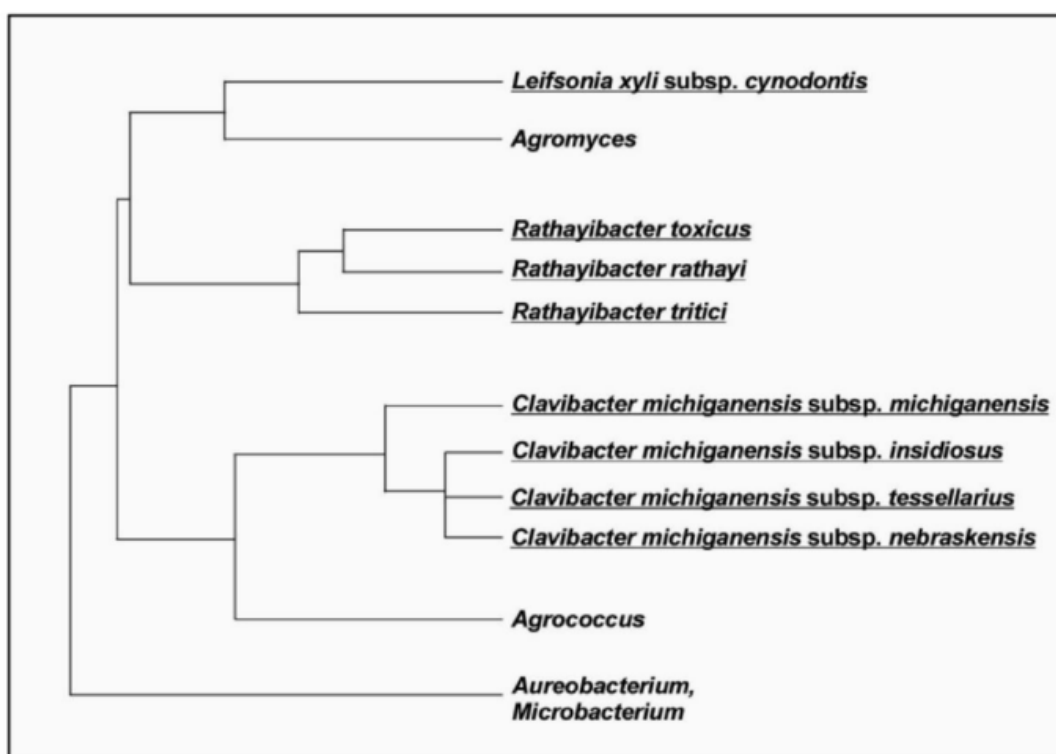


Рисунок 3. Филогенетическое дерево, полученное путём сравнения последовательностей 16S рДНК некоторых представителей семейства *Microbacteriaceae*. Подчеркнуты патогены растений (Eichenlaub et al., 2006).

В 1984 году рядом исследователей (Davis et al., 1984) было предложено выделить в отдельный род *Clavibacter* фитопатогенные коринеформные бактерии, образующие особую группу с характеристиками, отличными от характеристик всех существующих родов, описанных к тому времени, с 2,4-диаминомасляной кислотой в пептидогликане, а также галактозой,

маннозой, рамнозой и фукозой в клеточной стенке, которые ранее принадлежали роду *Corynebacterium*.

Хемотаксономические и филогенетические исследования представителей рода (см. ссылки в обзоре: Evtushenko and Takeuchi, 2006) позволили усовершенствовать ранее принятую систематику этих актинобактерий. Род *Clavibacter* стали ограничивать только актинобактериями с присутствием основного менахинона МХ-9, пептидогликана типа В2γ, минорного количества путресцина среди полиаминов, содержанием G+C в ДНК 69-78 мол%, высоким сходством нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК (98,5-98,9%), ДНК-ДНК реассоциации и т.д.

Род *Clavibacter* первоначально включал шесть патогенных видов, поражающих различные растения: *Clavibacter michiganensis*, *Clavibacter iranicum*, *Clavibacter rathayi*, *Clavibacter toxicus*, *Clavibacter tritici* и *Clavibacter xyli*. Впоследствии патогены, специфичные для растений, *C. iranicum*, *C. rathayi*, *C. toxicus* - и *C. tritici*, были переклассифицированы в род *Rathayibacter* на основе ДНК-ДНК-гибридизации и их уникальной структуры менахинона (МХ-10). Два подвида *C. xyli* были отнесены к роду *Leifsonia* (Li et al., 2018).

Представители рода *Clavibacter* являются возбудителями болезней растений, развивающихся преимущественно в сосудах ксилемы, которые заражают экономически важные растения-хозяева (Eichenlaub and Gartemann, 2011). Ранее род *Clavibacter* включал единственный вид *Clavibacter michiganensis*, объединивший пять подвидов (см. ссылки в обзоре: Evtushenko and Takeuchi, 2006): 1) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; 2) *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*; 3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*; 4) *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*; 5) *Clavibacter michiganensis* subsp. *tessellarius*.

Все штаммы *Clavibacter* sp., ассоциированные с помидорами и перцем были классифицированы как представители *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* независимо от того, являются ли они патогенными или непатогенными для растения-хозяина. Однако с помощью мультилокусного анализа и типирования последовательностей (MLSA/MLST) показали, что непатогенные штаммы *Clavibacter* sp., ассоциированные с томатом, филогенетически отличаются от патогенных штаммов вида (Jacques et al., 2012). После появления высокопроизводительных молекулярно-филогенетических методов многие штаммы *Clavibacter*, которые ранее идентифицировались только на основании фенотипических признаков, были отнесены к новым таксонам. Например, непатогенные представители *C. michiganensis*, связанные с помидорами, были отнесены к двум новым подвидам *C. michiganensis* subsp. *californiensis* и *C. michiganensis* subsp. *chilensis*, которые были выделены в Калифорнии и Чили соответственно (Yasuhara-Bell et al., 2015). Кроме того, *C. michiganensis* subsp. *phaseoli* и *C. michiganensis* subsp. *capsici* были идентифицированы как возбудители бактериального пожелтения листьев фасоли

обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) (Gonzalez and Trapiello, 2014) и бактериального рака перца (*Capsicum annuum*) соответственно (Oh et al., 2016).

Полногеномный анализ, основанный на средней идентичности нуклеотидов (ANI) и цифровой гибридизации ДНК-ДНК (dDDH), а также мультилокусный анализ последовательности (MLSA) семи генов домашнего хозяйства (Таблица 4) привёл к повышению статуса каждого из подвидов *C. michiganensis* до видового (Li et al., 2018).

Таблица 4. Средние значения идентичности нуклеотидов (ANI; нижняя диагональ) и цифровой гибридизации ДНК-ДНК (dDDH; верхняя диагональ) среди *Clavibacter michiganensis* и родственных видов и подвидов. Значения отсечения для разграничения видов составляют 96,0 и 70,0% для ANI и dDDH соответственно (Li et al., 2018).

Data on the upper diagonal		Clavibacter sp.		Cmm		Cmn		Cms			Cmi		Cmt	Cmc	
36 dDDH % 100		CF 11	LMG 26808	LMG 7333	NCPPB 382	NCPPB 2581	DOAB 397	DOAB 395	ATCC 33113	CFIA 3NM	CFIA R14	LMG 3663	R1-1	ATCC 33566	PF 008
Clavibacter sp.	CF11	100	39.5	40	40	40.7	40.6	40.7	39.1	39	39	40.2	40.2	38.5	58.5
	LMG 26808	90.04	100	58.5	58.7	47.1	47.1	47.2	45.8	45.7	45.8	47.8	47.9	37	39.6
C. michiganensis subsp. michiganensis (Cmm)	LMG 7333 ^T	90.14	94.5	100	93.3	48	47.9	48.1	45.8	45.7	45.7	48.6	48.7	37.2	40.2
	NCPPB 382	90.05	94.46	99.17	100	48	47.9	48.1	46.3	46.2	46.2	48.6	48.7	37.2	40.2
C. m. subsp. nebraskensis (Cmn)	NCPPB 2581 ^T	90.28	92.08	92.32	92.23	100	99.9	99.5	45.2	45.2	45.2	59.9	60	37.2	40.7
	DOAB 397	90.26	92.09	92.24	92.26	99.97	100	98.3	45.2	45.2	45.2	59.9	60	37.1	40.7
	DOAB 395	90.30	92.08	92.25	92.21	99.97	100	100	45.3	45.2	45.3	60.1	60.2	37.8	40.8
C. m. subsp. sepedonicus (Cms)	ATCC 33113 ^T	89.91	91.88	91.92	91.87	91.68	91.66	91.71	100	99.8	98.8	45.1	45.2	36.2	39.1
	CFIA Cs3NM	89.91	91.86	91.88	91.86	91.67	91.69	91.76	99.97	100	99.8	44.9	45.1	36.2	39
	CFIA Cs R14	89.91	91.88	91.92	91.88	91.68	91.66	91.72	99.98	99.96	100	44.9	45.2	36.2	39.1
C. m. subsp. insidiosus (Cmi)	LMG 3663 ^T	90.17	92.3	92.45	92.52	94.98	94.96	94.98	91.75	91.77	91.78	100	94.3	37.4	40.5
	R1-1	90.17	92.27	92.51	92.43	94.94	95.01	94.95	91.76	91.76	91.77	99.89	100	37.4	40.5
C. m. subsp. tessellarius (Cmt)	ATCC 33566 ^T	89.85	89.45	89.45	89.57	89.72	89.77	89.78	89.18	89.20	89.19	89.71	89.72	100	38.4
C. m. subsp. capsici (Cmc)	PF008 ^T	94.58	90.10	90.11	90.17	90.30	90.35	90.30	89.97	89.93	89.98	90.24	90.26	89.87	100
Data on the lower diagonal		Clavibacter sp.		Cmm		Cmn		Cms			Cmi		Cmt	Cmc	
89 ANI % 100		CF 11	LMG 26808	LMG 7333	NCPPB 382	NCPPB 2581	DOAB 397	DOAB 395	ATCC 33113	CFIA 3NM	CFIA R14	LMG 3663	R1-1	ATCC 33566	PF 008

В настоящее время род *Clavibacter* включает десять видов: *C. michiganensis*, *C. capsici*, *C. insidiosus*, *C. nebraskensis*, *C. sepedonicus*, *C. tessellarius*, *C. californiensis*, *C. phaseoli*, *C. zhangzhiyongii* и *C. lycopersici* (<https://lpsn.dsmz.de/genus/clavibacter>, 2024). Были предложены новые виды *Clavibacter*, включая непатогенные эндофиты, что подчеркивает генетические и экологические различия внутри этого рода (Starodumova et al., 2018)

Переклассификация вида *C. michiganensis* не подрывает классификацию, основанную на фенотипической характеристике этой группы патогенных для растений бактерий, но скорее

подтверждает их положение как отдельных видов, которые легко дифференцируются классическими бактериологическими методами (Gonzalez and Trapiello, 2014; Davis and Vidaver, 2001; Eichenlaub et al., 2006). Как уже отмечалось, каждый из видов *C. michiganensis* является высоко специфичным для хозяина. Биохимические и физиологические тестовые реакции также дифференцируют каждый из видов. В связи с работами по изучению биологического разнообразия актинобактерий, выяснения механизмов симбиотических взаимоотношений и фитопатогенности, механизмов адаптации бактерий к условиям среды обитания, был выделен из различных мест обитания и описан ряд штаммов, отнесённых к роду *Clavibacter* (Zgurskaya 1993; Nazina et al., 2002; Załuga et al 2013; Yasuhara-Bell and Alvarez 2015). Следовательно, необходимы дальнейшие работы по совершенствованию таксономии рода *Clavibacter*

2.2. Некоторые характеристики представителей рода *Clavibacter*

Морфология. (Evtushenko and Takeuchi, 2006; Suddler and Kerr, 2012). Грамположительные. Представители рода – плеоморфные палочки (0,4 × 0,8-2,5 мкм), но в зависимости от среды могут встречаться кокковидные или разветвленные клетки. Большинство клеток встречаются поодиночке или парами, однако также можно наблюдать и образование клеточных агрегатов. Часто образуют угловатые или V-образные структуры при делении. Считается, что способ деления клеток имеет таксономическое значение: все известные подвиды *Clavibacter* делятся с расколом и перегибом при делении клетки, что и приводит к образованию подобных структур (например – Рисунок 4).

Физиологические признаки. (Suddler and Kerr, 2012). Неподвижные, неспорообразующие, мезофильные микроорганизмы с температурным оптимумом 25-28°C, максимальная температура роста составляет около 35 °C. Точка термической смерти составляет около 50°C. Время генерации довольно велико, и для образования видимых колоний на чашках с агаром требуется от трех до четырех дней.

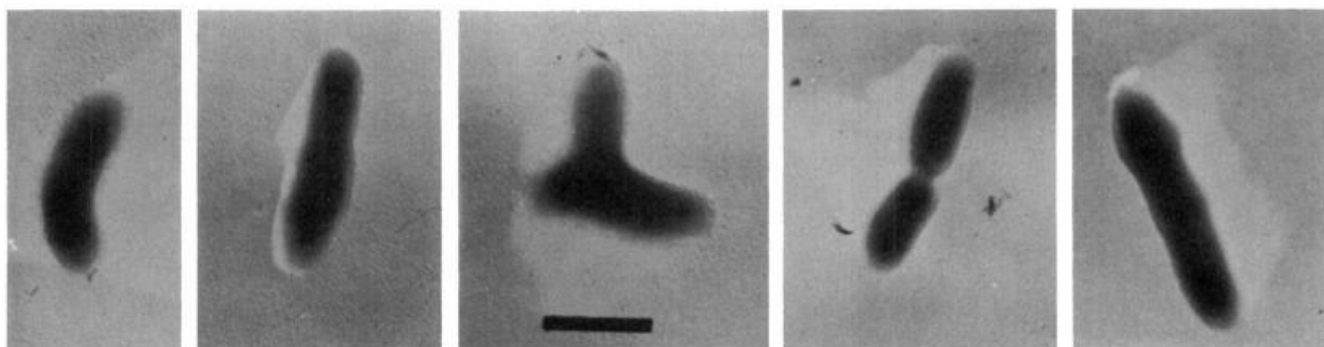


Рисунок 4. Электронная микрофотография *C. nebraskensis* (ранее *Rathayibacter nebraskensis*). Маркер линии соответствует 1µм (Vidaver and Mandel, 1974).

Оптимум рН находится между рН 7 и 8, но рост происходит при значениях рН вплоть до рН 5, что важно, когда бактерии растут в сосудах ксилемы.

Строгие аэробы, некислоустойчивые; нуждаются в добавках факторов роста, в частности, витаминов группы В. Слабо образуют кислоты из углеводов. Нитраты и нитриты не восстанавливают и не утилизируют, казеин не гидролизуют. Каталазо-положительные; оксидазо-, липазо-, тирозиназо- и уреазо- отрицательные. Все штаммы рода *Clavibacter* являются хемоорганотрофами.

Хемотаксономические признаки. Хемотаксономические признаки, которые отражают химический состав и структуру клеточной стенки и клетки в целом, являются важными и необходимыми среди фенотипических признаков в систематике актиномицетов. Из-за большого числа генов, ответственных за биосинтез полимеров и органических молекул бактерий, хемотаксономические признаки последних имеют хорошую корреляцию с филогенетическим положением микроорганизмов. Эти химические соединения или особенности их структуры могут быть полезными маркерами для идентификации таксонов на различных. Также они отвечают всем требованиям по точности и простоте идентификации. Одновременно с морфологическими, они являются основополагающими критериями, которые позволяют различать роды актиномицетов на фенотипическом уровне (см. ссылки в обзорах: Evtushenko and Takeuchi, 2006; Suddler and Kerr, 2012).

Пептидогликан клеточной стенки характеризуется наличием 2,4-диаминомасляной кислоты (DAB) и относится к В2γ-типу. Миколовые кислоты не найдены. Преобладают негидроксированные жирные кислоты, особенно изо-метил и антиизо-метил разветвлённые цепи жирных кислот. В качестве основных полярных липидов идентифицированы фосфатидилглицерин, дифосфатидилглицерил и некоторые неизвестные гликозилдиацилглицериды. Спермидин и спермин являются основными полиаминами наряду с минорным количеством путресцина. Изопреноидные хиноны представлены менахинонами с 9 изопреноидными единицами (МХ-9). Содержание G+C в ДНК (мол %): 65-75. Цвет колоний при росте на NBY-агаре также может быть полезным при идентификации вида/подвида клавибактеров (Suddler and Kerr, 2012).

2.3. Экология представителей рода *Clavibacter*

Опубликованные данные свидетельствуют о том, что бактерии рода *Clavibacter* всегда ассоциированы с различными заболевшими или здоровыми растениями-хозяевами и окружающим эти растения пространством (филлосферой) (Рисунок 5, Таблица 5)

2.3.1. Среда обитания

Таблица 5. Характеристика фитопатогенных представителей рода *Clavibacter*

Признаки Бактерии	Растение-хозяин	Симптомы болезни	Цвет и форма колонии	Распространение	Г+Ц в ДНК мол. %
<i>C. michiganensis</i>	Томаты (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Увядание и некроз тканей, рак плодов	Кремово-желтые, круглые, приподнятые.	США, Канада, Европа, Южная Африка, Австралия	72,5
<i>C. insidiosus</i>	Люцерна (<i>Medicago sativa</i> L)	Увядание, задержка роста	Бледно-желтые, круглые, гладкие, блестящие, плоские или слегка приподнятые	Азия, Африка, Америка, Океания, Европа	72,7
<i>C. nebraskensis</i>	Кукуруза (<i>Zea mays</i>)	Увядание и гниль листьев, ствола	Тёмно-оранжевые, круглые, выпуклые, блестящие, центр имеет более тёмный оттенок.	Канада, Южная Америка, Южная Европа, Африка, Австралия, Азия	73,5
<i>C. tessellarius</i>	Пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)	Пятнистость (мозаичная болезнь) и пожелтение листьев, зерна	Абрикосово-оранжевые, круглые, выпуклые, гладкие, с неровным краем.	США, Канада, Северная Африка, Южная Европа, Азия	74,0
<i>C. phaseoli</i>	Бобовые (фасоль)	Увядание, гниль и некроз тканей, зёрен	Желтые, круглые, цельные.	Европа, США, Южная Африка, Австралия	73,8
<i>C. sepedonicus</i>	Картофель (<i>Solanum tuberosum</i>)	Увядание листьев, кольцевая гниль клубня.	Белые, кремовые до жёлтого, круглые, гладкие, непрозрачные, блестящие.	Северная и Южная Америка, Европа, Азия, вся территория СНГ	72,4
<i>C. capsici</i>	Перец	Увядание и некроз тканей, рак плодов	Желтовато-кремовые, круглые. Гладкие.	Азия, Южная Америка. Мексика. США	73,2
<i>C. zhangzhiyongii</i>	Ячмень	веснушки и пятна на листьях	Оранжевые, круглые	Австралия, Китай	73,7

Как правило, виды рода *Clavibacter* вызывают специфические заболевания в соответствующих растениях-хозяевах, как указано в Таблице 5.

Растения, поражённые актинобактериями рода *Clavibacter*

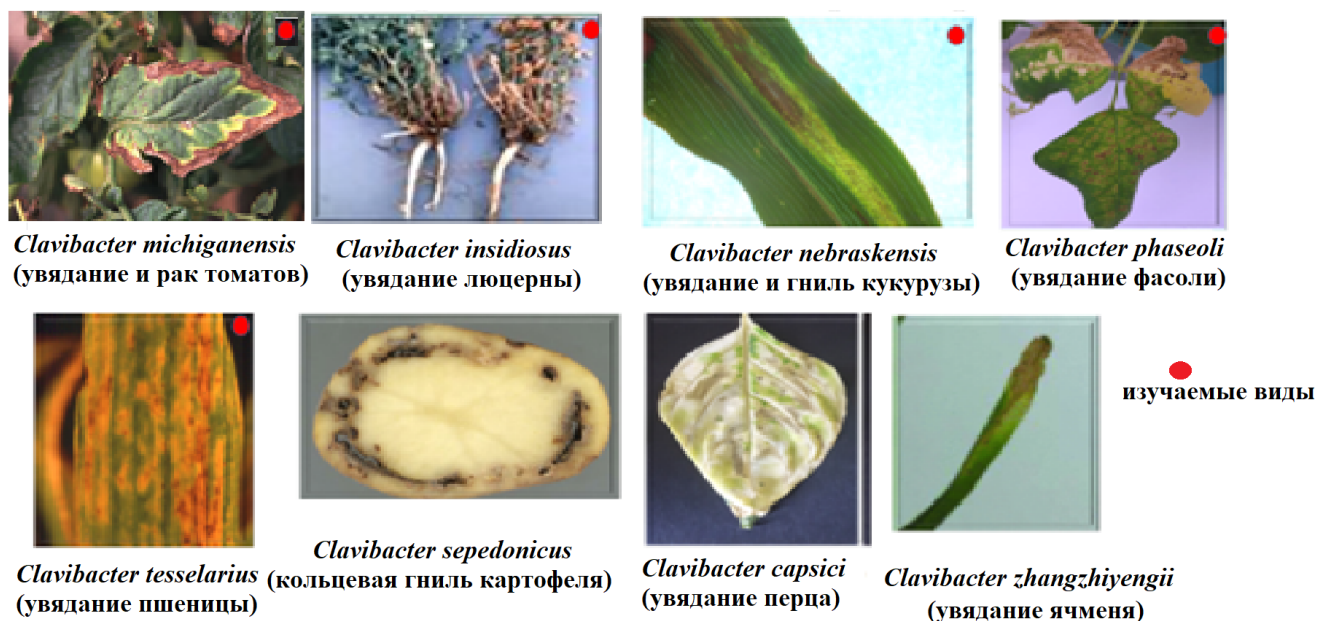


Рисунок 5. Некоторые фитопатогенные виды *Clavibacter* (<https://gd.eppo.int> 2024).

2.3.2. Фитопатогенность

Распространение заболевания

Заражение растений-хозяев происходит через раневые поверхности, гидатоды, устьица и семена. Естественное распространение заболевания может происходить за счет ветровой дисперсии почвы и дисперсии загрязненных дренажных вод. Бактерии легко распространяются зараженными сельскохозяйственными машинами, особенно косилками. Всемирное распространение, скорее всего, происходит через доставку инфицированных семян или сухой растительной массы. Оптимальными факторами для развития заболевания являются температура 20-28 °C и относительная влажность воздуха 80-85%. В открытом грунте в период дождей и жаркую погоду распространение болезни может принимать форму эпифитотии (<https://gd.eppo.int>, 2024).

Жизнь внутри растения

Представители видов *Clavibacter michiganensis* являются возбудителями болезней растений, развивающихся преимущественно в сосудах ксилемы, которые заражают экономически важные растения-хозяева (Eichenlaub and Gartemann, 2011). Ксилема - основная водопроводящая ткань наземных сосудистых растений, по ней осуществляется восходящий ток

воды с растворёнными в ней минеральными веществами. В качестве примера цикл заражения *S. michiganensis* показан на рисунке 6.

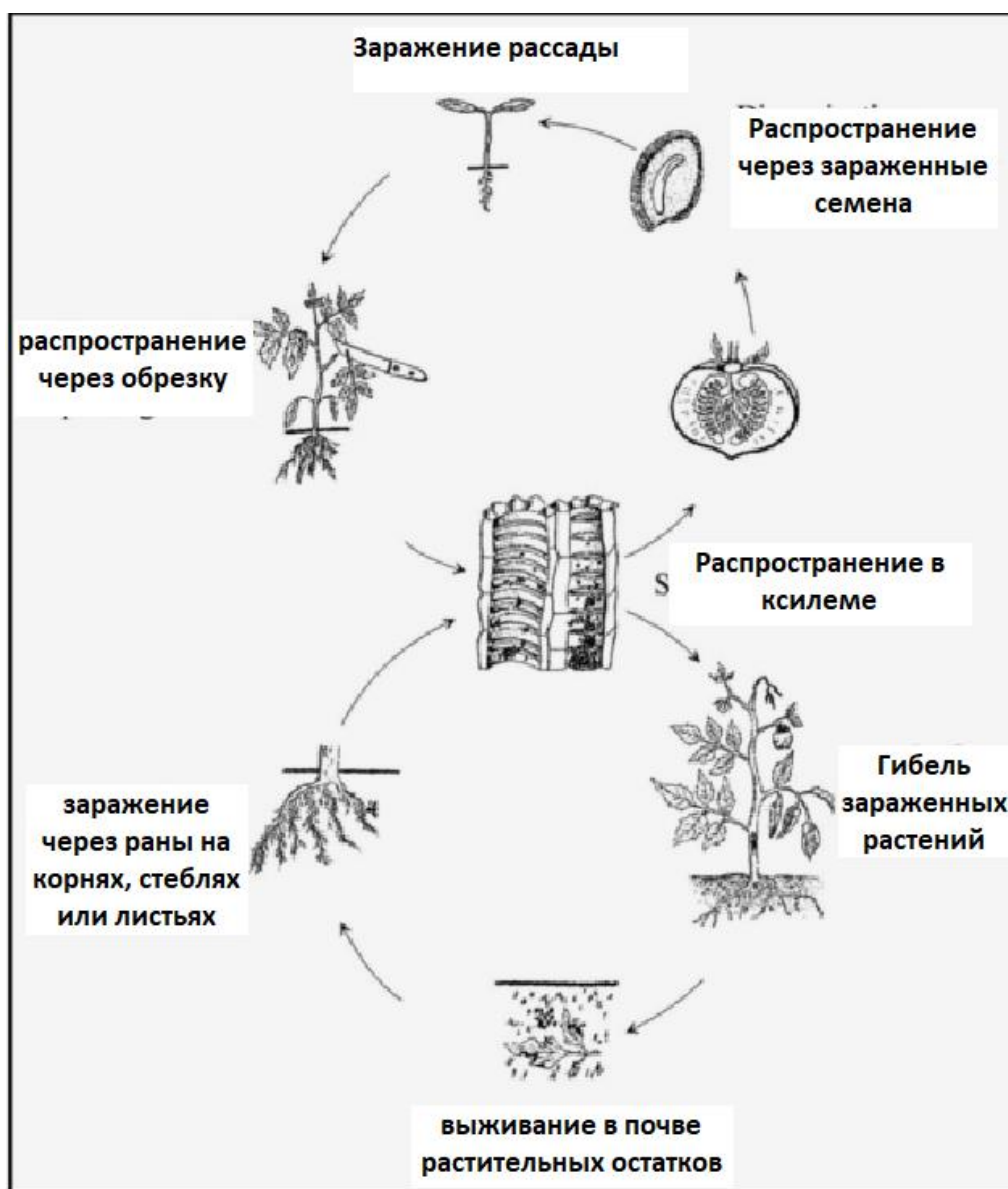


Рисунок 6. Цикл заражения *S. michiganensis* томата (Eichenlaub et al., 2006).

Основной средой обитания этих актинобактерий является бедная питательными веществами ксилемная жидкость. Представители рода *Clavibacter* являются биотрофами и в основном живут и размножаются внутри растения-хозяина. Лишь на более поздних стадиях инфекции покидают сосуды ксилемы и попадают в окружающие ткани после деградации клеточных стенок растений. По-видимому, это вызвано продукцией ферментов, разрушающих клеточную стенку (например, целлюлазы, полигалактуроназы, ксиланазы).

Колонизация ксилемы и плода

Ксилема представляет собой проточную среду, состоящую из мертвых элементов трахеи и волокон ксилемы и живых клеток паренхимы. Названные единицы, как правило, способствуют

поддержанию структуры растений и обеспечивают каналы для пассивного транспорта воды и растворенных веществ от корней к их надземным органам. Поток содержимого в ксилеме осуществляется по двум траекториям: отрицательное натяжение создается потерей воды, а положительное давление создается поглощением влаги корнями (Venturas et al., 2017). Несмотря на то, что ксилема содержит мало питательных веществ, ксилемный сок обеспечивает постоянный поток низких концентраций сахаров, белков и метоболитов, которые могут служить источником питательных веществ для патогенов (Peritore-Galve et al., 2021). Кроме того, патогены могут изменять состав ксилемного сока, создавая более подходящую среду для колонизации (Dixon and Pegg 1972). Следовательно, при правильной адаптации патогены могут использовать ксилему для постоянного поступления питательных веществ (Venturas et al., 2017). Даже в отсутствии известных генов, ответственных за агрегацию и подвижность, патоген может создать биопленкоподобные агрегаты в сосудах ксилемы и *in vitro* с помощью ксилемного сока (Chalupowicz et al., 2012). Бактерия не образует агрегатов при культивировании в богатой питательными веществами или минимальной среде, но образует большие агрегаты клеток при культивировании в ксилемном соке или средах с добавлением сока (Chalupowicz et al., 2012; Tancos et al., 2018; Peritore-Galve et al., 2020). Бактериальное прикрепление может быть вызвано химическими или физиологическими сигналами, ксилемным соком, но эти сигналы и гены, участвующие в прикреплении, остаются неизвестными.

Колонизация плодов является решающим этапом в эпидемиологии бактериального рака, поскольку бактерия колонизирует семена систематически и через внешнюю поверхность плода, что приводит к дальнейшему распространению патогена (Tancos et al., 2013). Отличительным признаком заражения плодов *S. michiganensis* являются поражения в виде птичьего глаза, представляющие собой белые ореолы на эпидермисе плодов, окружающие некротическое поражение. Эти поражения развиваются, когда *S. michiganensis* попадает на поверхность плода на ранних стадиях развития (Medina-Mora et al., 2001)

Бактерии, поражающие плоды, распространяются из эпидермиса в перикарпий, где могут получить доступ к сосудам ксилемы плода для системного распространения (Tancos et al., 2013). Чтобы проникнуть в сосуды ксилемы плода, бактерия должна перемещаться через внешний слой эпидермиса, колленхимы и паренхимы, чему может способствовать система подвижности (Matas et al., 2011).

Стоит упомянуть то, что *S. michiganensis* способен выживать в почве, ведя сапротрофный образ жизни, и при этом не является типичной почвенной бактерией, так как в геноме отсутствуют гены, кодирующие нитрат- и нитритредуктазы (Gartemann et al., 2008).

2.3.3. Симптомы заражения растения-хозяина

Растения, зараженные *C. michiganensis*, проявляют различные симптомы в зависимости от возраста растения-хозяина, восприимчивости сорта и вирулентности *C. michiganensis*, а также от определенных условий окружающей среды, включая температуру и влажность (de León et al., 2011). Когда растения заражаются на ранних стадиях их жизни (в виде семян или молодых саженцев), у них развиваются системные инфекции (первичные инфекции), которые влияют на качество плодов и урожайность и обычно приводят к гибели растений. Напротив, у более старых растений обычно развиваются листовые инфекции (вторичные инфекции), которые вызывают хлороз листьев, но могут влиять или не влиять на качество и урожайность текущей культуры. Обычно симптомы, наблюдаемые на поверхности листа, представлены в виде темно-коричневого пятна, окруженного желто-оранжевым ореолом на краю листа. У растений также наблюдается скручивание самых старых инфицированных листьев с последующим краевым хлорозом и некрозом. Повреждения типа «птичий глаз» наблюдаются как на незрелых, так и на спелых плодах.

Во время системной инфекции растения могут сначала казаться бессимптомными, а симптомы проявляются через 6–8 недель, когда бактерия размножается до высокого титра, достигающего 10^9 – 10^{10} на грамм гомогената растительной ткани (Meletzus et al., 1993). *C. michiganensis* внедряется и пролиферирует в сосудах ксилемы, вызывая потемнение внутренней сосудистой сети с постепенной деградацией сосудистых тканей. Это препятствует транспортировке воды и приводит к увяданию на ранних стадиях инфекции (Eichenlaub and Gartemann, 2011). У растений томата, инфицированных на поздних стадиях развития, заболевание может протекать бессимптомно или наблюдается медленный процесс увядания. Они могут пережить инфекцию и могут давать хорошие плоды, но могут стать эффективным источником инфекции в последующем вегетационном периоде (Sharabani et al., 2013).

2.3.4. Сапрофитные клавибактерии

Сапрофитные клавибактерии могут быть выделены из различных растений, не несущих признаков заболеваний, а также из окружающего эти растения пространства. Наиболее благоприятное время сбора образцов – ранняя осень, поздняя весна или лето в пустынных районах. Например, сообщалось (цит. по Evtushenko and Taskeuchi, 2006), что именно это время является наилучшим для сбора образцов и выделения UV-устойчивых клавибактерий, обитающих на арахисе, растущем в пустынно-полевых условиях.

Поскольку наибольшая популяция бактерий сосредоточена на адаксиальной поверхности листьев растений («брюшная сторона», вентральная сторона), именно эта их сторона

используется для выделения эпифитов. Для выделения клавибактерий с поверхности листьев и из филлосферы растений разработан ряд специальных подходов (Evtushenko and Taskeuchi, 2006). Обычно – это соблюдение правил стерильности, использование определённых стерилизующих веществ и добавление противогрибковых антибиотиков в богатые питательные среды для выделения. Инкубация при комнатной температуре при дневном свете способствует лучшему формированию пигмента, что позволяет дифференцировать некоторые клавибактерии от других бактерий на ранней стадии исследования.

2.4. Факторы патогенности у представителей рода *Clavibacter*

Материальные носители, которые обуславливают способность микробов вызывать инфекционный процесс, называют факторами патогенности. Важными факторами патогенности считаются способность к адгезии и колонизации, а также свойства инвазивности и токсигенности, также способность к длительному воздействию.

2.4.1. Роль экзополисахаридов в клетке

Многие фитопатогенные бактерии продуцируют большое количество внеклеточного полисахарида (ЭПС). *C. michiganensis* образует ЭПС не только при попадании в организм растения-хозяина, но и при сапротрофном образе жизни в почве. При этом ранее считалось, что вирулентность фитопатогенных бактерий связана с их способностью продуцировать экзополисахариды. Изначальным предположением было то, что ЭПС ответственны за индукцию болезни. Были исследованы экзополисахариды у представителей рода *Clavibacter*, таких как: *C. michiganensis*, *C. sepedonicus*, *C. insidiosus* (Philip et al., 1961; Philip et al., 1980).

Изучение ЭПС

ЭПС получали фильтрованием культуральной жидкости через ультрафильтр с номинальным пределом молекулярной массы 10000 Да, промывали осадок дистиллированной водой. Осадок лиофилизировали и хранили при температуре -20°C. Оказалось, что ЭПС видов *C. michiganensis* и *C. insidiosus* имеют одинаковый химический состав. Структурная формула повторяющегося звена экзополисахарида представлена на рисунке 7.

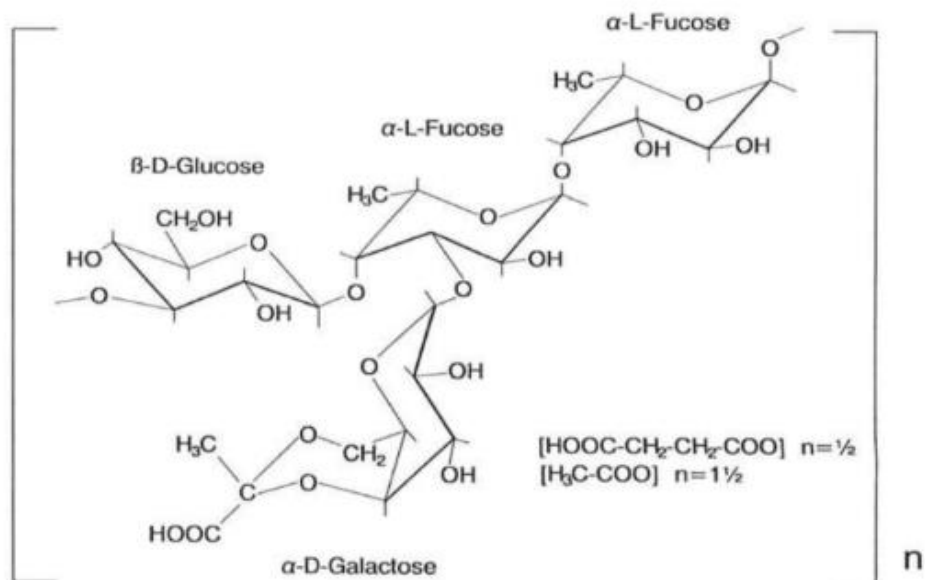


Рисунок 7. Структура повторяющегося звена экзополисахаридов *C. michiganensis*, *C. insidiosus* (Philip et al., 1980).

Роль ЭПС в жизнедеятельности бактерии и патогенезе

Как было выяснено, ЭПС могут защищать бактерии от высыхания, концентрировать минеральные и питательные вещества, уменьшать контакт с гидрофобными или заряженными макромолекулами и улучшать прикрепление к поверхностям. Во время патогенеза ЭПС могут принести пользу микроорганизму за счет долговременного удержания воды, накапливаемой в ЭПС с тканями растения-хозяина, защиты от токсичных молекул и минимизации взаимодействия с рецепторами растительных клеток, чтобы уменьшить защитные реакции хозяина и способствовать колонизации. ЭПС также, вероятно, играют определенную роль в возникновении симптомов болезни (особенно увядания) (Sutherland, 1988).

Таким образом, ЭПС играют важную роль в жизнедеятельности бактерии, а также в патогенезе.

Дальнейшие генетические исследования были проведены на двух штаммах *C. michiganensis*. На первом этапе в патогенном штамме *C. michiganensis* был поврежден ген, ответственный за биосинтез ЭПС. Однако штамм остался патогенным. На втором этапе исследования решили сравнить два штамма: фитопатогенный штамм, который вызывал заболевание растений, и дикий штамм, который не вызывал заболевание. Продуцируемый ЭПС у природного изолята и у вирулентного штамма, не отличается ни по составу, ни по количеству. Исследователи сравнили геномы обоих штаммов и показали наличие лишней плазмиды в патогенном штамме (Eichenlaub and Gartemann, 2011).

Таким образом, эксперименты выявили, что вирулентность не зависит от наличия ЭПС, этому есть два доказательства: 1) мутанты *C. michiganensis*, у которых был поврежден ген, ответственный за биосинтез ЭПС, были вирулентны; 2) природный изолят, не содержащий плазмиды, не вызывал болезни (Bermphohl et al., 1996).

2.4.2. Факторы вирулентности, кодируемые плазмидой

Вирулентность – это степень способности данного инфекционного агента заражать данный организм. В последние годы достигнут прогресс в понимании молекулярных механизмов, взаимодействия фитопатогенных бактерий с растениями-хозяевами. Это относится и к *C. michiganensis*. Проведение секвенирования генома и изучение молекулярных структур помогло в изучении механизмов взаимодействия *Clavibacter* с растением-хозяином, но на данном этапе недостаточно полно (Eichenlaub and Gartemann, 2011).

Геном типового штамма *Clavibacter michiganensis* состоит из циклической хромосомы с содержанием ГЦ 72,6 % и содержит две кольцевые плазмиды pCM1(27,4 т.п.н.; 66,5% ГЦ) и pCM2 (70,0 т.п.н., 67,6% ГЦ) (Gartemann et al., 2008). Для того чтобы штамм был патогенным, ему необходимы обе плазмиды и островок патогенности (PAI) размером 129 т.п.н., называемый *chp/tomA* PAI. Эти мобильные элементы кодируют различные протеазы, углевод-активные ферменты (CAZymes), экспансины и фермент томатиназу, которые, как считается, секретируются через пути Sec/Tat (Gartemann et al., 2008; Thapa et al., 2017). Недавно охарактеризованные вирулентные изоляты содержат от 0 до 3 плазмид, и их генетический состав до сих пор не изучен (Thapa et al., 2017). Также функции многих секретируемых белков в клетке не открыты (Peritore-Galve et al., 2020), однако функциональная генетика, геномика и современные технологии улучшают наше понимание общей роли отдельных генов (Nandi et al., 2018).

При проведении функциональных генетических исследований, из типового штамма извлекли плазмиды. В результате бактерия по-прежнему была способна размножаться с той же плотностью, что и патогенный штамм, но с нарушением системного распространения и отсутствием симптомов увядания (Meletzus et al., 1993). При добавлении по одной плазмиде способность к колонизации и симптомы увядания восстанавливались, но были с задержкой и симптомы увядания были менее тяжелыми (Meletzus et al., 1993). На основании этих экспериментов был сделан вывод о том, что плазмиды необходимы для патогенеза.

При спонтанной делеции области PAI *chp/tomA*, штамм потерял способность эффективно колонизировать растение-хозяина. Также функциональные анализы показали, что штаммы, лишённые *chp/tomA*, были лишены способности к системному распространению, агрегации *in vitro* и потеряли вирулентность при инокуляции в сосудистую систему и на листья. Эти

результаты подчеркивают важную роль области *chp/tomA* в колонизации и вирулентности патогена (Chalupowicz et al., 2012).

Плазмида *pCM2* содержит ген патогенности *pat-1*, кодирующий сериновую протеазу из подсемейства химотрипсина S1A (Таблица 6) (Dreier et al., 1997). Целенаправленная делеция гена *pat-1* в типовом штамме значительно снижала вирулентность, но не устраняла симптомы полностью (Dreier et al., 1997). Кроме того, при введении гена *pat-1* в авирулентный штамм, приводил к тому, что изоляты становились вирулентными (Dreier et al., 1997). Недавно обнаружены вирулентные штаммы *C. michiganensis* в Нью-Йорке и Калифорнии, не содержащие гена *pat-1*, но, тем не менее, способные вызывать симптомы (Thapa et al., 2017). Гомологи гена *pat-1* присутствуют на *pCM2* и *chp/tomA PAI (chpA-G)* (Dreier et al., 1997; Gartemann et al., 2008). Семь из девяти гомологов функционально охарактеризованы в типовом штамме, и только один из семи (*chpC*) показал роль в колонизации и гибели растения (Таблица 6) (Chalupowicz et al., 2017). 11 генов из семейства химотрипсина S1X, обозначенные *ppaA-ppaJ*, присутствуют в *pCM1*, *chp/tomA PAI* и в других участках хромосомы (Таблица 6) (Gartemann et al., 2008). Мутанты двух генов *ppaA* и *ppaC* были функционально охарактеризованы в эталонном геноме, где не имели значение в развитии увядания или листовых симптомов (Chalupowicz et al., 2017).

Плазмида *pCM1* содержит ген патогенности *celA*, кодирующий химерный белок состоящий из 3 структурных доменов: каталитический домен, за которым следует целлюлозосвязывающий домен и третий домен на С-конце, с низким сходством к растительным α -экспансином (Jahr et al., 2000). При частичной или полной делеции гена *celA*, умеренно вирулентные штаммы (содержащие только *pCM1*) полностью потеряли вирулентность, что устанавливало важную роль каждого домена *celA* в развитии симптомов увядания (Таблица 6) (Jahr et al., 2000). Аналогичным образом, транзиторная экспрессия *celA* в генетически модифицированных и природных этнофитных штаммах *C. michiganensis* восстанавливала симптомы увядания, но при этом не наблюдалось различия в плотности колонизации с *celA* или без него (Jahr et al., 2000; Thapa et al., 2017). Кроме того, недавние генетические исследования домена *celA* показали, что единственными компонентами, необходимыми для индукции увядания, являются целлюлаза и углеводсвязывающие домены (Hwang et al., 2018). Кроме того, мутации доменов каталитической целлюлазы полностью устраняли патогенность, что подчеркивает роль активности целлюлазы в развитии симптомов увядания (Hwang et al., 2018).

Другой химерный фермент *celB*, связывающий целлюлазу и углеводы кодируется в хромосоме (Таблица 6) (Gartemann et al., 2008). Однако *celB* не имеет сигнала секреции и является предполагаемым псевдогеном, из-за укороченного С-концевого домена (Gartemann et al., 2008). Разрушение *celB* не оказало значительного влияния на симптомы увядания (Chalupowicz et al., 2017). При функциональном анализе *celB* обнаружили, что, он не обладает целлюлазной

активностью и, будучи модифицированным для секреции, не смог восстановить вирулентность в мутантном штамме *celA* (Hwang et al., 2018). Несмотря на важность *celA* в патогенности, были охарактеризованы вирулентные штаммы, по природе лишенные гена *celA*. Таким образом, геном *C. michiganensis* кодирует множество секретируемых углеводно-активных ферментов (CAZymes), с предполагаемыми активностями ксиланазы, пектиназы и эндоглюканазы. (Таблица 6) (Gartemann et al., 2008; Thapa et al., 2017). Функциональная характеристика генов, кодирующих ксиланазу в идентифицированном типовом штамме, не выявила влияния на развитие симптомов (Chalupowicz et al., 2017). Было показано, что эндоглюканаза играет роль в образовании пузырей на поверхности, но не в индукции увядания. (Chalupowicz et al., 2017). Профилирование гликома сегментов стебля, инфицированных патогенными и непатогенными бактериями *C. michiganensis*, определили, что присутствие патогенных *C. michiganensis* действительно приводит к разрушению полисахаридов растительных клеток, в соответствии с набором углеводно-активных ферментов, закодированных в геноме (Thapa et al., 2017).

Таблица 6. Предполагаемые гены вирулентности и фенотипы тяжести бактериального рака при мутации каждого гена (Peritore, 2020)

Локация в клетке	Гены	Тяжесть мутантного заболевания	Локация в клетке	Гены	Тяжесть мутантного заболевания
Chymotrypsin subfamily S1A proteases			Cellulases		
PAI	<i>chpA</i>	-	pCM1	<i>celA</i>	Avirulent (wilt) ^a
PAI	<i>chpB</i>	-			
PAI	<i>chpC</i>	Reduced (wilt and blisters)	Chrom	<i>celB</i>	None (wilt and blisters) ^a
PAI	<i>chpD</i>	-			
PAI	<i>chpE</i>	None (wilt and blisters)	Xylanases		
PAI	<i>chpF</i>	None (wilt and blisters)	Chrom	<i>xysA</i>	None (wilt and blisters)
PAI	<i>chpG</i>	None (wilt and blisters)	Chrom	<i>xysB</i>	None (wilt and blisters)
pCM2	<i>pat-1</i>	Reduced (wilt) ^a	Pectinases		
pCM2	<i>phpA</i>	None (wilt)	Chrom	<i>pgaA</i>	Reduced (blisters); none (wilt)
pCM2	<i>phpB</i>	None (wilt)	PAI	<i>pelA1</i>	Reduced (wilt) ^b
Chymotrypsin-related serine proteases			PAI	<i>pelA2</i>	Reduced (wilt) ^b
PAI	<i>ppaA</i>	None (wilt and blisters)	Endoglucanases		
PAI	<i>ppaB1</i>	-	Chrom	<i>endXY</i>	Reduced (blisters); none (wilt)
PAI	<i>ppaB2</i>	-	Expansins		
PAI	<i>ppaC</i>	None (wilt and blisters)	pCM1	<i>CmEXLX1</i> (<i>CeIA</i> domain)	Reduced (wilt) ^a
PAI	<i>ppaD</i>	-	Chrom	<i>expA</i> (<i>CmEXLX2</i>)	Increased (wilt and bird's-eye lesions) ^b
PAI	<i>ppaE</i>	-			
Chrom	<i>ppaF</i>	-	Others		
Chrom	<i>ppaG</i>	-	Chrom	<i>perF</i> (perforin)	Reduced (blisters); none (wilt)
Chrom	<i>ppaH</i>	-	Chrom	<i>srtA</i> (sortase)	Reduced (blisters); none (wilt)
Chrom	<i>ppaI</i>	-	PAI	<i>tomA</i> (tomatinase)	None (wilt)
Chrom	<i>ppaJ</i>	-			
Subtilase proteases					
PAI	<i>sbtA</i>	Reduced (wilt and blisters)			
Chrom	<i>sbtB</i>	None (wilt and blisters)			
Chrom	<i>sbtC</i>	None (wilt and blisters)			

Также были изучены другие гены на их функции в вирулентности. В состав *chp/tomA* PAI входит секретлируемый фермент томатиназа, который дегликозилирует противомикробное соединение α -томатин до томатидина, устраняя его ингибирующие рост свойства. (Таблица 6) (Kaup et al., 2005).

Три гена, кодирующие субтилазную протеазу, присутствуют в *chp/tomA* PAI и других областях хромосомы (Таблица 6) (Gartemann et al., 2008). Мутация *chp/tomA* PAI кодируемая субтилаза (*SbtA*) приводила к уменьшению симптомов пузырчатости и системного увядания, но нарушение двух других генов не имело значительного эффекта (Chalupowicz et al., 2017).

Генетика патогенности и вирулентности *C. michiganensis* по большей части изучена посредством исследований типового штамма. Этот штамм и его производные являются отличным ресурсом для изучения взаимодействия *C. michiganensis* с растением-хозяином, однако исследования генетического разнообразия начали описывать патогенные штаммы, которым не требуется такой же генетический репертуар, как у изученного штамма, чтобы вызывать симптомы бактериального рака у томатов (Thapa et al., 2017). Дополнительные последовательности генома и функциональный генетический анализ различных изолятов могут дать более целостное понимание взаимодействия *C. michiganensis* и растений.

Таким образом, *C. michiganensis* взаимодействует с тканями растения-хозяина сложным образом, и этот процесс до сих пор плохо изучен (Chalupowicz et al. 2017; Nandi et al., 2018). Геномный анализ выявил остров патогенности и две плазмиды, необходимые для проявления полной патогенности типового штамма (Dreier et al., 1997; Gartemann et al., 2008; Jahr et al., 2000; Meletzus et al., 1993).

Эти мобильные элементы содержат несколько копий генов, кодирующих секретлируемые сериновые протеазы – углеводно активные ферменты, экспансины и томатиназу (Gartemann et al. 2008). Генетические исследования показали, что штаммы *C. michiganensis* имеют различное содержание генов и плазмид, которые способствуют проявлению вирулентности (Thapa et al. 2017).

Таким образом, изучение генома показало, что **патогенность опосредована** факторами вирулентности и регуляторами транскрипции, кодируемыми хромосомой и двумя природными плазмидами. К **факторам вирулентности** относятся сериновые протеазы, ферменты, разрушающие клеточную стенку (целлюлазы, ксиланазы, пектиназы) и другие.

2.4.3. Модуляция вирулентности

Важной особенностью взаимодействия возбудителя заболевания и его хозяина является регулирование численности зараженных растений. Поскольку нет устойчивых или толерантных сортов растений, заражение *C. michiganensis* приводит к вспышке заболеваний (Kleitman et al.,

2008). Однако существуют различные виды диких томатов устойчивые к *C. michiganensis*, у которых заражение проявляется практически без симптомов, при этом ксилема покрыта плотным слоем клеток патогена.

Устойчивость к бактериальному раку полигенна и сложна, но селекционные исследования выявили локусы количественных признаков в образцах, которые обеспечивают устойчивость за счет изменения толщины сосудов и увеличения накопления активных форм кислорода. Трансгенные растения, экспрессирующие противомикробные продукты, такие как пептид Snakin-2, гликопротеин, подобный экстензину, и белок эндолизин из бактериофага СМР1, уменьшают популяцию бактерий в растениях и уменьшают тяжесть симптомов. Более полному пониманию устойчивости хозяина может помочь идентификация генов, критически важных для устойчивости, и включить их в коммерческие сорта с помощью традиционных методов селекции и трансгенных подходов.

Также плазмиды рСМ1 и рСМ2 могут быть дезактивированы под воздействием стресса. Например, температура выше 30 °С, приводит к уменьшению вирулентности или даже ее потере (Meletzus et al., 1993).

При интеграции генов *celA* или *pat-1* в хромосому, или включении их в плазмиду, вирулентность восстанавливается. Таким образом, возможно, что в популяции *C. michiganensis*, потеря плазмид одной клеткой, может быть компенсирована повторным захватом плазмид из другой клетки вследствие горизонтального переноса генов.

Таким образом, мутационный анализ этих генов и профилирование экспрессии генов (с помощью количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, транскриптомики и протеомики) начали проливать свет на их роль в колонизации и вирулентности, тогда как экспрессия генов томата в ответ на инфекцию *Clavibacter michiganensis* предполагает растительные факторы, участвующие в ответной реакции защиты. Эти результаты могут помочь в создании целевых бактерицидов или новых устойчивых сортов томатов.

2.4.4. Диагностика и биоконтроль

Микроорганизмы рода *Clavibacter* способны вызывать скрытые инфекции и проникать в семена и клубни. Для контроля необходимы тщательные диагностические процедуры.

Классический анализ, тестирование на вирулентность после выделения патогена из растения путем культивирования на селективной среде, занимает много времени. Этот анализ применяется только тогда, когда молекулярные анализы дали положительный результат. Быстрым и надежным методом для обнаружения *Clavibacter* является использование ПЦР с использованием рекомендуемых праймеров (Dreier et al., 1995). Доступность геномных

последовательностей позволяет разработать новые, более эффективные диагностические процедуры ПЦР.

2.4.5. Способы борьбы с фитопатогенами рода *Clavibacter*

Обычные способы борьбы с заболеванием – это оптимальная агротехника, соблюдение севооборота, выращивание относительно устойчивых сортов, тщательное уничтожение растительных остатков, очистка семенного фонда от щуплых семян, протравливание семенного материала перед посевом, опрыскивание растений в период вегетации.

Различные виды химической обработки семян, растений или почвы были изучены для борьбы с *C. michiganensis*. Наиболее популярные из них включают соединения меди (хлорокись меди; CuSO_4); и бактерициды, такие как стрептомицин, манкоцеб [[Комплексное соединение этилен-N,N'-бис(дитиокарбамата) марганца, полимер с цинковой солью – химическое действующее вещество пестицидов (химический класс дитиокарбоматов), используется в сельском хозяйстве для борьбы с болезнями растений]] и их комбинации (de León et al., 2008). Хотя эти противомикробные соединения приводят к эффективному снижению титра бактерий, в конечном итоге они оказались недостаточными для защиты растений, а некоторые являются фитотоксичными или способствуют сопротивлению (de León et al., 2008; Yang et al., 2002). Другие фитосанитарные методы, такие как обработка семян подкисленным нитритом или 1% соляной кислотой, и обработка почвы формальдегидом, снижают как титр бактерий, так и развитие симптомов, но лишь частично эффективны против *C. michiganensis* (Kasselaki et al., 2011).

Другие, менее традиционные противомикробные препараты также изучаются для использования против *C. michiganensis*. Например, гексапептид проявляет сильную бактерицидную активность против *C. michiganensis* разрушая бактериальные клетки (Choi et al., 2014). Также были обнаружены двенадцать мощных низкомолекулярных ингибиторов *C. michiganensis*, которые представляют собой различные пиперидины, бензимидазолы, фенолы, феноксизопропаноламины и пирролидоны (Xu et al., 2015). При одноэтапном и последовательном анализе устойчивости после инкубации при летальных и сублетальных концентрациях каждого соединения не наблюдалось устойчивых колоний *C. michiganensis* (Xu et al., 2015). Однако применение различных сельскохозяйственных химикатов или антибиотиков сталкивается с различными проблемами, включая появление резистентных патогенов, проблемы со здоровьем окружающей среды и нормативные ограничения. Поэтому крайне важна детальная характеристика этих соединений.

Исследование с использованием **термотерапии** (горячая вода) для дезинфекции семян показало, что температуры 48°C и 52°C были эффективны для некоторых сортов семян, в то время как более высокие температуры (56°C, 60°C) пагубно сказываются на прорастании и жизнеспособности семян (Divsalar et al., 2014). Следовательно, применение этого экологичного подхода потребует определения оптимальной температуры и времени для конкретных сортов семян.

Биологические меры борьбы с *C. michiganensis*

Конкурирующие микроорганизмы или вирусы могут помочь ограничить рост фитопатогенов, производя бицидные вещества, индуцируя собственные механизмы устойчивости растений или непосредственно паразитируя на патогене. Большая часть таких агентов биологической борьбы состоит из ризобактерий, в том числе многих родов, способных эффективно колонизировать корни растений и подавлять проникновение почвенных патогенов (Weller, 1988).

Сообщалось о средствах биоконтроля, обладающих антагонистической активностью по отношению к *C. michiganensis*, включая обработку семян и корней флуоресцентными псевдомонадами в тепличных условиях. Обработка семян штаммами *Pseudomonas* и *Bacillus* улучшила качество семян томатов и значительно снизила заболеваемость бактериальным раком в полевых исследованиях (Kasselaki et al., 2011).

Бактерии рода *Pseudomonas* хорошо известны как антибиозы, один из ключевых механизмов биоконтроля, благодаря которому они могут продуцировать различные антимикробные метаболиты, включая феназины, пирролнитрин и цианистый водород (HCN), а также различные ферменты деградации для подавления болезней растений. Биологические меры борьбы с фитопатогенами, осуществляемые с помощью фагов, представляют собой многообещающий метод из-за его специфичности, простоты подготовки и недорогого производства (Jones et al., 2007).

Бактериофаг СМР1, первоначально выделенный из инфицированных *C. michiganensis* перезимовавших стеблей томатов, является членом семейства вирусов *Siphoviridae* и специфически инфицирует *C. michiganensis*. Его геном кодирует эндолизин с пептидазной активностью, который специфически лизирует *C. michiganensis*, но не другие бактерии (Wittmann et al., 2010). Сам фаг может иметь потенциал для предотвращения заражения *C. michiganensis*, но для более эффективного контроля его эндолизин был произведен рекомбинантно в растениях томатов, что придало им полную устойчивость к *C. michiganensis*. Однако применение бактериофагов для борьбы с болезнями растений дает разные результаты, а эффективного

подавления бактериального рака с помощью фагов до сих пор не удалось достигнуть, что требует дальнейшего исследования (Svircev et al., 2018).

Таким образом для борьбы с фитопатогенами рода *Clavibacter* используются разные химические, физические и биологические методы. Для эффективных мер борьбы с патогенами необходим анализ и глубокое изучение не только физиологических реакций, но и процессов, идущих на молекулярном уровне, что подразумевает изучение биохимии как самой клетки, так и клеточной стенки. А также, согласно химической структуре гликополимеров, они модулируют взаимодействие с факторами комплемента и служат небелковыми адгезинами, опосредующими прикрепление к различным типам клеток-хозяев.

ЧАСТЬ II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава III. Объекты и методы исследования

3.1. Объекты исследования и накопление биомассы актиномицетов

Информация о 9 изученных штаммах, источниках их выделения и патогенности содержится в Таблице 7. Штаммы получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина в Пущино-на-Оке.

Таблица 7. Исследуемые штаммы рода *Clavibacter*

Название организма	Источник выделения	Патоген/ эндофит
Типовые штаммы валидно опубликованных видов [https://lpsn.dsmz.de/genus/clavibacter , 2023]		
<i>C. insidiosus</i> ВКМ Ас-1402 ^T	Люцерна (<i>Medicago sativa</i> L)	патоген
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1403 ^T	Томат (<i>Solanum lycopersicum</i>)	патоген
<i>C. nebraskensis</i> ВКМ Ас-1404 ^T	Кукуруза-лист (<i>Zea mays</i>)	патоген
<i>C. tessellarius</i> ВКМ Ас-1406 ^T	Пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)	патоген
<i>C. phaseoli</i> ВКМ Ас-2641 ^T	Фасоль-семена (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	патоген
Штаммы-претенденты на новый вид		
<i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-2555*	Осока (<i>Carex</i> .sp.)	эндофит
<i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1371**	Солянка (<i>Salsola</i> sp.)	эндофит
<i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1372**	Акация (<i>Ammodendron</i> sp.)	эндофит
<i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1374**	Джужгун (<i>Calligonum</i> sp.)	эндофит

* выделен из лесостепной зоны заповедника Белогорье Белгородской области с семиаридным климатом, ** выделены из пустыни Кызыл-Кум с пустынным континентальным аридным климатом.

Результаты изучения нуклеотидной последовательности 16S рРНК штамма *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555 показали близость этой бактерии к *Clavibacter phaseoli* ВКМ Ас-2641^T (99.4% сходства, устное сообщение Л.И. Евтушенко), а также обладали типичными для этого рода хемотаксономическими характеристиками. Штаммы *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372 и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374 представляют три предполагаемых новых вида рода *Clavibacter* (Starodumova et al., 2018).

Культуры актиномицетов поддерживали в пробирках/чашках на агаризированных средах (Рисунок 8) либо в лиофильно высушенном состоянии. В качестве посевной и основной использовали пептонно-дрожжевую среду (Potekhina et al., 2011) следующего состава (г/л): пептон – 5; глюкоза – 5; дрожжевой автолизат – 10 мл; K₂HPO₄ – 0,2; вода водопроводная 1 л; рН = 7,0 – 7,2.

В колбы с питательной средой вносили по 5 мл посевной культуры и помещали их на качалки при 28 °С до достижения середины логарифмической фазы роста.

Биомассу, собранную в конце логарифмической фазы роста (~22 – 24 часа), отделяли от питательной среды центрифугированием, промывали 0,95%-ным водным NaCl, замораживали, хранили при – 20 °С и использовали для получения клеточных стенок.

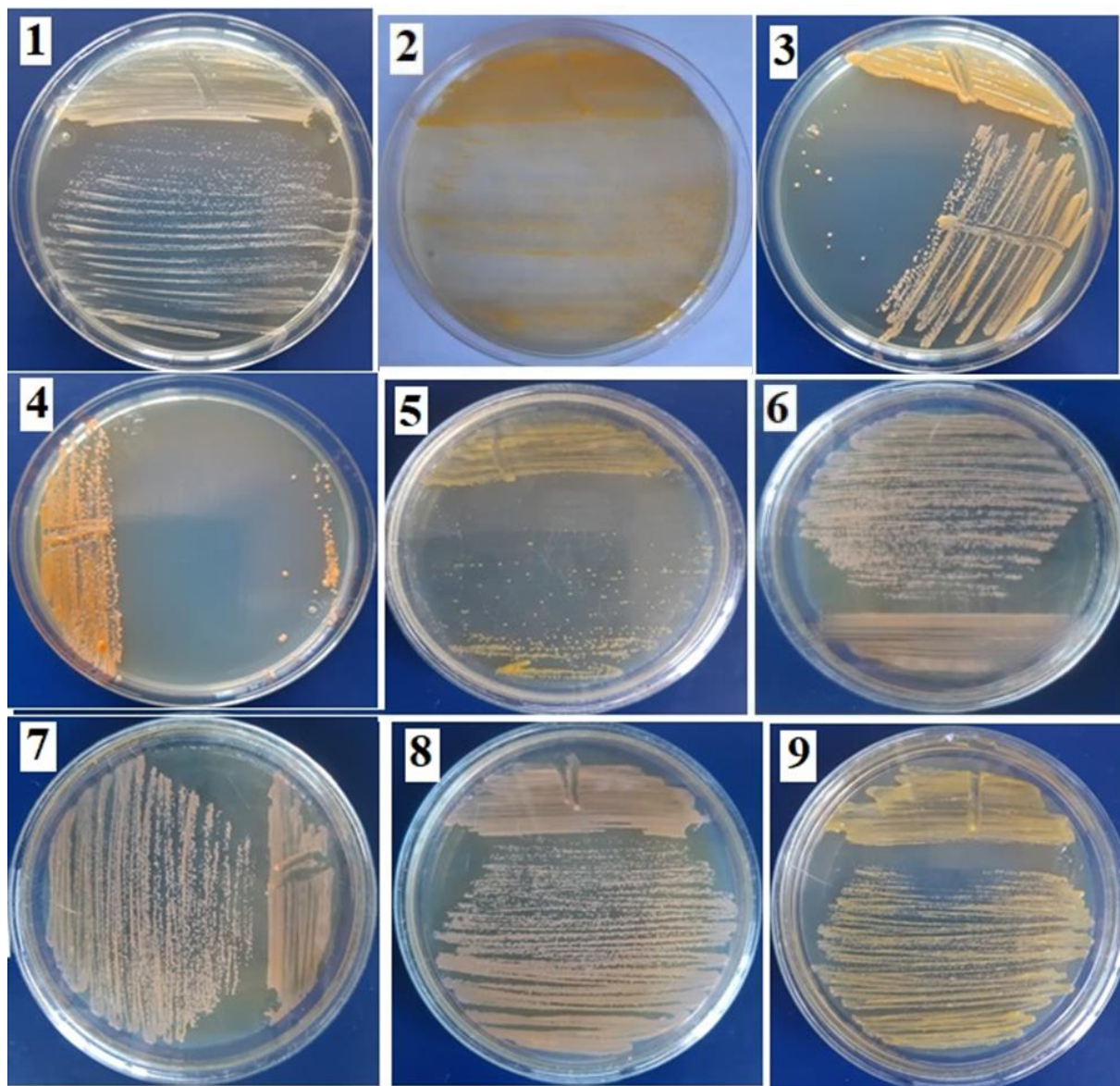


Рисунок 8. Актинобактерии рода *Clavibacter*, изучаемые в настоящей работе, выросшие на среде VNI Agar – производитель Research products international, USA, 48-72 часа. Типовые штаммы рода: 1 – *C. insidiosus* ВКМ Ac-1402^T; 2 – *C. michiganensis* ВКМ Ac- 1403^T, 3 – *C. nebraskensis* ВКМ Ac-1404^T; 4 – *C. tessellarius* ВКМ Ac-1406^T; 5 – *C. phaseoli* ВКМ Ac-2641^T; претенденты на новый вид: 6 – *Clavibacter* sp. ВКМ Ac-1371; 7 – *Clavibacter* sp ВКМ Ac-1372; 8 – *Clavibacter* sp. ВКМ Ac-1374; 9 – *Clavibacter* sp. ВКМ Ac-2555.

3.2. Получение клеточных стенок

Сырую биомассу клеток (модифицированный метод, Potekhina et al., 2011) суспендировали в холодной дистиллированной воде до кремообразного состояния, проводили обработку на ультразвуковом дезинтеграторе UP 100H («Hielscher», Германия), 30 кГц, 3–5 раз по 10 минут в ледяной воде с добавлением Ds-Na (2% по объему) с последующим нагревом суспензии при 100 °С в течение 10 минут для устранения возможных мембранных компонентов.

Затем клеточную стенку много раз (5-7 раз) промывали дистиллированной водой на центрифуге при 10000-12000 об/мин, каждый раз собирая рыхлый верхний слой. Полученную суспензию высушивали лиофильно.

По количеству фосфора нуклеиновых кислот, который определяли, как описано ниже (не более 0,2% от массы сухой клеточной стенки), оценивали чистоту клеточной стенки.

3.3. Выделение препаратов гликополимеров из клеточных стенок

Все методы получения углеводсодержащих полимеров клеточной стенки основаны на создании условия, для разрыва ковалентной связи между макромолекулой пептидогликана и выделяемым полимером. Это достигается двумя методами: химическими и ферментативными. В нашей работе использовали экстракцию трихлоруксусной кислотой.

К сухому препарату клеточной стенки (~500 мг) внесли 10%-ную ТХУ (1 : 10, вес/об). Проводили три последовательных экстракции (3×24 ч при 4 °С), каждый раз отделяя супернатант центрифугированием (12000 об/мин, 15 мин, 0 °С). Супернатанты объединяли, в течение 2-3 суток ставили диализ против дистиллированной воды, каждые 12 часов меняли воду, и лиофилизировали. Получали суммарный препарат гликополимеров, так называемая «холодная экстракция».

Оставшиеся от «холодной экстракции» клетки обрабатывали 5%-ной ТХУ 20 минут на водяной бане при температуре 90 °С. Клетки отделяли от полученного экстракта центрифугированием, как описано выше. Супернатант обрабатывали тем же способом (см. выше). Получали препарат гликополимеров – «горячая экстракция».

3.4. Очистка и разделение гликополимеров

3.4.1. Ионообменная хроматография гликополимеров

Суммарные препараты гликополимеров разделяли методом ионообменной хроматографии на колонке (80 × 1.5 см) с DEAE-целлюлозой (Тоуорpearl, Japan). Нейтральный полимер был элюирован 0,005 М, а кислый – 0,5 М фосфатным буфером (рН 6,3), при контроле элюции с помощью дифференциального рефрактометра («Knauer», Германия). Полученные фракции индивидуальных гликополимеров были обессолены на колонке (90 × 1,5 см),

загруженной TSK HW-40S- гелем (Toyoparl, Japan). Элюцию проводили 1%-ной уксусной кислотой, контролируя её, как описано выше. Фракции гликополимеров собирали, объединяли, диализовали против дистиллированной воды, лиофильно высушивали и исследовали методами ЯМР-спектроскопии.

3.5. Кислотный гидролиз клеточной стенки и препаратов гликополимеров

Для изучения моносахаридного состава и других продуктов деградации клеточных стенок и препаратов гликополимеров из них, проводили гидролиз 2М HCl.

К 0,5-5 мг изучаемого препарата внесли 0,02-0,1 мл кислоты, помещали смесь в капилляр или ампулу, а после запаивали. Гидролиз проводили при температуре 100 °С в течение 3 часов.

После гидролиза соляную кислоту удаляли выпариванием (после многократного добавления к образцу дистиллированной воды) при 40-60°С.

3.6. Нисходящая хроматография и электрофорез на бумаге

Методом нисходящей хроматографии на бумаге (БХ) и электрофореза на бумаге разделяли продукты гидролиза клеточной стенки и гликополимеров, а также проводили накопление отдельных полимеров или их фрагментов.

Для этого использовали хроматографическую бумагу Filtrak FN-3 (Германия). *Система растворителей для нисходящей хроматографии*

Использовали системы (соотношения даны по объемам):

1. Пиридин–бензол–бутан-1-ол–вода, (3 : 1 : 5 : 3), – для разделения моносахаридов, полиолов, гликозидов;
2. Пиридин–этилацетат– CH₃COOH–вода, (5 : 5 : 1 : 3), – для разделения аминасахаров;
3. пропан-1-ол–NH₄OH (2М), (7: 3)
- 4 амиловый спирт–5М муравьиная кислота, (1 : 1) } – для разделения органических кислот

Электорофорез проводили на приборе марки ФЭЗ (СССР) в ацетатно-пиридиновом буфере (А), рН 5,5–5,6 (пиридин – 11,8 мл, CH₃COOH_{лед} – 3,5 мл, вода дистиллированная – до 1000 мл) – для разделения фосфорных эфиров, анионных углеводсодержащих полимеров при градиенте потенциала 20 В/см в течение 4-х часов.

Проявители

1. **Фосфат- содержащие** соединения проявляли реактивом Ишервуда (Бенсон, 1960): 1 г молибдата аммония растворяли в 3 мл концентрированной HCl, добавляли 3 мл 60%-ной HClO₄, 8 мл дистиллированной воды и доводили до 100 мл ацетоном. Высушенная на воздухе фореграмма обрабатывалась реактивом Ишервуда, подсушивалась на воздухе и прогревалась при 100 °С ~ 3-5 мин (до светло-коричневого состояния), затем обрабатывали фореграмму водяным паром. Фосфорсодержащие соединения проявляются в виде голубых и синих пятен.

2. Соединения, содержащие **аминогруппу** (аминосахариды), проявляли нингидрином: 1 г нингидрина растворяли в 8 мл дистиллированной воды, добавляли 2 мл ледяной CH_3COOH и доводили ацетоном до 200 мл. Хроматограмму (фореграмму) обрабатывали этим раствором, высушивали на воздухе и прогревали при $100\text{ }^\circ\text{C} \sim 3$ мин. Соединения, содержащие аминогруппу, проявляются в виде розовых (фиолетовых) пятен.

3. **Полиолы, моносахариды, гликозиды** проявляли 5%-ным аммиачным раствором AgNO_3 . Хроматограмму/фореграмму, обработанную указанным реактивом, высушивали на воздухе и помещали в сушильный шкаф при $100\text{ }^\circ\text{C}$ на ~ 5 мин. Полиолы проявлялись в виде черных пятен, гликозиды и моносахариды в виде коричневых пятен.

4. **Моносахариды** проявляли также анилин-фталатом: к 1,66 г фталевой кислоты добавляли 0,75 мл анилина и все растворяли в 100 мл насыщенного водой бутан-1-ола (100-110 мл бутан-1-ола помещали в делительную воронку и добавляли 100-110 мл дистиллированной воды, перемешивали, оставляли на сутки, затем удаляли нижний водный слой). Хроматограмму обрабатывали приготовленным реактивом, высушивали на воздухе под тягой и прогревали при $100\text{ }^\circ\text{C}$ на ~ 5 мин. Гексозы проявлялись в виде коричневых, а пентозы – в виде розовых пятен.

5. **Пировиноградную кислоту** проявляли:

а) 0,04%-ным бромфенол-блау в 50%-ном водном этаноле; хроматограмму/фореграмму обрабатывали проявителем и высушивали на воздухе; пировиноградная кислота проявлялась в виде желтых пятен;

б) анилин-ксилозой ; 5 мл ароматического амина (анилина) и 5 г восстанавливающего сахара (ксилозы) растворяют в 100 мл 50%-ного водного этанола. Опрысканную этим реактивом хроматограмму нагревали при $125\text{-}130\text{ }^\circ\text{C} \sim 5$ мин; органические кислоты проявлялись в виде коричневых пятен.

3.7. Определение фосфора нуклеиновых кислот

К сухой навеске клеточной стенки (около 1 мг) добавляли 5 мл 6%-ной HClO_4 , гидролизовали на кипящей водяной бане 20 мин, охлаждали. Далее образцы фотометрировали при $\lambda 270$ нм и $\lambda 290$ нм, находили разницу в замерах, Δ .

Количество фосфора нуклеиновых кислот вычисляли по формуле:

$$P_{\text{нк}} = \Delta \cdot \text{Разв} \cdot 100\% / \gamma 0,19$$

$\Delta = E_{270} - E_{290}$; Разв – разведение; γ - навеска образца в гаммах; 0,19 – постоянный коэффициент.

3.8. Моносахаридный анализ полисахаридов

Сухой препарат полисахарида (1 мг) гидролизовали 2М трифторуксусной кислотой (CF₃CO₂H) в течение 2 часа при 120 °С. Моносахариды в виде ацетатов альдитов идентифицировали методом ГЖХ на хроматографе Maestro (Agilent 7820) (Interlab, Россия) с колонкой HP-5 (0,32 мм × 30 м) и температурной программой 160 °С (1 мин) до 290 °С при 7 °С мин⁻¹.

3.9. Определение абсолютной конфигурации моносахаридов

Сухой препарат полисахарида (1 мг) гидролизовали 2М трифторуксусной кислотой (ТФУ) в течение 2 час при 120°С. Кислоту отгоняли струей воздуха и добавляли толуол, который затем также отдували воздухом. Далее к образцу добавляли 15 мкл ангидрида ТФУ и 0,2 мл (+)-октан-2-ила и смесь нагревали при 120°С в течение 16 ч. Летучие соединения удаляли под струей воздуха, а остаток обрабатывали 0,1 мл уксусного ангидрида и 0,1 мл пиридина при 100°С в течение 1 ч. После высушивания образца под струей воздуха, его анализировали методом газожидкостной хроматографии на хроматографе Hewlett-Packard 5890А с капиллярной колонкой Ultra-1 (0,2 мм × 25 м) с OV-1 фазой при 180-290°С с азотом в качестве носителя. В качестве стандарта использовались аутентичные октил-D-гликозиды, приготовленные в аналогичных условиях, и их (±)-рацематы.

3.10. Методы ЯМР-спектроскопии для изучения первичной структуры гликополимеров

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) на ядрах углерода ¹³C является важнейшим методом структурного анализа сложных органических молекул. При изучении простейших сахаров, в конце 60-х годов прошлого века были проведены первые работы с применением данного метода (Шашков и Чижов, 1976– Цит. по Тульская, 2009). По итогу, к настоящему времени накопилось достаточно большое количество работ и публикаций, для того чтобы, анализируя их содержание, можно было сделать выводы о перспективности спектроскопии ¹³C-ЯМР, о её уникальных возможностях при решении структурных задач и о границах её применимости на данном этапе развития техники эксперимента.

ЯМР-спектроскопия высокого разрешения представляет собой ядерный резонанс растворов (как в нашем случае) или жидких веществ, позволяющий исследовать число, положение и интенсивность линии в спектре (Шашков и Чижов, 1976, Цит. по Тульская, 2009). На сегодняшний день были исследованы и созданы новые подходы к изучению структуры углеводных цепей без деструкции и какой-либо модификации молекулы полимера, что особенно ценно.

Одномерную ¹H- и ¹³C-ЯМР спектроскопию использовали для оценки степени регулярности ОПС, а в случае регулярных полимеров – для определения размера

повторяющегося звена по числу сигналов аномерных атомов углерода и количества аминокислот в повторяющемся звене по числу сигналов атомов углерода, связанных с азотом. Отнесение сигналов в одномерных спектрах проводилось с использованием двумерных экспериментов $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, TOCSY, ROESY, $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC и HMBSC. Размер моносахаридных циклов и конфигурацию гликозидных связей определяли по величинам констант спин-спиновой взаимодействия вицинальных протонов и характерным химическим сдвигам ^1H и ^{13}C . Положения замещения моносахаридных остатков подтверждали на основании α - и β -эффектов гликозилирования. Последовательность остатков в повторяющихся звеньях определяли по ядерным эффектам Оверхаузера в спектрах $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY и данным $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBSC спектров, выявляющих корреляции между аномерными и неаномерными связевыми атомами соседних моносахаридных остатков на упомянутых выше эффектах замещения.

3.10.1. Условия проведения ЯМР-эксперимента

Спектры ЯМР снимались на спектрометре Bruker Avance 600 для растворов препаратов в D_2O (99,96%) при 30° . В качестве внутренних стандартов для калибровки спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР использовались TSP (δH 0,0) и ацетон (δC 31,45) соответственно. Были использованы стандартные методики и математическое обеспечение фирмы «Bruker» (Германия) для съемки и обработки двумерных спектров. Время смешивания в экспериментах TOCSY составляло 100 мс, длительность импульса для спин-лока в эксперименте ROESY – 150 мс, эксперимент HMBSC был оптимизирован для константы $J_{\text{H,C}} = 8$ Гц.

Глава IV. Моносахаридный состав и структуры гликополимеров клеточных стенок изучаемых актинобактерий¹

В настоящей главе приведены результаты исследования моносахаридного состава и структур гликополимеров клеточных стенок девяти штаммов рода *Clavibacter* (Таблица 8). Структуры гликополимеров, присутствующих в клеточных стенках, являются важным фактором для понимания разнообразных функций микроорганизмов и потенциального использования этих полимеров в таксономии актиномицетов. В этой главе приведены результаты исследования структур гликополимеров клеточных стенок, изученных нами актинобактерий рода *Clavibacter*. К моменту начала наших исследований гликополимеры клеточных стенок представителей рода *Clavibacter* не были изучены.

4.1. Изучение клеточных стенок исследуемых актинобактерий

Для того, чтобы избавиться от примеси мембраны, цитоплазмы, капсул, экзополисахаридов и иметь чёткие представления о моносахаридах клеточной стенки, необходимо было получить из биомассы клеток клеточную стенку достаточной степени чистоты, что явилось первым этапом наших исследований.

¹ Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова:

1. **Kim D.**, Shashkov A.S., Dmitrenok A.S., Potekhina N.V., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I., Tul'skaya E.M. Novel galactofuranan and pyruvylated galactomannan in the cell wall of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* VKM Ac-1403^T // Carbohydrate research. – 2021. – V. 500. – P.108247. DOI: 10.1016/j.carres.2021.108247 (**IF WoS – 3,1, Q 2; IF SJR – 0,464, Q 2**). Вклад автора в печатных листах: 0,871/0,61). (Здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).
2. Shashkov A.S., Potekhina N.V., **Kim D.**, Dmitrenok A.S., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I., Tul'skaya E.M. Cell wall galactofuranan and pyruvate-containing galactomannan in the cell walls of *Clavibacter* strains // Carbohydrate Research. – 2021. – V. 510. – P. 108435. DOI: 10.1016/j.carres.2021.108435 (**IF WoS – 3,1, Q 2; IF SJR – 0,464, Q 2**). (2,20/0,88)
3. Perepelov A.V., **Kim D.**, Tul'skaya E.M., Potekhina N.V., Dmitrenok A.S., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I., Shashkov A.S. A novel cell wall galactofuranan in *Clavibacter phaseoli* VKM Ac-2641^T // Carbohydrate Research. – 2023. – V. 525. – P. 108778. DOI: 10.1016/j.carres.2023.108778 (**IF WoS – 3,1, Q 2; IF SJR – 0,464, Q 2**). (0,544/0,218)
4. Perepelov A.V., Shashkov A.S., **Kim D.**, Potekhina N.V., Dmitrenok A.S., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I., Tul'skaya E.M. A highly branched novel galactofuranan in the cell wall of *Clavibacter tessellarius* VKM Ac-1406^T // Carbohydrate Research. – 2023. – V. 529. – P. 108823. DOI: 10.1016/j.carres.2023.108823 (**IF WoS – 3,1, Q 2; IF SJR – 0,464, Q 2**). (0,653/0,261)
5. Tul'skaya E.M., **Kim D.**, Potekhina N.V., Shashkov A.S., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. Cell wall galactofuranans and galactomannan as chemotaxonomic characteristics of the *Clavibacter* genus and its species // Microbiology. – 2024. – V. 93. – № 1. – P. 28-34. <https://doi.org/10.1134/S0026261723603007> (**IF WoS – 1,51, Q 4; IF SJR – 0,35, Q3**). (0,782/0,313)

Таблица 8. Результаты исследования клеточных стенок

Исследуемые штаммы рода <i>Clavibacter</i>	Фосфор нуклеи- новых кислот, % Р	Кислотный гидролиз (2 М НСl, 100 °С, 3 ч) Хроматография на бумаге	
		Наличие пировиноградной к-ты	Сахара клеточных стенок (следы Glc - все штаммы)
<i>C. insidiosus</i> Ac-1402 ^T	0,065	+	Gal, Man, Fuc, (Rib), Rha, GlcN
<i>C. michiganensis</i> Ac-1403 ^T	0,110	+	Gal, Man, Fuc, Rha, GlcN
<i>C. nebraskensis</i> Ac-1404 ^T	0,082	+	Gal, Man, Fuc, Rha, GlcN
<i>C. tessellarius</i> Ac-1406 ^T	0,079	+	Gal, Man, Fuc, Rha
<i>C. phaseoli</i> Ac-2641 ^T	0,102	+	Gal, Man, Rib
<i>Clavibacter</i> sp. Ac-2555	0,069	+	Gal, Man, Rib
<i>Clavibacter</i> sp. Ac-1371	0,075	+	Gal, Man, Rib
<i>Clavibacter</i> sp. Ac-1372	0,066	+	Gal, Man, Rib
<i>Clavibacter</i> sp. Ac-1374	0,078	+	Gal, Man, Rib

Фосфор нуклеиновых кислот ($P_{нк}$) для всех девяти штаммов не превышал 0,2% от массы взятой для опыта навески клеточной стенки (Таблица 8), что свидетельствовало о **достаточной степени чистоты** полученных клеточных стенок от примесей неразрушенных клеток и цитоплазматической мембраны.

В кислотных гидролизатах образцов полученных клеточных стенок методом электрофореза выявляли присутствие фосфорных эфиров, а методом нисходящей хроматографии на бумаге изучали состав моносахаридов в них (Рисунок 9, Рисунок 10) и наличие пировиноградной кислоты.

В клеточных стенках был обнаружен только минеральный фосфат, таким образом, **присутствие фосфорных эфиров выявлено не было**. Эти данные свидетельствуют об отсутствии фосфатсодержащих гликополимеров в клеточных стенках исследованных клавибактерий.

Клеточные стенки всех исследованных в этой работе штаммов содержали галактозу, маннозу, а также следовые количества глюкозы; у некоторых штаммов дополнительно обнаружены фукоза, рамноза, глюкозамин и рибоза (Таблица 8).

В кислотных гидролизатах клеточных стенок типовых штаммов выявлены (Рисунок 9):

- *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T галактоза (преобладает), манноза, фукоза, рамноза и глюкозамин, а также следовое количество рибозы;
- *C. michiganensis* ВКМ Ас- 1403^T галактоза, манноза, фукоза, рамноза, глюкозамин;
- *C. nebraskensis* ВКМ Ас- 1404^T галактоза, манноза, фукоза, рамноза, глюкозамин; на электрофореграммах найден минеральный фосфат и минимальное количество глицерофосфата (вероятно, из области связи гликополимеров с пептидогликаном).
- *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T галактоза (преобладает), манноза, фукоза и рамноза;
- *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T галактоза и манноза, рибоза.

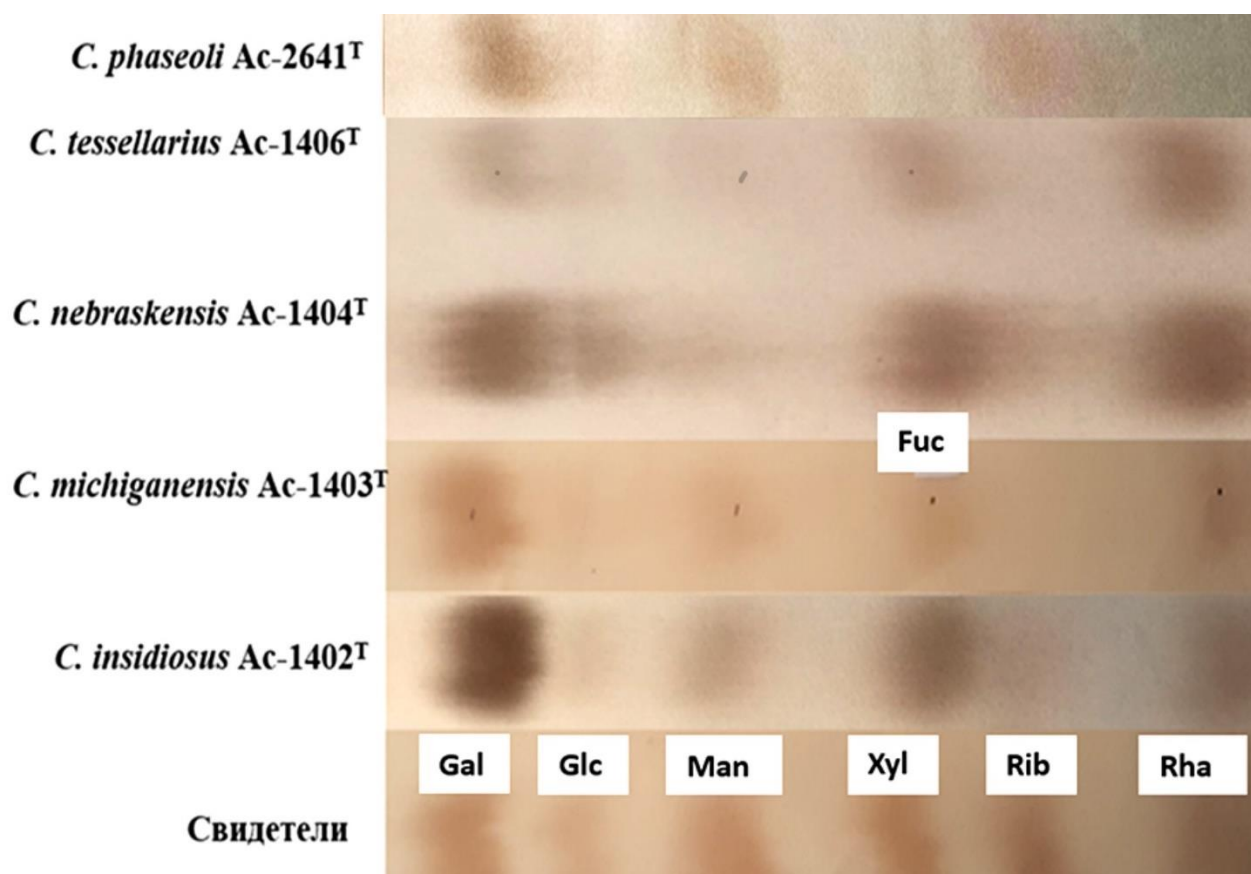


Рисунок 9. Хроматограммы кислотных гидролизатов клеточных стенок (проявлено: 1-азотнокислое серебро в аммиаке; 2-анилинфталат): *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T (1); *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T (2); *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T (1); *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T (1); *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T (2). Свидетели – (2).

В кислотных гидролизатах клеточных стенок штаммов-претендентов на новый вид выявлены (Рисунок 10):

- *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555 галактоза, манноза, рибоза и следовые количества глюкозы;
- *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371, ВКМ Ас-1372, ВКМ Ас-1374 были обнаружены моносахариды: галактоза, манноза, рибоза.

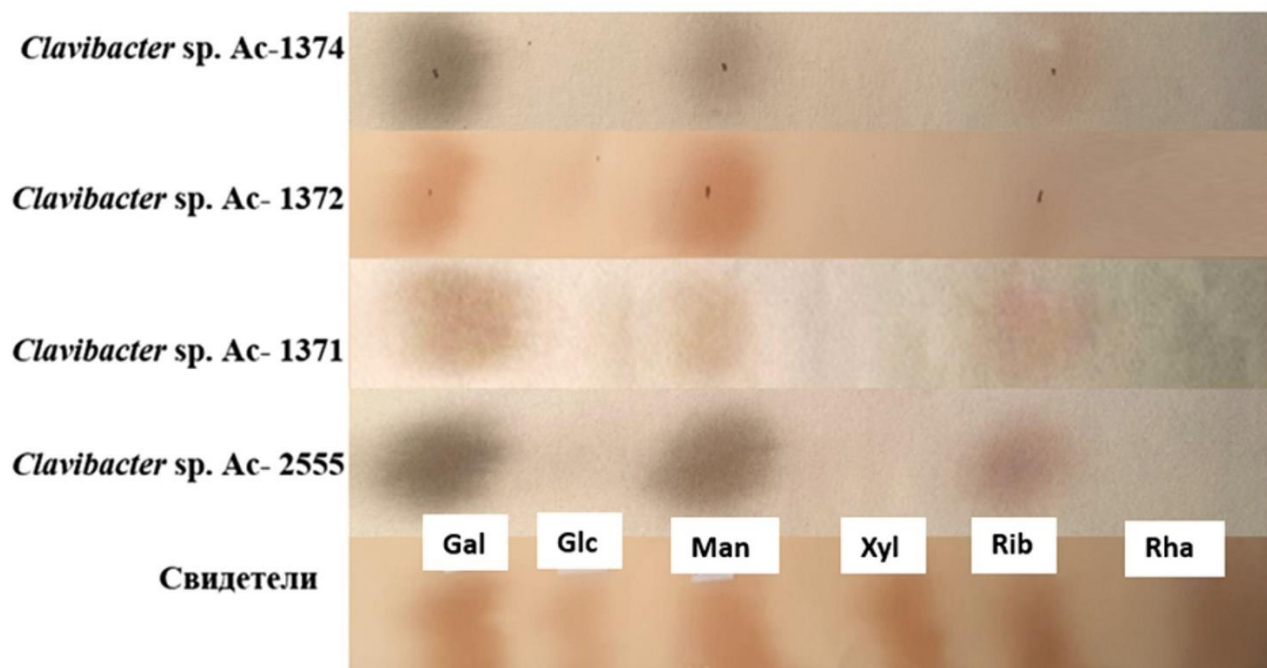


Рисунок 10. Хроматограммы кислотных гидролизатов клеточных стенок (проявлено: 1-азотнокислое серебро в аммиаке; 2-анилинфталат): *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555 (1) и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371 (2), *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372 (2), *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374 (1). Свидетели – (2).

Гидролизаты клеточных стенок исследуемых актинобактерий были проверены на присутствие пировиноградной кислоты, поскольку по данным авторов (Philip et al., 1980) актинобактерии рода *Clavibacter* синтезируют содержащие пировиноградную кислоту экзополисахариды. Методом хроматографии на бумаге в двух системах растворителей: щелочной (система 3) и кислой (система 4) (см. главу III, раздел 3.6.) показано **наличие в клеточных стенках пировиноградной кислоты** для всех девяти штаммов (Таблица 8).

Итак, отметим, что изучение гликополимеров клеточных стенок всегда сопряжено:

- 1) с получением клеточных стенок;
- 2) оценкой чистоты полученных образцов клеточных стенок;
- 3) изучением моносахаридного состава клеточных стенок;

4) изучением клеточных стенок на присутствие/отсутствие фосфорных эфиров.

Таким образом, дальнейшее выделение гликополимеров из клеточных стенок, но не из целых клеток, обеспечивает чёткую их локализацию, а также значимую степень чистоты выделяемых полимеров.

4.2. Гликополимеры клеточных стенок *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T

C. michiganensis ВКМ Ас-1403^T – карантинный вид, поражающий томаты, широко распространён в различных странах мира (<https://gd.eppo.int> 2024; Таблица 5; Рисунок 5).

Препараты гликополимеров I и II были получены различными ТХУ экстракциями, для более полного их извлечения из клеточной стенки названного фитопатогена. Эти препараты, а также выделенные из них *полисахариды 1* и *2* исследованы химическими методами и методами ЯМР-спектроскопии. Были сняты одномерные ЯМР-спектры 2 – 3%-ных растворов полисахаридов в 99,96%-ной дейтерированной воде. Строение *полисахаридов 1* и *2* установлено на основании их двумерных гомоядерных ¹H, ¹H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных ¹H, ¹³C HSQC и HMBC спектров.

4.2.1. Изучение гликополимеров клеточной стенки химическими методами

В гидролизатах исследованных клеточных стенок (2М HCl, 100 °С, 2ч) и препаратов I и II фосфатсодержащие соединения не обнаружены. Выявлено, что моносахаридный состав гидролизатов клеточной стенки и препарата II качественно идентичны и включали галактозу и маннозу, а также фукозу, рамнозу, глюкозамин и следовые количества глюкозы (последняя только в гидролизате клеточной стенки). Кислые гидролизаты препарата холодной экстракции I содержали галактозу, глюкозамин, фукозу и рамнозу. Эти результаты свидетельствовали о наличии не менее двух гликополимеров в клеточной стенке исследуемого штамма.

ГЖХ-хроматография гидролизата *полисахарида 1* выявила GlcN, Rha, Fuc и Gal в соотношении 1 : 1: 1 : 2. Гидролизат *полисахарида 2* содержал Gal и Man в соотношении 1 : 2. Абсолютную конфигурацию моносахаридов (*полисахаридов 1* и *2*) устанавливали по известной методике.

Оказалось, что все сахара имеют D-конфигурацию, кроме рамнозы, имеющей L-конфигурацию. Изучение эффектов гликозилирования в спектре ЯМР ¹³C *полисахарида 1* показало, что относительно большой (+7,4 м.д.) эффект гликозилирования для C-1 GlcpNAc в дисахаридном фрагменте β-GlcpNAc-(1→3)-α-L-Rhap-(1→ определенно указывает на D-конфигурацию гликозилирующего сахара (β-D-GlcpNAc).

4.2.2. ЯМР исследование структур полисахаридов 1 и 2

^{13}C ЯМР-Спектр препарата I (Рисунок 11а, Таблица 9) был типичным для полисахарида с регулярной повторяющейся единицей. Он содержал пять сигналов примерно равной интегральной интенсивности в аномерной области δ_{C} 100–110 м.д., два сигнала 6-дезоксисахаров (при 16,5 и 17,9 м.д.) и сигнал группы CH_3 от N-ацетила при 23,5 м.д. Остальные сигналы располагались в области δ_{C} 57–86,1 м.д.

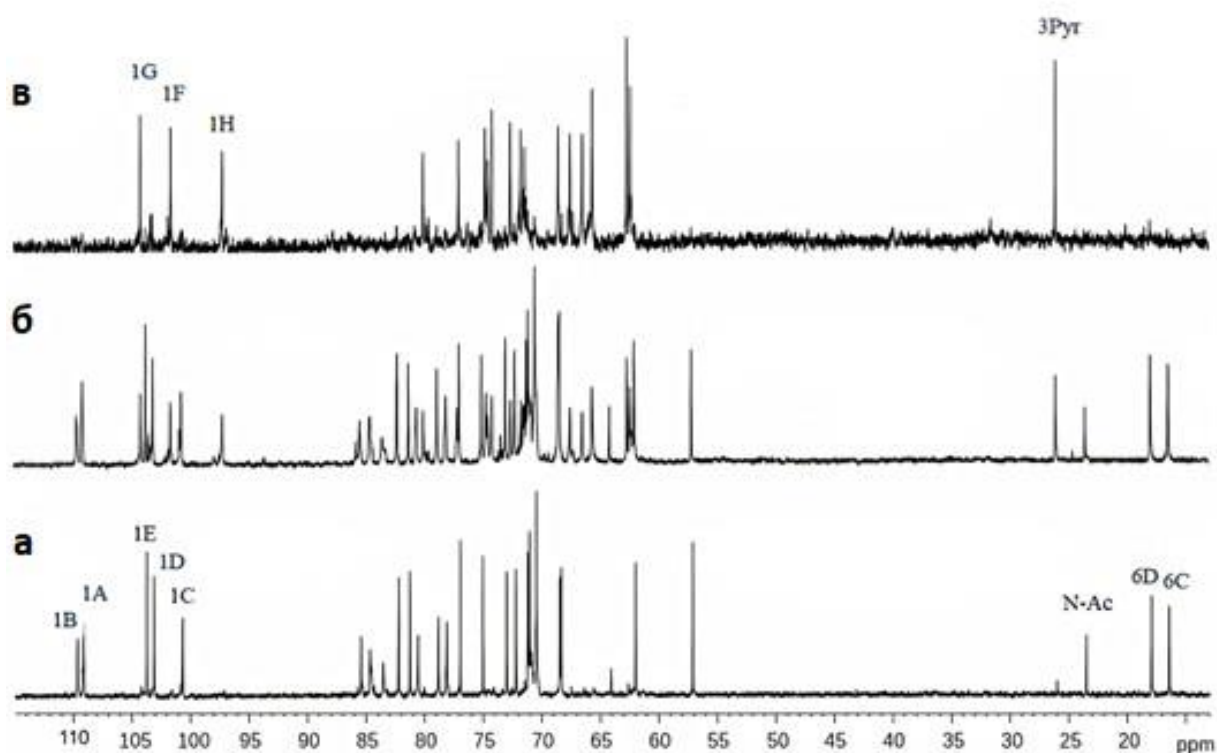


Рисунок 11. ^{13}C ЯМР-Спектры: а) препарата I (полисахарид 1); б) препарат II; в) полисахарид 2 клеточной стенки *S. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T. Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 9.

^1H ЯМР-Спектр (Рисунок 12а, Таблица 9) также содержал пять сигналов в аномерной области δ_{H} 4,7–5,1, два сигнала 6-дезоксисахаров (δ_{H} 1,24 и 1,28, 15,6 Гц) и сигналы для N-ацетильных групп при 2,05 м.д.

^{13}C ЯМР-Спектр препарата II (Рисунок 11б) содержал в аномерной области все пики, характерные для спектра препарата I и дополнительно три сигнала при 97,2, 101,5 и 104,0 м.д. Интенсивный новый сигнал при 26,1 м.д. наблюдался также в области сильного поля. Последний сигнал характерен для пируватного фрагмента с шестичленным циклом и экваториальным метилом в цикле. Предполагая, что препарат содержит смесь нейтральных и кислых полисахаридов, мы попытались разделить их с помощью хроматографии на DEAE (см. раздел 3.4.).

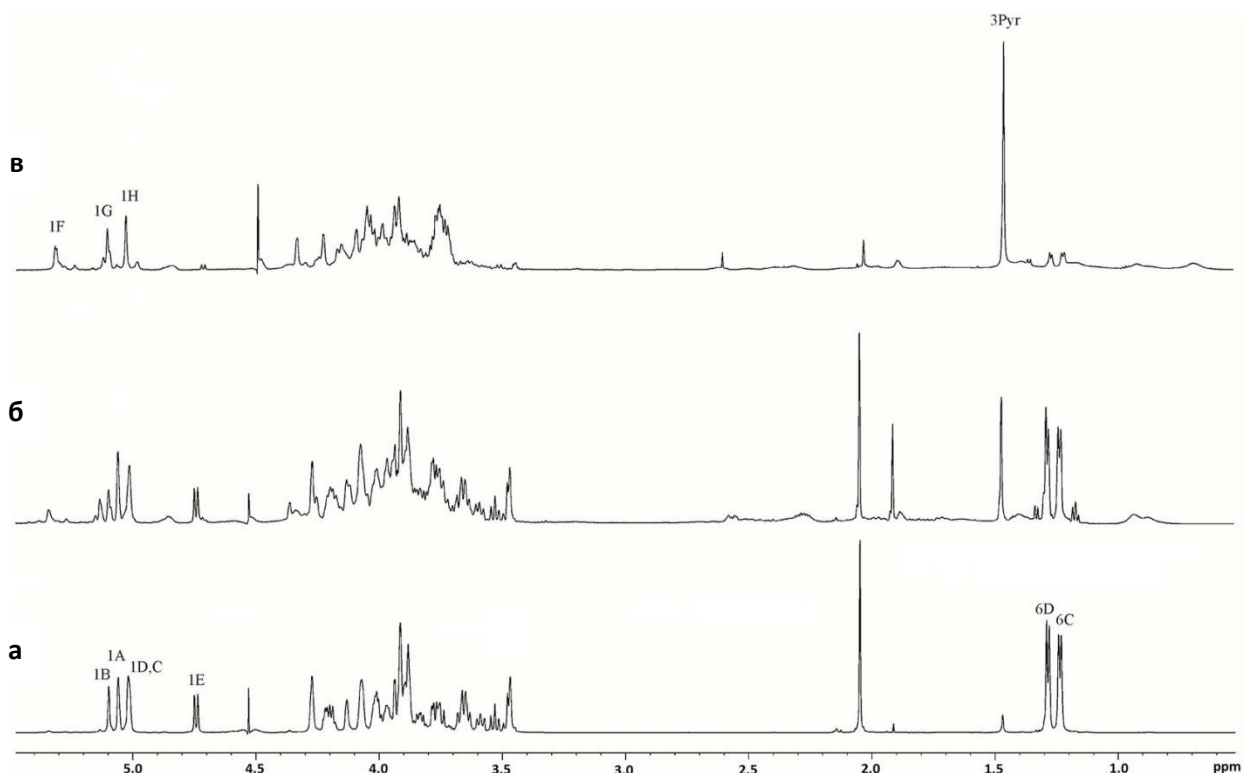


Рисунок 12. ^1H ЯМР-Спектры: а) препарата I (*полисахарид 1*); б) препарат II; в) *полисахарид 2* клеточной стенки *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T. Арабские цифры относятся к атомам протонов в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 9.

Нейтральная фракция по спектрам ЯМР идентична препарату I и содержит нейтральный полисахарид (*полисахарид 1*). В спектрах ЯМР кислой фракции присутствуют все сигналы нового кислого полисахарида (*полисахарид 2*) (Рисунок 11в, 12в).

Структуры *полисахаридов 1* и *2* установлены на основании их двумерных гомоядерных ^1H , ^1H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных ^1H , ^{13}C HSQC и HMBC спектров с учетом данных об абсолютной конфигурации сахаров.

4.2.2.1. ЯМР-исследование нейтрального *полисахарида 1*

Анализ спектров ^1H , ^1H COSY, TOCSY и ROESY выявил наличие двух остатков β -галактофуранозы (β -Gal f , остатки **A** и **B** в Таблице 9), α -фукопиранозы (α -Fuc p , **C**), α -рамнопиранозы (α -Rha p , **D**) и 2-ацетамидо-2-дезоксид- β -D-глюкопираноза (β -Glc p NAc, **E**).

Спектр ^{13}C ЯМР (Рисунок 11а, Таблица 9) расшифрован с использованием спектра ^1H , ^{13}C HSQC (Рисунок 13, Таблица 9). Анализ спектра ^1H , ^{13}C HSQC выявил положение замещения в остатках сахаров на основе сравнения их химических сдвигов ^{13}C со сдвигами исходных пираноз и фураноз (Bock, Pedersen, 1983). Остатки β -Gal f оказались замещенными в положениях 6 (**A**, $\delta_{\text{C}}-6$ 70,3) и 3,6 (**B**, $\delta_{\text{C}}-3$ 85,4 и $\delta_{\text{C}}-6$ 70,3 соответственно), остатки α -Fuc p в положении 2 (**C**, $\delta_{\text{C}}-2$ 78,8), концевыми оказались остатки α -Rha p в положении 3 (**D**, $\delta_{\text{C}}-3$ 81,2) и β -D-Glc p NAc (**E**).

Последовательность остатков в повторяющемся звене определена при анализе спектра ^1H , ^1H ROESY (Рисунок 14) и подтверждена анализом спектра ^1H , ^{13}C HMBC (Рисунок 15).

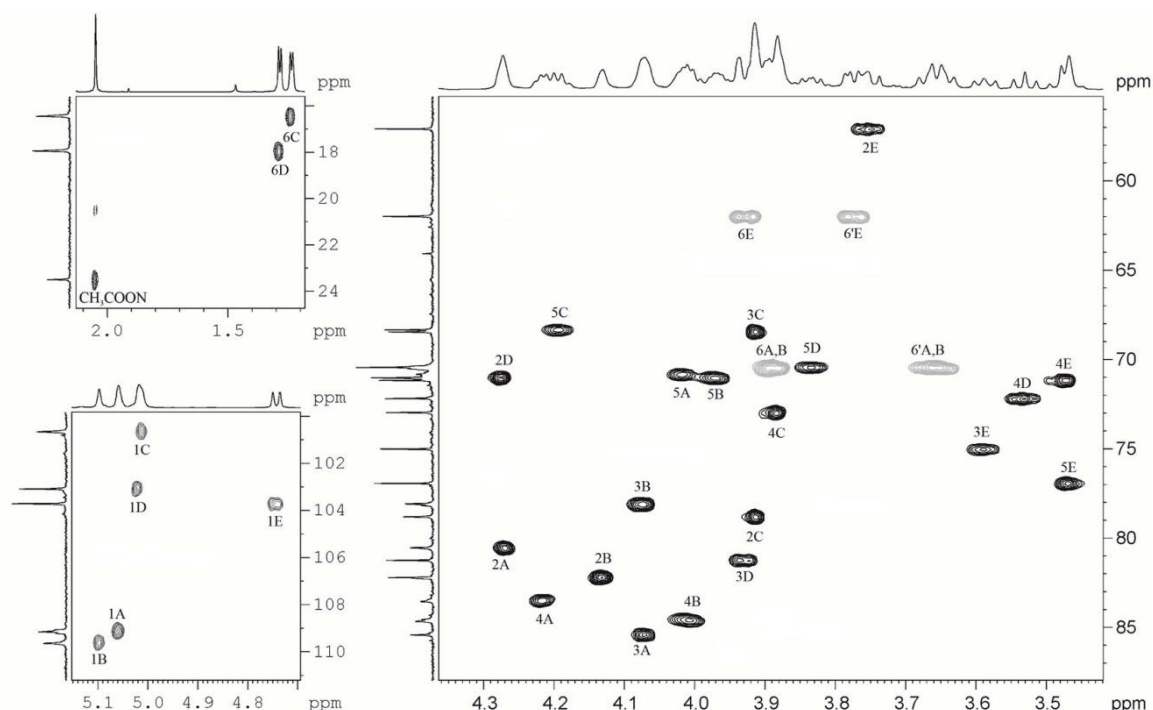


Рисунок 13. Части двумерного спектра ^1H , ^{13}C HSQC полисахарида 1 клеточной стенки *S. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T. Соответствующие фрагменты одномерных спектров ЯМР ^1H и ^{13}C представлены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 9.

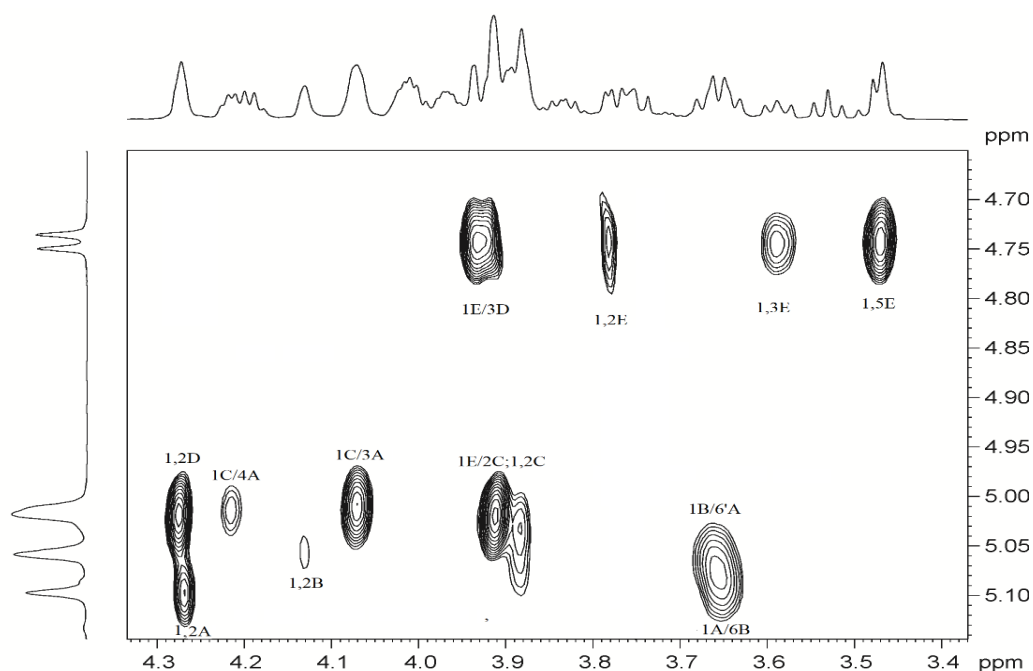


Рисунок 14. Часть 2D ^1H , ^1H ROESY спектра полисахарида 1 клеточной стенки *S. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T. По осям показаны соответствующие части ^1H ЯМР спектра. Арабские цифры относятся к атомам протонов в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 9. Косая черта используется для обозначения пиков между остатками.

Спектр ^1H , ^1H ROESY (Рисунок 14, Таблица 9) выявил следующие корреляционные пики между остатками: Н-1(А)/Н-6' (В) (5,05/3,65), Н-1(В)/ Н-6'(А) (5,10/3,63), Н-1(С)/Н-3(В) (5,01/4,07), Н-1(Д)/Н-2(С) (5,02/3,92) и Н-1(Е)/Н-3(Д) (4,75/3,93). Спектр ^1H , ^{13}C НМВС (Рисунок 15, Таблица 9) содержал среди прочего следующие корреляционные пики между остатками: Н-1(А)/С-6(В) (5,05/3,88), Н-1(В)/С-6(А) (5,10/3,88), Н-1(С)/С-3(В) (5,01/85,4), Н-1(Д)/С-2(С) (5,02/78,8), и Н-1(Е)/С-3(Д) (4,75/81,2).

Таблица 9. Химические сдвиги в спектрах ЯМР (TSP δ_{C} – 1,6 м.д. и δ_{H} 0.00 м.д.) для гликополимеров клеточной стенки *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403[†]

Остаток		C1 <i>H1</i>	C2 <i>H2</i>	C3 <i>H3</i>	C4 <i>H4</i>	C5 <i>H5</i>	C6 <i>H6, H6'</i>
Полисахарид 1							
→ 6)-β-Galf-(1→	A	109.3 5.05	82.2 4.14	78.1 4.08	84.7 4.01	71.2 3.97	70.3 3.88, 3.63
→ 6)-β-Galf-(1→ 3)	B	109.6 5.10	80.5 4.27	85.4 4.07	83.5 4.22	71.0 4.02	70.3 3.88, 3.65
↑ → 2)-α-D-Fucp-(1	C	100.7 5.01	78.8 3.92	68.4 3.92	73.0 3.88	68.3 4.19	16.5 1.24
→ 3)-α-L-Rhap-(1→	D	103.1 5.02	71.2 4.28	81.2 3.93	72.2 3.53	70.2 3.83	17.9 1.28
β-D-GlcpNAc-(1→	E	103.8 4.75	57.1* 3.75	75.0 3.59	71.2 3.48	76.9 3.47	62.0 3.93, 3.77
Полисахарид 2							
→ 3)-α-D-Galp-(1→	F	101.5 5.34	68.4 3.94	74.6 4.09	66.4 4.25	72.5 4.08	62.7 3.90, 3.77
→ 3)-α-D-Manp-(1→ 4) 6) ∖ C /\ HOOC CH ₃	G	104.0 5.12	71.6 4.36 103.3	77.1 4.18	74.6 4.07	65.6 3.94	65.4 4.00, 3.75
→ 3)-α-D-Manp-(1→	H	97.2 5.06	71.3 4.12	80.0 4.05	67.5 3.78	74.1 3.94	62.1 3.93, 3.78

*OAc: δ_{C} 23.8, 174.2 and δ_{H} 2.02

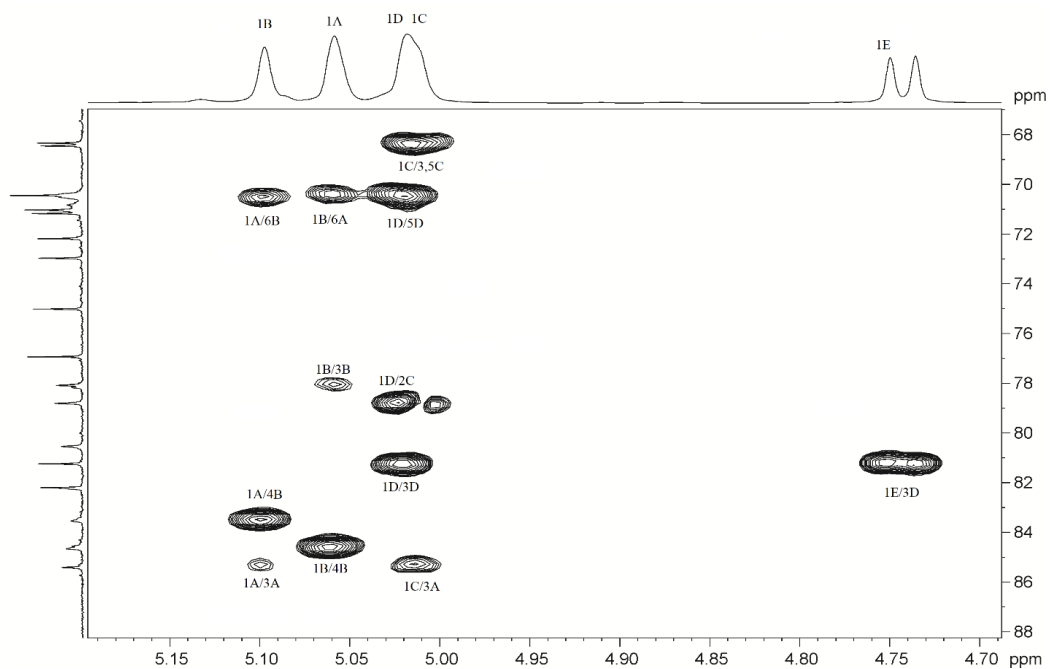
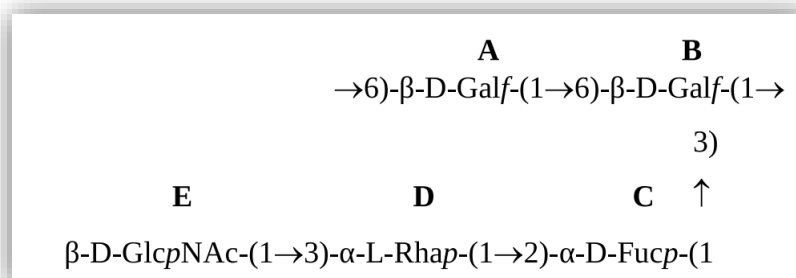


Рисунок 15. Часть двумерного $^1\text{H},^{13}\text{C}$ НМВС спектра полисахарида 1 клеточной стенки *S. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T. Соответствующие части одномерных ^1H и ^{13}C ЯМР спектров представлены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры перед косой чертой относятся к протонам, а после косой черты – к атомам углерода в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 9.

На основании полученных данных и с учетом абсолютной конфигурации сахаров повторяющееся звено полисахарида можно представить следующим образом:



Полисахарид 1

4.2.2.2. ЯМР-исследование кислого полисахарида 2

В спектре ^1H ЯМР (Рисунок 12в) помимо основных сигналов кислого полимера присутствуют сигналы нейтрального полимера в качестве минорных компонентов. В качестве основных сигналов 2D-спектрах обнаружены остатки α-галактопиранозы (α-Galp, остаток **F** в Таблице 10) и два остатка α-маннопиранозы (α-Manp, **G** и **H**).

Спектр ^{13}C ЯМР (Рисунок 11 в) отнесен с использованием спектра $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC (Рисунок 16). Анализ спектра $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC (Рисунок 16, Таблица 9) показал замещение остатка α-Galp в

положение 3 (**F**, δ_{C-3} 74,6), α -Manp в положениях 3, 4 и 6 (**G**, δ_{C-3} 77,1; δ_{C-4} 74,6 и δ_{C-6} 65,4) и α -Manp в положение 3 (**H**, δ_{C-3} 80,0). Химические сдвиги C-2 (103,3 м.д.) Химические сдвиги C-2 (103,3 м.д.) и C-3 (26,1 м.д.) соответствовали шестичленным 4,6-пируватным группам (Jansson, et al., 1993), то есть пируват находится в 4,6-положении остатка **G** и имеет S абсолютную конфигурацию.

В спектре ^1H , ^1H ROESY (Рисунок 17, Таблица 9) обнаружены следующие корреляционные пики между остатками: H-1(**F**)/H-3,4(**G**) (5,34/4,18;4,07), H-1(**G**)/ H-3(**H**) (5,14/4,12), H-1(**H**)/H-4(**F**) (5,06/4,25). Последнее наблюдение, как представляется, находится в противоречии с данными ^1H , ^{13}C HSQC, выявившими замещение остатка **F** в положение 3, а не 4. Но расчеты (Lipkind et al., 1988) показали, что для рассматриваемого случая трансгликозидные протоны H-1 и H-4 могут быть ближе по пространству, чем H-1 и H-3.

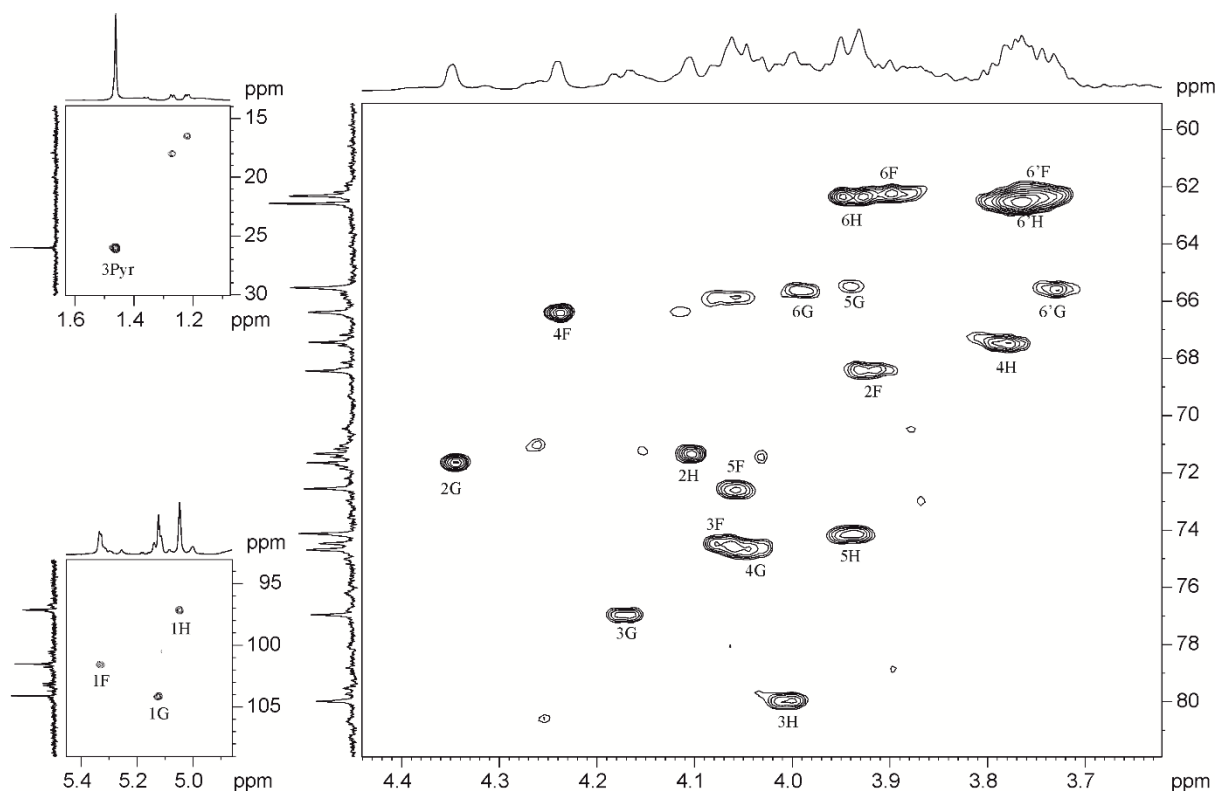
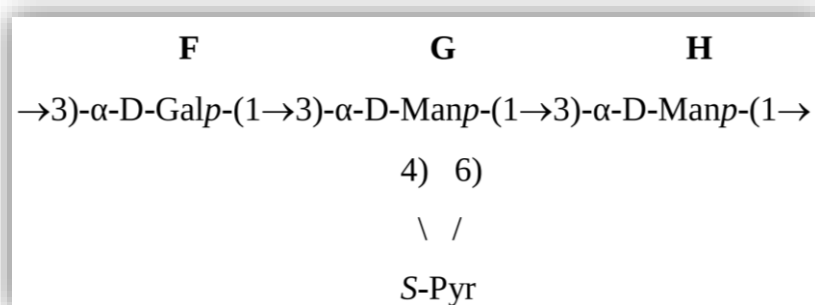


Рисунок 16. Части двумерного ^1H , ^{13}C HSQC спектра полисахарида 2 клеточной стенки *S. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T. Соответствующие части ^1H и ^{13}C ЯМР спектров представлены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 9.

Спектр ^1H , ^{13}C HMBC (Рисунок 18, Таблица 9) содержал корреляционные пики между остатками: H-1(**F**)/C-3(**G**) (5,34/77,1), H-1(**G**)/C-3(**H**) (5,14/80,0), H-1(**H**)/C-3(**F**), 95,06/74,6).

Окончательно подтвержденный тип замещения остатков и их последовательность

соответствуют следующей структуре повторяющегося звена:



Полисахарид 2

Таким образом, клеточная стенка *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T включает 2 полисахарида. Первый представляет собой нейтральный (1→6) связанный галактофуранан, в котором каждый второй остаток галактофуранозы замещен по гидроксильной группе в положение С-3 трисахаридом: β-D-GlcpNAc-(1→3)-α-L-Rhap-(1→2)-α-D-Fucp-(1→. Второй – пируватсодержащий галактоманнан с повторяющимся звеном →3)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-[4,6-S-Руг]-Manp-(1→3)- α-D-Manp-(1 →.

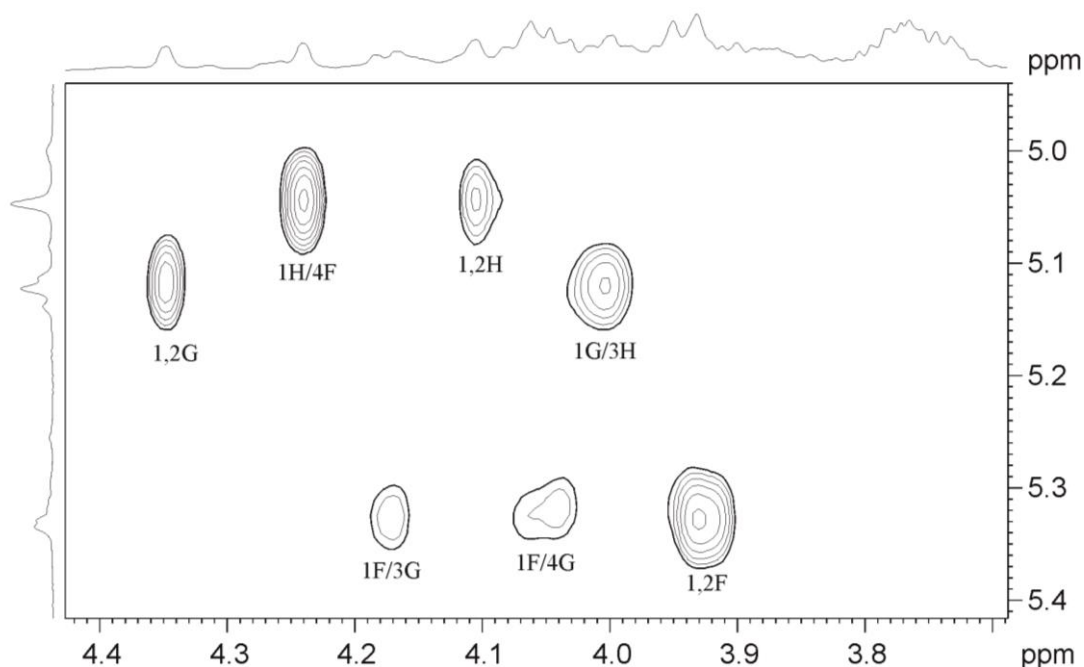


Рисунок 17. Часть двумерного ¹H,¹H ROESY спектра полисахарида 2 клеточной стенки *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T. По осям показаны соответствующие части ¹H. ЯМР спектра. Арабские цифры относятся к атомам протонов в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 9. Косая черта используется для обозначения пиков между остатками.

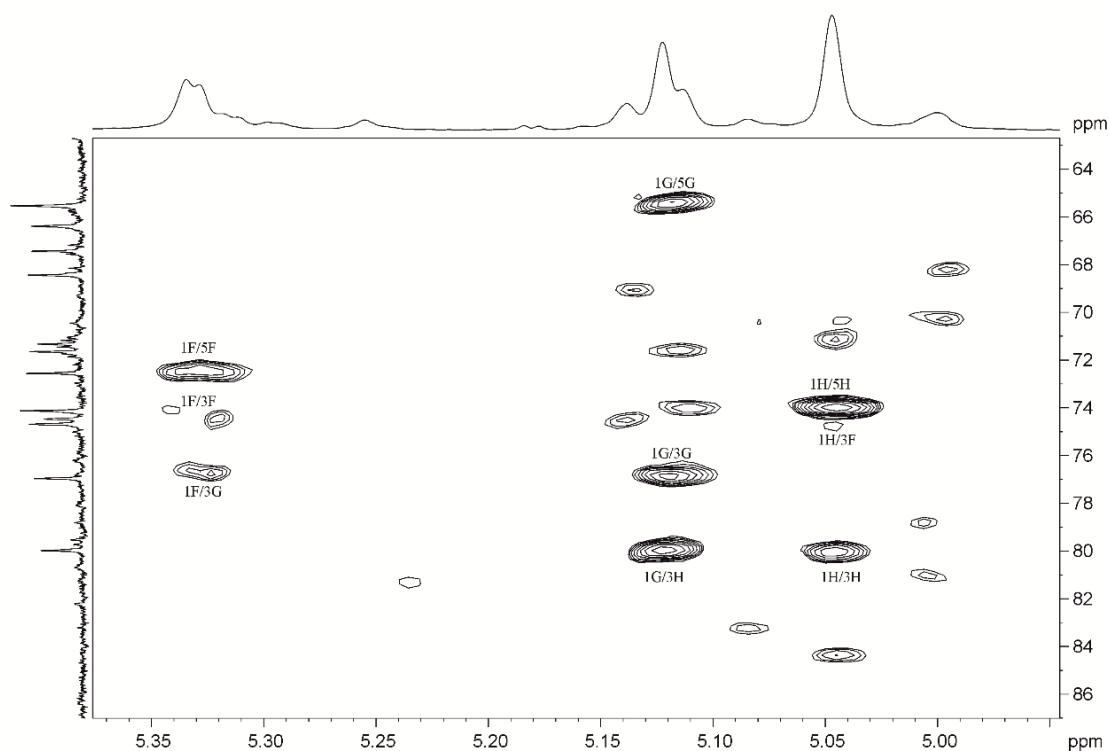


Рисунок 18. Часть двумерного ^1H , ^{13}C НМВС спектра полисахарида 2 клеточной стенки *S. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T. Соответствующие части одномерных ^1H и ^{13}C ЯМР спектров представлены сверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры перед косой чертой относятся к протонам, а после косой черты — к атомам углерода в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 9.

4.3. Гликополимеры клеточных стенок *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T и *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T

C. insidiosus ВКМ Ас-1402^T и *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T известны как фитопатогены люцерны (карантинный вид, <https://gd.eppo.int> 2024) и кукурузы соответственно (Таблица 5).

Выделение препаратов гликополимеров осуществляли с помощью ТХУ-экстракции из клеточных стенок соответствующих актинобактерий. Препарат I (содержащий полисахарид 1) выделяли с помощью холодной экстракции ТХУ. Препарат II (содержащий смесь полисахаридов 1 и 2) выделяли 5%-ной ТХУ при 90 °С. Эти препараты, а также выделенные из них гликополимеры (полисахариды) исследованы химическими методами (хроматография на бумаге, электрофорез) и методами ЯМР-спектроскопии.

4.3.1 Изучение клеточных стенок и гликополимеров из нее химическими методами

В гидролизатах клеточных стенок обоих штаммов был выявлен одинаковый состав моносахаридов: галактоза, манноза, фукоза, рамноза, глюкозамин и следовые количества глюкозы.

У штамма *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^Т обнаружены дополнительно следы рибозы (Rib) (Рисунок 9, Рисунок 10). Клеточные стенки всех штаммов также содержали пировиноградную кислоту. Фосфатсодержащие соединения не были обнаружены (метод электрофореза) ни в продуктах кислотного гидролиза клеточных стенок штаммов, ни в выделенных из них препаратов гликополимеров.

Методами ГЖХ в кислотных гидролизатах препаратов гликополимеров обоих организмов, полученных методом «холодной экстракции» выявлен одинаковый состав моносахаридов: Gal, Fuc, Rha и GlcN в соотношении 2:1:1:1. Моносахаридный состав препаратов, полученных методом «горячей экстракции», включал дополнительно Man.

Установлено, что Rha имела L-конфигурацию, а остальные компоненты полимеров (Gal, Man, Fuc и GlcN) были в D-конфигурации.

Полученные данные указывали на присутствие в клеточной стенке каждого из исследованных организмов по крайней мере двух бесфосфатных гликополимеров различных по составу. Дальнейшее изучение структур гликополимеров клеточных стенок актинобактерий осуществляли ЯМР-спектроскопическими методами.

4.3.2. ЯМР-исследование структур полисахаридов 1 и 2

Спектр ¹³C ЯМР (Рисунок 19, Таблица 10) препарата I из штамма ВКМ Ас-1402^Т был типичным для полисахарида с регулярно повторяющимся звеном. Этот спектр содержал пять сигналов примерно одинаковой интегральной интенсивности в аномерной области атомов углерода δ_C 100-110 м.д., два сигнала от 6-дезоксисахаров (16,5 и 17, 9 м.д.) и сигнал от СН₃-группы N-ацетила при 23,5 м.д. Остальные сигналы были расположены в области δ_C 57-86 м.д.

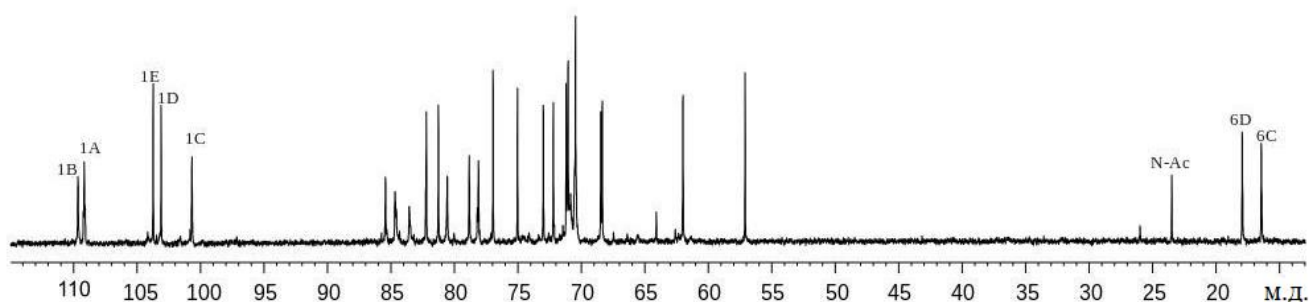


Рисунок 19. Спектр ¹³C ЯМР препарата I из клеточной стенки *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^Т. Арабские номера принадлежат атомам углерода в остатках, обозначенных заглавными буквами в Таблице 10.

¹H ЯМР-спектр этого препарата также содержал пять сигналов в аномерной области δ_H

4,7–5,1 м.д., два дублета от 6-дезоксисахаров (δ_{H} 1,24 и 1,28 м.д., $J_{5,6}$ 6 Гц) и сигналы от N-ацетильной группы при 2,05 м.д.

Анализ ^1H , ^1H COSY, TOCSY и ROESY спектров (не приведены) выявил присутствие двух остатков β -галактофуранозы (β -Gal f , остатки **A** и **B**), α -фукопиранозы (α -Fuc p , остаток **C**), α -рамнопиранозы (α -Rha p , остаток **D**) и 2-ацетамидо-2-дезоксид- β -глюкопиранозы (β -Glc p NAc, остаток **E**).

Заключение о составе моносахаридов, их пиранозной или фуранозой конфигурации, а также аномерной конфигурации гликозидного центра были сделаны на основании сравнения видимых констант спин-спинового взаимодействия и химических сдвигов остатков сахаров и соответствующих пираноз (Altona, Haasnoot, 1980; Janson et al., 1989) и фураноз (Angyal, 1979; Syr, Perlin, 1979; Bock, Pedersen, 1983).

При сравнении ^{13}C ЯМР и ^1H ЯМР спектров препарата штамма ВКМ Ас-1402^T с соответствующими спектрами штамма ВКМ Ас-1403^T, было выявлено их полное соответствие (химические сдвиги атомов ^{13}C и ^1H для ВКМ Ас-1402^T приведены в Таблице 10 и на Рисунке 18). Полученные данные свидетельствовали о сходстве структур полисахарида штамма ВКМ Ас-1402^T с галактофурананом *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T. Спектры ^{13}C ЯМР (Рисунок 19, Таблица 10) были расшифрованы с использованием двумерного спектра ^1H , ^{13}C HSQC. Анализ спектра ^1H , ^{13}C HSQC выявил положение замещения в остатках сахаров на основании их ^{13}C химических сдвигов по сравнению с таковыми для исходных пираноз и фураноз (Bock, Pedersen, 1983). Остатки β -Gal f были замещены по положению 6 (**A**, $\delta_{\text{C-6}}$ 70.5) и 3,6 (**B**, $\delta_{\text{C-3}}$ 85.4 и $\delta_{\text{C-6}}$ 70.5, соответственно), остатки α -Fuc p по положению 3 (**C**, $\delta_{\text{C-3}}$ 78.9), остатки α -Rha p по положению 3 (**D**, $\delta_{\text{C-3}}$ 81.3) и остатки β -Glc p NAc (**E**) являлись терминальными для галактофуранана из штамма ВКМ Ас-1402^T. Последовательность остатков в полимерной цепи была доказана при анализе спектра ^1H , ^1H ROESY (Таблица 10), где наблюдались корреляционные пики $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{H}}$ между остатками: H-1(**A**)/H-6' (**B**) (5.07/3.64), H-1(**B**)/H-6' (**A**) (5.04/3.64), H-1(**C**)/H-3(**B**) (4.99/4.05), H-1(**D**)/H-3 (**C**) (5.00/3.89), и H-1(**E**)/H-3(**D**) (4.72/3.91). Эта последовательность была подтверждена при анализе спектра ^1H , ^{13}C HMBC (Таблица 10), где выявлены следующие корреляционные пики $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ между остатками H-1(**A**)/C-6(**B**) (5.07/70.5), H-1(**B**)/C-6(**A**) (5.04/70.5), H-1(**C**)/C-3(**B**) (4.99/85.4), H-1(**D**)/C-3(**C**) (5.00/78.9) и H-1(**E**)/C-3(**D**) (4.72/81.3).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что галактофуранан из клеточной стенки ВКМ Ас-1402^T имел структуру близкую к таковой у *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T. Однако, эти два полимера отличаются положением гликозидной связи между остатками рамнозы (**D**) и фукозы (**C**) в трисахаридном заместителе: у штамма ВКМ Ас-1402^T связь 1→3, а у штамма *C.*

michiganensis ВКМ Ас-1403^Т связь 1→2.

Таблица 10. Химические сдвиги ¹³С и ¹Н ЯМР (δ_С TSP^а –1.6 м.д. и ¹Н δ_Н TSP 0.0 м.д.) галактофурананов из клеточных стенок *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^Т и *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^Т.

Остатки	С-1 H-1	С-2 H-2	С-3 H-3	С-4 H-4	С-5 H-5	С-6 H-6 (H-6,6')
Галактофурананы (полисахариды 1 и 3)						
→6)-β-Galf-(1→ (A)	109.1 5.07	80,6 4.24	78.1 4.06	83.4 4.18	70.7 3.99	70.5 3.86, 3.64
→6)-β-Galf-(1→ (B) 3) ↑	109.6 5.04	82.4 4.10	85.4 4.05	84.5 3.98	71.0 3.95	70.5 3.86, 3.64
α-Fucp-(1 (C) 3) ↑	100.8 4.99	68.5 3.89	78.9 3.89	73.1 3.87	68.4 4.17	16.5 1.21
α-Rhap-(1 (D) 3) ↑	103.5 5.00	71.1 4.26	81.3 3.91	72.3 3.52	70.5 3.81	17.9 1.27
β-GlcpNAc-(1 (E)	103.8 4.72	57.1 ^а 3.73	75.0 3.57	71.3 3.47	77.1 3.45	62.1 3.90, 3.75
^б α-L-Rhap-(1→(3C) (D _т)	103.5 5.00	71.1 4.06	72.2 3.85	73.3 3.43	70.1 3.82	17.9 1.27

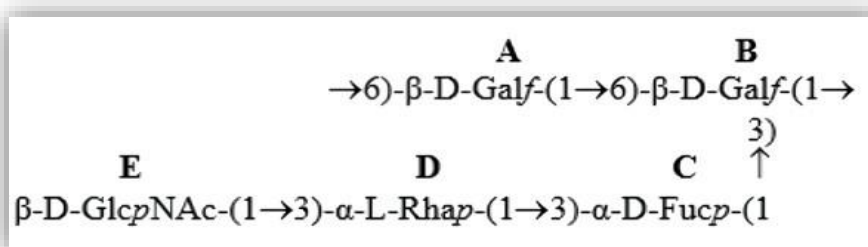
^а TSP – натриевая соль 3-(триметилсилил)-2,2,3,3-тетрадейтеропропионовой кислоты;

^б CH₃CON при δ_С 23.5 м.д. (CH₃) и 176.2 м.д; (CO) и δ_Н 2.03 м.д.;

^в Для *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^Т (терминальный остаток дисахарида:

α-L-Rhap-(1→3)-α-D-Fucp-(1→).

Таким образом, повторяющееся звено галактофуранана из штамма ВКМ Ас-1402^Т можно представить следующим образом:

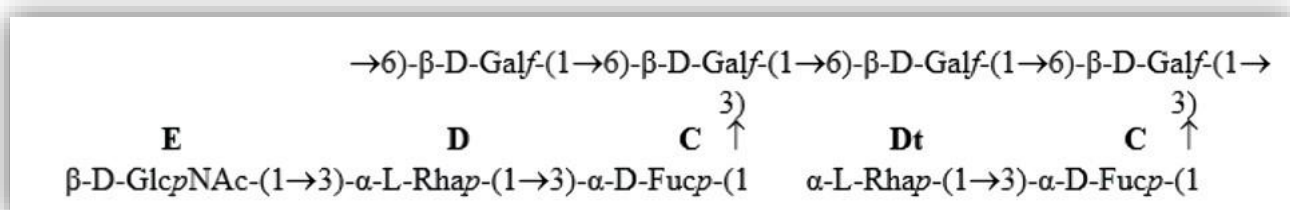


Сравнение ¹³С ЯМР и ¹Н ЯМР спектров препарата I из штамма ВКМ Ас-1404^Т (второго исследованного штамма) с соответствующими спектрами штамма ВКМ Ас-1402^Т показало их

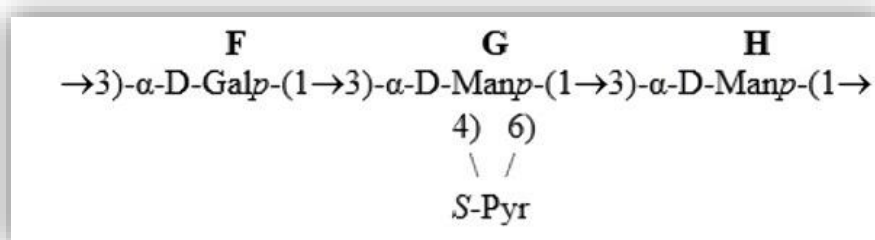
сходство.

Однако на двумерных спектрах $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC (Рисунок 20, Таблица 10), $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY и $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC препарата штамма ВКМ Ас-1404^T были обнаружены дополнительные сигналы, которые расшифрованы как принадлежащие терминальным остаткам рамнопиранозы **Dt** (Рисунок 19, Таблица 11) в боковом дисахариде [$\alpha\text{-L-Rhap-(1\rightarrow3)-}\alpha\text{-D-Fucp-(1\rightarrow)}$]. Дисахарид замещает каждый второй остаток галактофуранозы в интегральной цепи, чередуясь с вышеописанным (для галактофуранана штамма 1402^T) трисахаридом (Таблица 10).

Таким образом, повторяющееся звено галактофуранана из штамма ВКМ Ас-1404^T можно представить следующим образом:



Результаты исследований препаратов II из клеточных стенок штаммов ВКМ Ас-1402^T и ВКМ Ас-1404^T с использованием ранее описанных методов и подходов (Kim et al., 2021) показали присутствие помимо галактофурананов, описанных выше, пируватсодержащего галактоманнана. Структура галактоманнана обоих штаммов была полностью идентична галактоманнану из клеточной стенки *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T:



В клеточных стенках типовых штаммов двух видов фитопатогенных бактерий – *Clavibacter insidiosus* ВКМ Ас-1402^T и *Clavibacter nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T обнаружены по два гликополимера разных типов. Первый тип представлен (1→6) -связанными β-D-галактофурананами, отличающимися друг от друга по составу и структуре боковых олигосахаридных цепочек, а также от галактофурананов видов *Clavibacter*, изученных ранее. Второй, пируватсодержащий галактоманнан, идентичный у штаммов *C. insidiosus* и *C. nebraskensis*, сходен с полимерами, описанными у других клавибактеров (несущими в ряде случаев О-ацетильные группы).

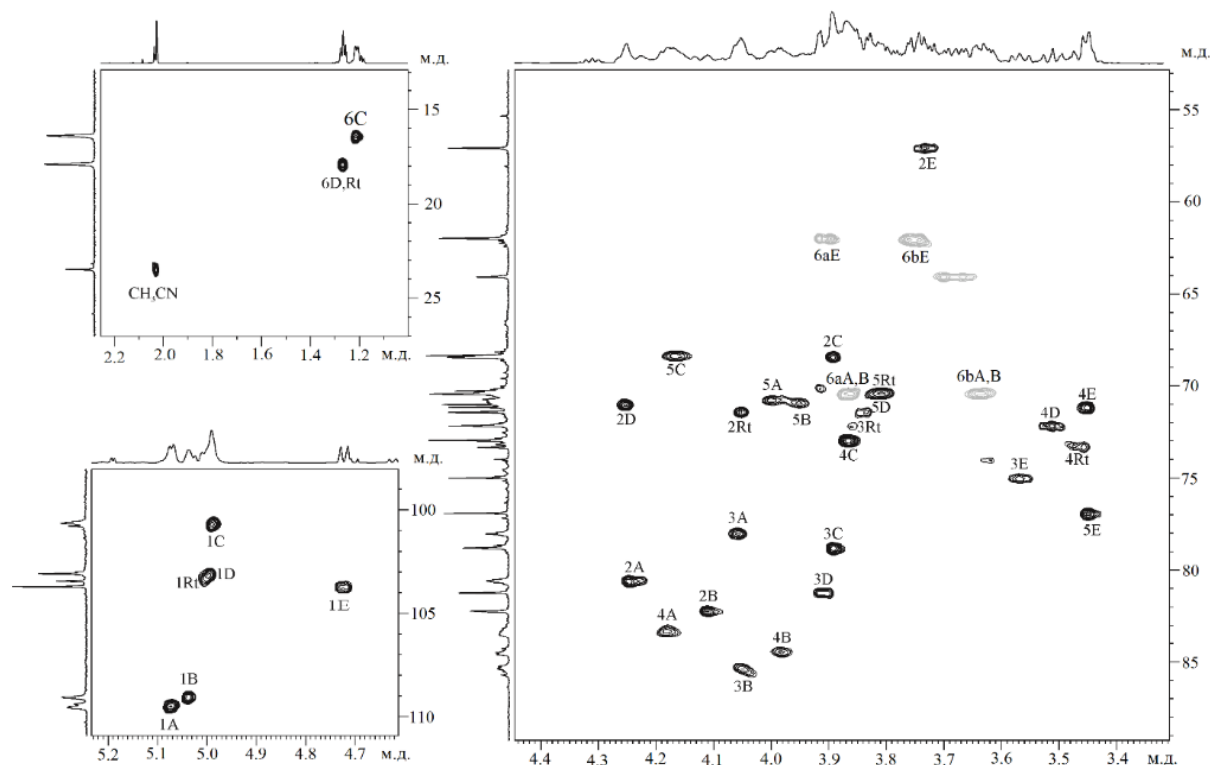


Рисунок 20. Части 2D ^1H , ^{13}C HSQC спектра галактофуранана клеточной стенки *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T. Соответствующие части одномерных ^1H и ^{13}C спектров ЯМР представлены вверху и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры перед косой чертой обозначают протоны, а после косой черты — атомы углерода в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 10.

4.4. Гликополимеры клеточных стенок *Clavibacter* ВКМ sp. Ас-1371, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374

Clavibacter sp. ВКМ Ас-1371, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374 — являются эндофитами, поскольку выделены из растений (солянка, акация, джужгун), не имеющих признаков заболевания и произрастающих в пустыне Кызыл-Кум (Таблица 5). Эти штаммы являются претендентами на новый вид (Стародумова и др., 2018).

Препараты I и II получали из клеточных стенок каждого исследуемого штамма различными экстракциями с помощью ТХУ. Предварительные исследования препаратов проводили методами одномерной ^1H и ^{13}C ЯМР спектроскопии.

Согласно спектрам ^1H и ^{13}C ЯМР установлено, что препарат I из штамма ВКМ Ас-1371, полученный с помощью холодной экстракции, содержит нейтральный полисахарид 1, а препарат II, полученный горячей экстракцией, представляет собой смесь нейтрального полисахарида 1 и кислого полисахарида 2. Что касается штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374 исследованы

только препараты II, полученные горячей экстракцией, из клеточных стенок этих штаммов из-за малого выхода полимеров в препарате I.

4.4.1. Предварительное изучение клеточных стенок штаммов ВКМ Ас-1371, ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374 и препаратов гликополимеров из них химическими методами

На хроматограммах кислотных гидролизатов клеточных стенок были обнаружены моносахариды: галактоза, манноза, рибоза и глюкоза (следовое количество). Фосфатсодержащие соединения не были обнаружены (метод электрофореза) ни в продуктах кислотного гидролиза клеточных стенок штаммов, ни в выделенных из них препаратах гликополимеров.

ГЖХ гидролизата препарата I ВКМ Ас-1371 выявила Gal, Rib и Man в соотношении 2 : 1 : 1, а гидролизат препарата II содержал Gal, Rib и Man в соотношении 3 : 1 : 3. Примерно такое же соотношение сахаров 3 : 1 : 3 установлено для гидролизатов препаратов II из штаммов ВКМ Ас-1374 и ВКМ Ас-1372. Предполагается, что эти моносахариды входят в состав бесфосфатных гликополимеров исследуемых клеточных стенок. Все сахара из полисахаридов 1 и 2 оказались D-конфигурации.

Выявлено, что все обнаруженные моносахариды имеют D абсолютную конфигурацию.

4.4.2. Предварительное ЯМР-исследование препаратов I и II из штамма ВКМ Ас-1371

Спектр ЯМР ^{13}C препарата I был типичен для полисахарида с регулярными повторяющимися звеньями (Рисунок 21 а). Он содержал четыре интенсивных сигнала в области аномального резонанса при δ_{C} 109,1, 107,6, 102,0 и 100,9 м.д. Остальные сигналы в регионе были отнесены к минорным.

В спектре ЯМР ^1H также наблюдались четыре пика в области аномального резонанса при δ_{H} 5,43 м.д. (дублет, $J_{1,2}$ 3,6 Гц), 5,17, 5,06 и 5,02 м.д. (все широкие синглеты, $J_{1,2} < 2$ Гц) (Рисунок 22 а) препарата I.

В аномерной области спектра ЯМР ^{13}C препарата II появились три дополнительных сигнала при δ_{C} 104,2, 101,5 и 97,2 м.д. (Рисунок 21 б), а также два новых пика при δ_{C} 176,3, 103,3 м.д. (минорные сигналы непротонированные атомы углерода) и интенсивный сигнал при δ_{C} 26,1 м.д. Последние три пика характерны для пируватного заместителя, связанного в виде шестичленного циклического кетала с метильной группой в экваториальной ориентации (Garegg et al., 1980).

В аномерной области ^1H ЯМР спектра (Рисунок 22 б) препарата II также наблюдались три дополнительных пика при δ_{H} 5,34 м. д. (дублет, $J_{1,2}$ 3,6 Гц), 5,12 и 5,06 м. д. Интенсивный пик

при δ_H 1,47 м.д. наблюдался в области высокого поля спектра, характерной для CH_3 -группы пирувата.

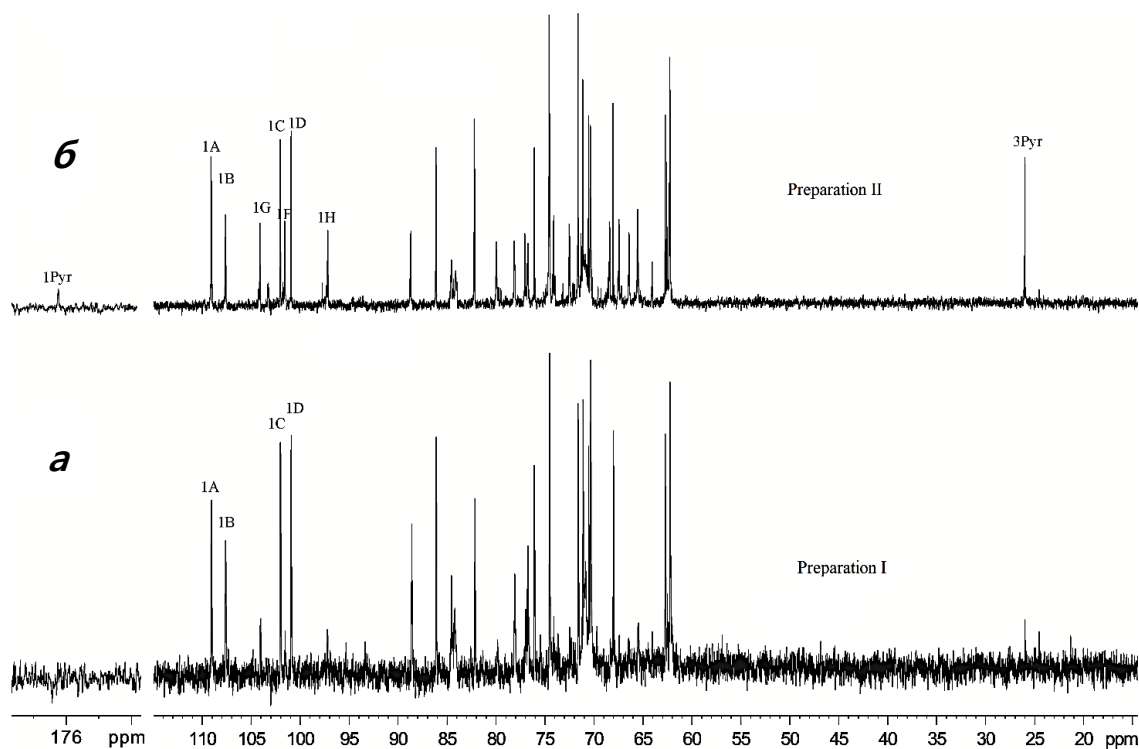


Рисунок 21. Спектры ЯМР ^{13}C а) препарата I (*полисахарид 1*); б) препарат II (смесь *полисахаридов 1 и 2*) *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371. Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 11.

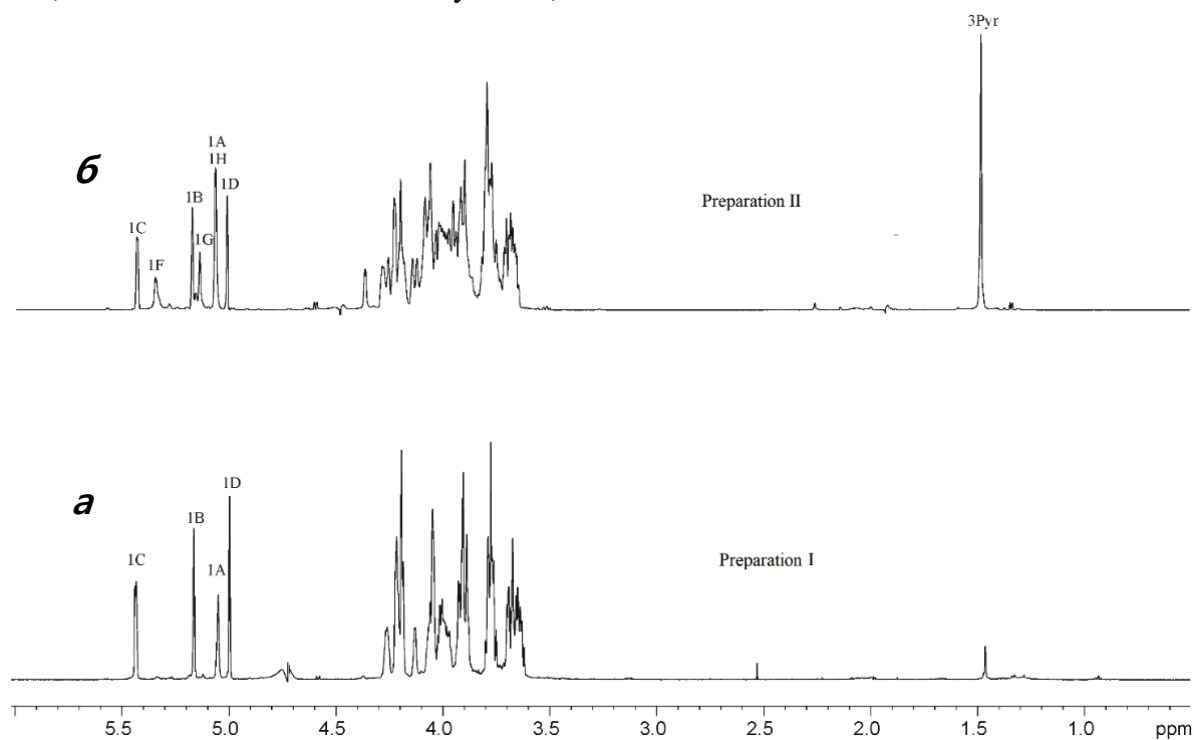


Рисунок 22. Спектры ЯМР 1H а) препарата I (*полисахарид 1*); б) препарат II (смесь *полисахаридов 1 и 2*) *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371. Арабские цифры относятся к атомам протонов в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 11.

4.4.3. Предварительное ЯМР исследование препаратов II из штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374

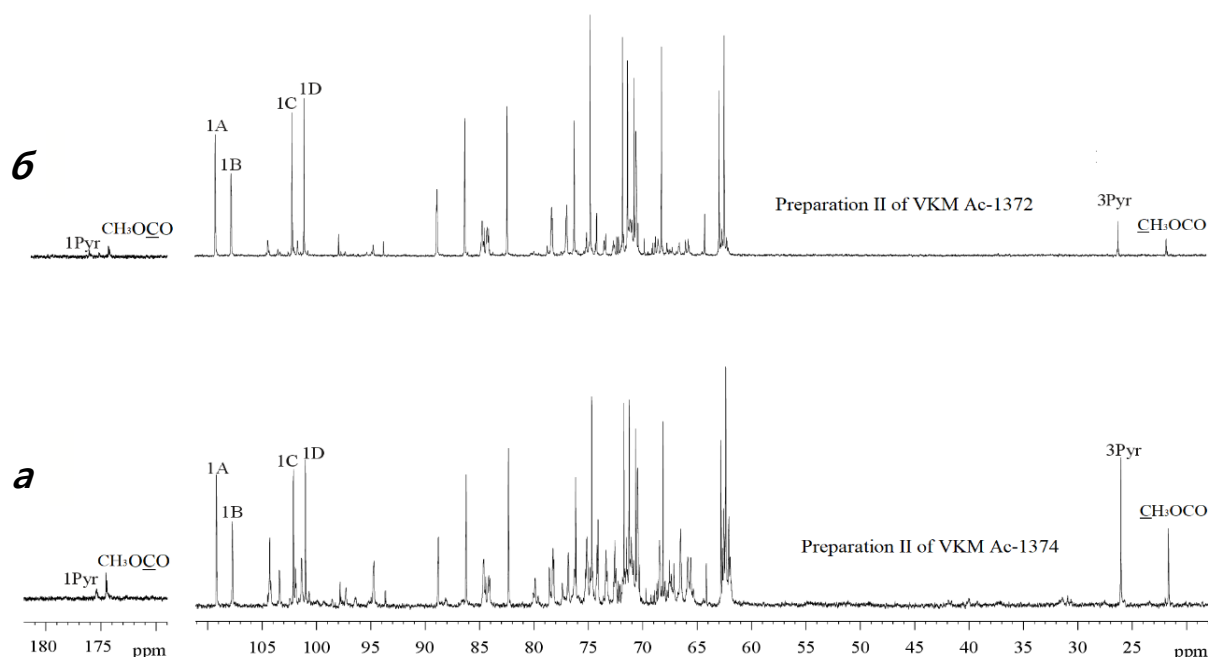


Рисунок 23. Спектры ЯМР ^{13}C препаратов II а) *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374 и б) *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372. Арабские цифры относятся к атомам углерода в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблицах 11 и 12.

Спектры ^{13}C ЯМР препаратов II (Рисунок 23, Таблица 12) содержали в аномерной области все сигналы, характерные для препарата I штамма ВКМ Ас-1371, и дополнительно ряд минорных пиков, а также три сигнала, характерных для О-ацетильных групп (δ_{C} 174,5 и 174,4 м.д., ОСО, и δ_{C} 21,7 м.д., СН₃СОО). Предполагалось, что появление новых сигналов связано с частичным О-ацетилированием кислого полисахарида 2 этих штаммов.

4.4.4. ЯМР-исследование полисахаридов 1 и 2 из штамма ВКМ Ас-1371

Строение полисахаридов 1 и 2 из штамма ВКМ Ас-1371 установлено на основании их двумерных гомоядерных $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC и HMBC спектров с учетом данных об абсолютной конфигурации сахара.

Нейтральный полисахарид 1 из штамма ВКМ Ас-1371

Спектр ЯМР ^1H (Рисунок 22 а) был расшифрован с использованием двумерных спектров $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, TOCSY и ROESY. В спектрах обнаружены два остатка β -галактофуранозы (β -Gal_f, остатки А и В в Таблице 11), α -рибофуранозы (α -Rib_f, остаток С) и α -маннопиранозы (α -Man_p, остаток D). Выводы о составе сахаров, размере углеродного кольца и аномерной конфигурации были сделаны на основе сравнения видимых констант связи и химических сдвигов остатков

сахаров и соответствующих пираноз (Altona and Haasnoot, 1980; Janson et al., 1989) и фураноз (Angyal, 1979; Syr and Perlin, 1979).

Спектр ЯМР ^{13}C (Рисунок 21 а) был расшифрован с использованием спектра ^1H , ^{13}C HSQC. Анализ спектра ^1H , ^{13}C HSQC (Рисунок 24, Таблица 11) выявил замещение в остатках сахаров на основании сравнения их химических сдвигов ^{13}C со сдвигами исходных пираноз и фураноз. Остатки $\beta\text{-Galp}$ оказались замещенными в положениях 6 (δ_{C} -6 70,3 м.д., остаток **A**) и 2, 6 (δ_{C} - 288,6 м.д. и δ_{C} -6 70,3 м.д., остаток **B**), остатки $\alpha\text{-Ribf}$ замещены в положение 2 (δ_{C} -2 76,1 м.д., остаток **C**), а остаток $\alpha\text{-Manp}$ оказался терминальным.

Последовательность остатков в повторяющемся звене определена при анализе спектров ^1H , ^1H ROESY (Рисунок 25, Таблица 11) и подтверждена анализом спектров ^1H , ^{13}C HMBC (Рисунок 26, Таблица 11).

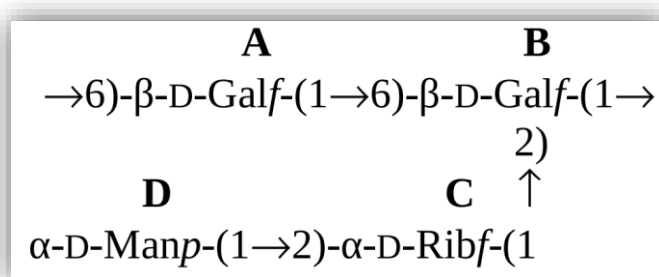
Таблица 11. Химические сдвиги спектров ЯМР ^{13}C и ^1H (δ_{C} TSP-1,6 и δ_{H} TSP 0,0) клеточной стенки *полисахарида* 1, общего для штаммов *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372 и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374 и *полисахарида* 2 *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371

Остаток		C1	C2	C3	C4	C5	C6
		<i>H1</i>	<i>H2</i>	<i>H3</i>	<i>H4</i>	<i>H5, H5'</i>	<i>H6, H6'</i>
Полисахарид 1							
→ 6)- $\beta\text{-D-Galp}$ -(1→	A	109.1 5.06	82.2 4.14	78.1 4.08	84.5 4.02	71.2 3.99	70.3 3.88, 3.66
→6)- $\beta\text{-D-Galp}$ -(1→ 2)	B	107.6 5.17	88.6 4.22	76.8 4.27	84.2 4.06	71.2 4.00	70.3 3.90, 3.64
↑ →2)- $\alpha\text{-D-Ribf}$ -(1	C	102.0 5.43	76.1 4.22	70.3 4.18	86.1 4.20	62.8 3.77, 3.68	
$\alpha\text{-D-Manp}$ -(1→	D	100.9 5.02	71.3 4.06	71.6 3.93	68.0 3.69	74.6 3.80	62.4 3.89, 3.76
Полисахарид 2							
→3)- $\alpha\text{-D-Galp}$ -(1→	F	101.5 5.34	68.4 3.94	74.6 4.09	66.4 4.25	72.8 4.08	62.7 3.75, 3.75
→3)- $\alpha\text{-D-Manp}$ -(1→ 4) 6) \\ S-Пур	G	104.2 5.12	71.6 4.36	77.1 4.18	74.8 4.06	65.6 3.95	65.7 4.00, 3.75
→3)- $\alpha\text{-D-Manp}$ -(1→	H	97.2 5.06	71.3 4.12	80.0 4.02	67.5 3.79	74.1 3.94	62.1 3.93, 3.78

В спектре $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY обнаружены следующие корреляционные пики между остатками, $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{H}}$: Н-1(А)/Н-6'(В), 5,06/3,64; Н-1(В)/Н-6,6'(А), 5,17/3,88 или 3,66; Н-1(С)/Н-2,3(В), 5,43/4,22 или 4,27 и Н-1(Д)/Н-2,3(С), 5,02/4,22 или 4,18.

Спектр $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC содержал, среди прочего, следующие корреляционные пики между остатками, $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{C}}$: Н-1(А)/С-6(В), 5,06/70,3; Н-1(В)/С-6(А), 5,17/70,3; Н-1(С)/С-2(В), 5,43/88,6 и Н-1(Д)/С-2(С), 5,02/76,1.

На основании данных и с учетом абсолютной конфигурации сахаров повторяющееся звено полисахарида 1 выглядит следующим образом:



Полисахарид 1

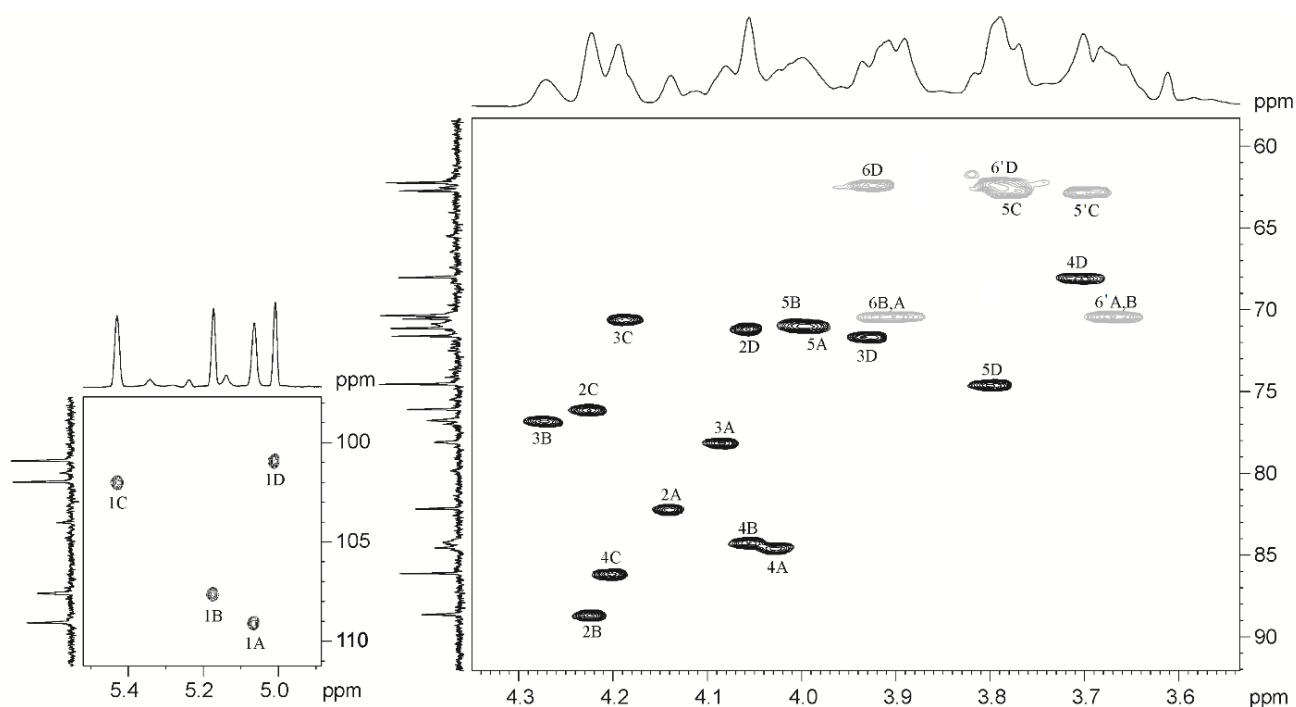


Рисунок 24. Части двумерного спектра $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC полисахарида 1 *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371. Соответствующие фрагменты одномерных ^1H - и ^{13}C спектры ЯМР представлены выше и слева от двумерного спектра соответственно.

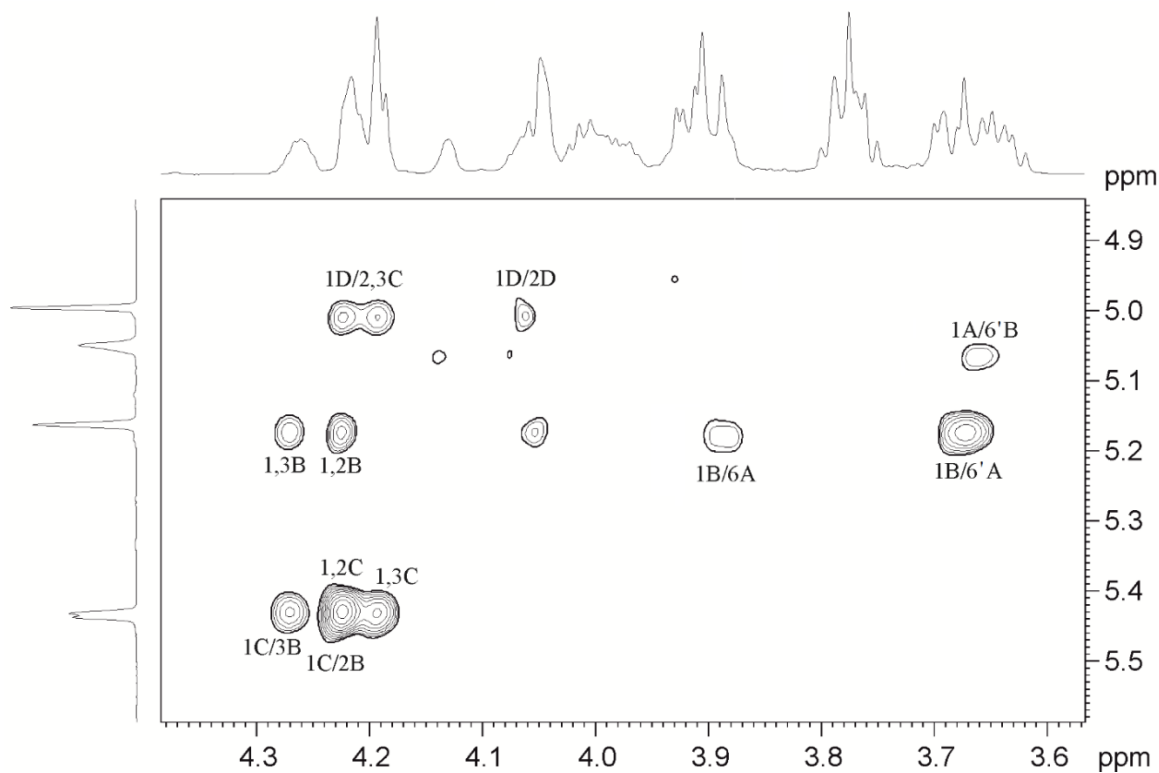


Рисунок 25. Часть двумерного спектра $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY полисахарида *1 Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371. По осям показаны соответствующие части спектра ЯМР ^1H . Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 11. Косая черта используется для обозначения пиков между остатками.

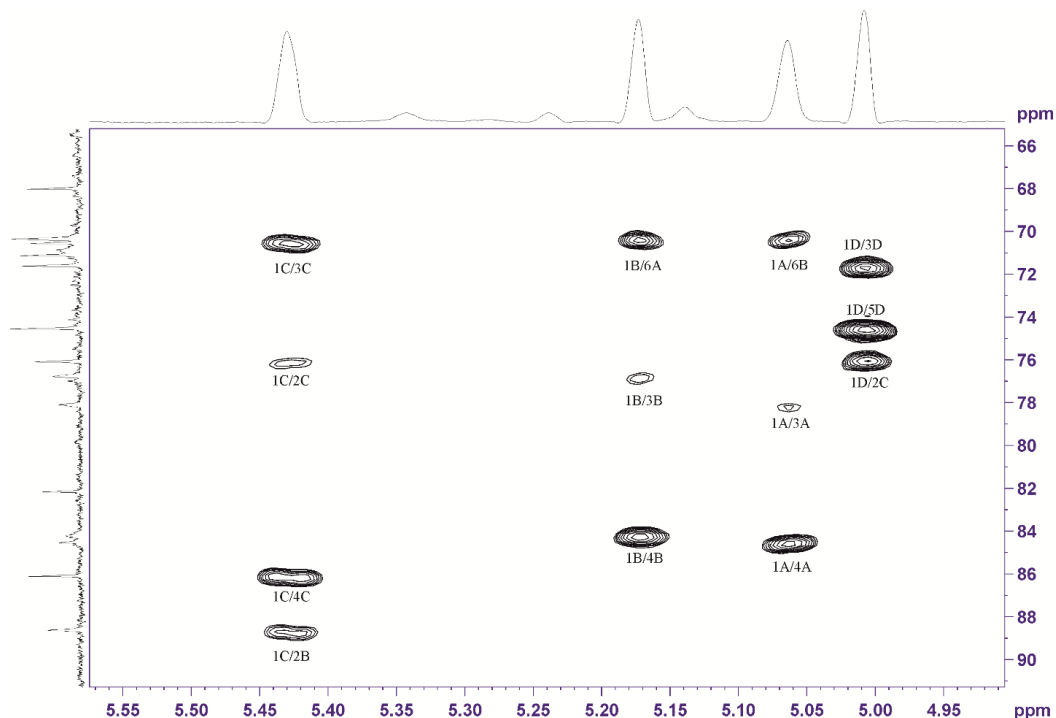


Рисунок 26. Часть двумерного спектра $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMQC полисахарида *1 Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371. Соответствующие части одномерных спектров ЯМР ^1H и ^{13}C представлены выше и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры перед косой чертой относятся к протонам, а после косой черты — к атомам углерода в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 11.

Кислый полисахарид (полисахарид 2) препарата II из клеточной стенки ВКМ Ас-1371

Спектр ЯМР ^1H (Рисунок 22 б) содержал все характерные сигналы нейтрального полисахарида 1 в качестве преобладающих компонентов и, кроме того, сигналы кислого полисахарида 2 в качестве минорного компонента. Подспектр ^1H ЯМР кислого полисахарида 2 отнесен на основании 2D спектров ^1H , ^1H COSY, TOCSY и ROESY препарата II с учетом отнесения полисахарида 1. Данные ЯМР структурно подобного полимера из штамма ВКМ Ас-1374 также использовали для отнесения сигнала. Анализ 2D-спектров выявил остатки α -галактопиранозы (α -Galp, остаток **F** в Таблице 11) и два остатка α -маннопиранозы (α -Manp, остатки **G** и **H**) из полисахарида 2 в препарате II.

Подспектр ЯМР ^{13}C , принадлежащий кислому полисахариду 2 (Рисунок 21 б, Таблица 11), отнесен с использованием спектра ^1H , ^{13}C HSQC препарата II. Анализ спектра ^1H , ^{13}C HSQC (Рисунок 27) показал замещение остатка α -Galp (остатки **F**) в положение 3 (δ_{C} -3 74,6 м.д.), α -Manp (остатки **G**) в положениях 3, 4 и 6. (δ_{C} -3 77,1 м.д.; δ_{C} -4 74,8 и δ_{C} -6 65,7 м.д.) и α -Manp (остатки **H**) в положение 3 (δ_{C} -3 80,0 м.д.). Химические сдвиги C-2 (103,3 м.д.) и C-3 (δ_{C} -326,1 м.д.) соответствовали шестичленным пируватным группам, расположенным в 4,6-положении остатка **G**.

В спектре ^1H , ^1H ROESY (Рисунок 28, Таблица 11) обнаружены следующие межостаточные корреляционные пики $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{H}}$ для кислого полисахарида 2: H-1(**F**)/H-2,3,4(**G**), (5,34 /4.36, 4.18, 4.07); H-1(**G**)/H-3(**G**), (5,14/4,04); H-1(**H**)/H-3,4(**F**), (5,06/4,09, 4,25).

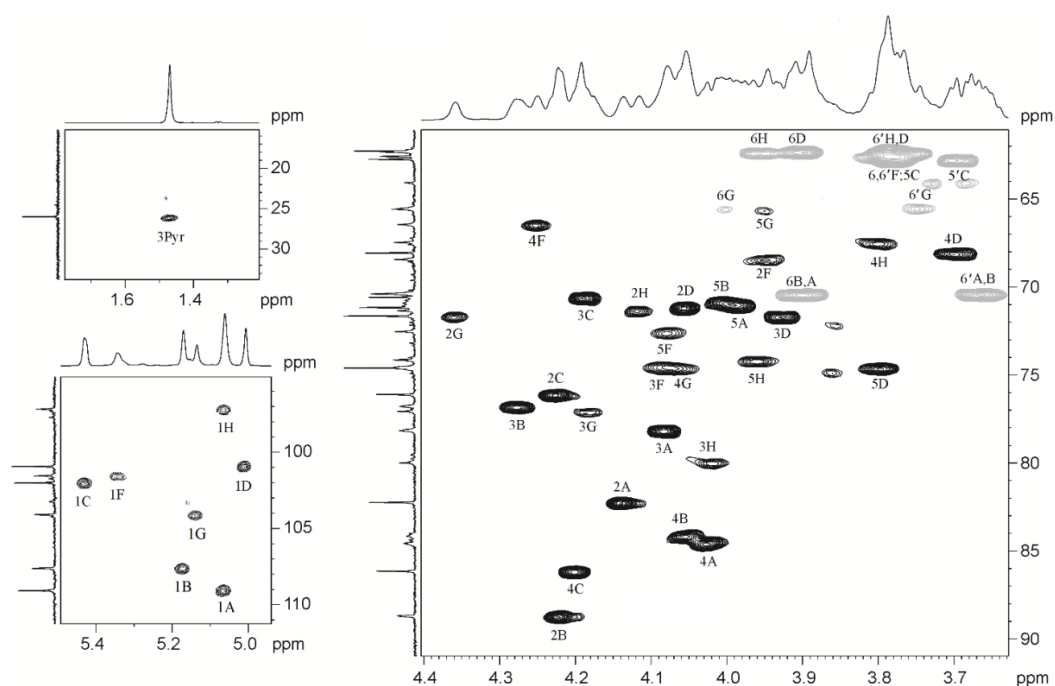


Рисунок 27. Участки двумерного спектра ^1H , ^{13}C HSQC препарата II (смесь полисахаридов 1 и 2) клеточной стенки *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371.

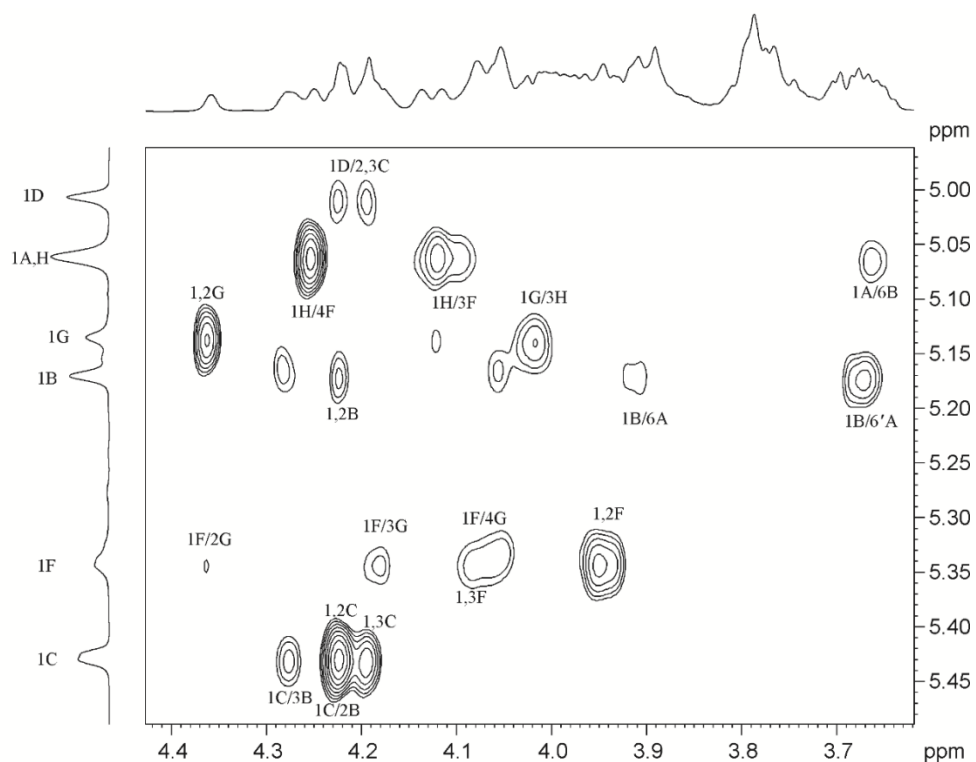


Рисунок 28. Часть 2D-спектра ^1H , ^1H ROESY препарата II (смесь полисахаридов 1 и 2) *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371.

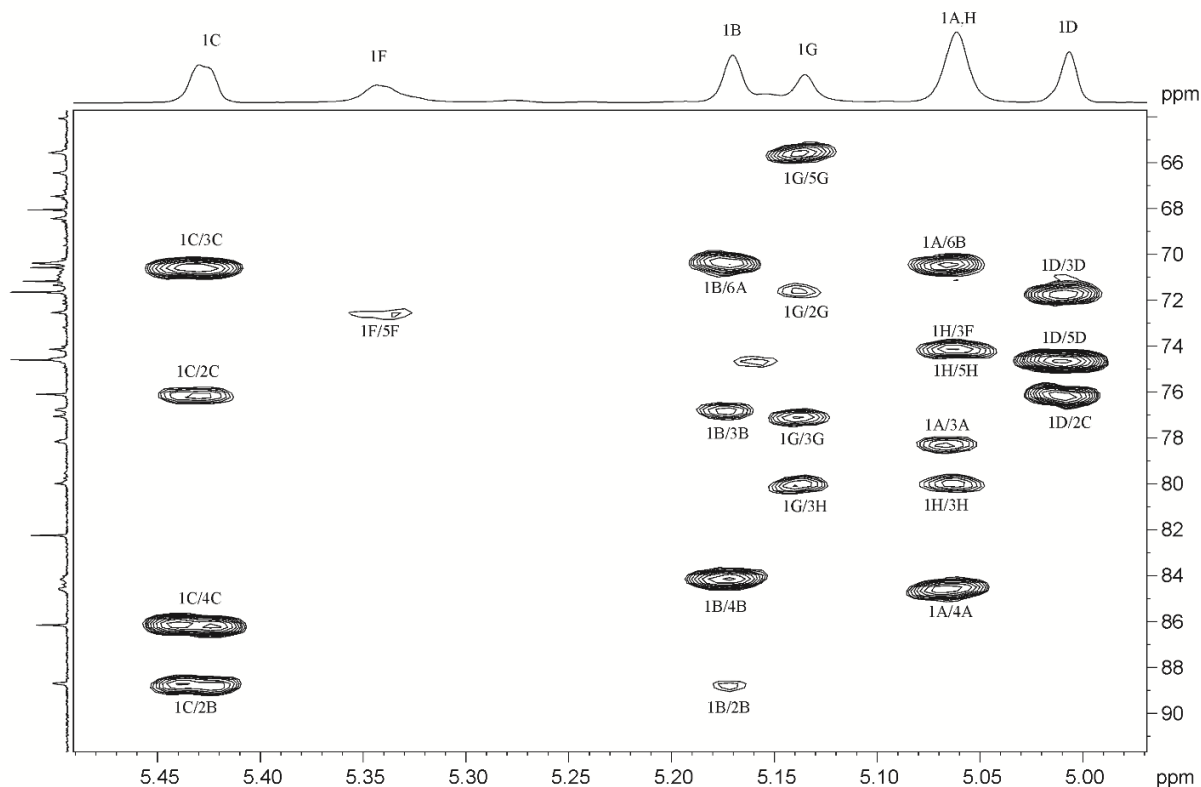
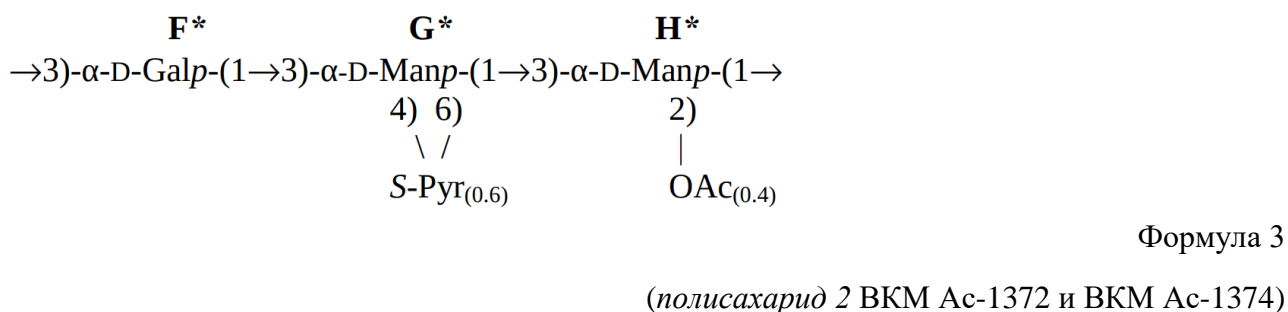
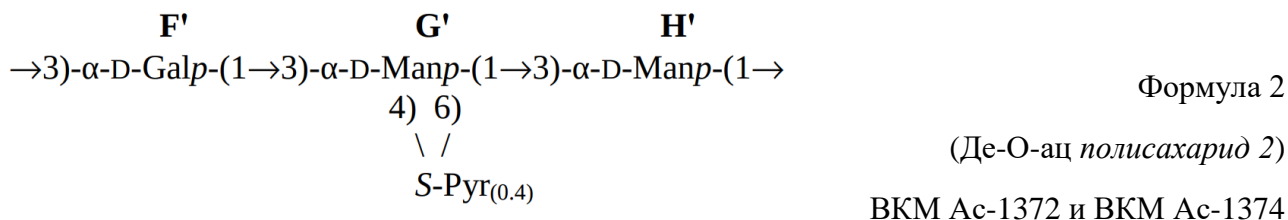
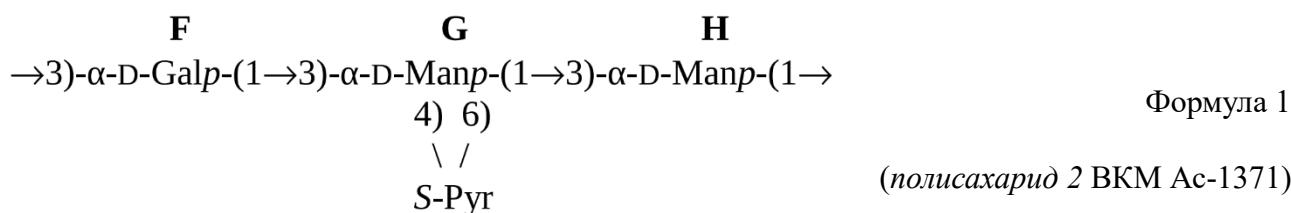


Рисунок 29. Часть 2D спектра ^1H , ^{13}C HMBSC препарата II (смесь полисахаридов 1 и 2) *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371.

Спектр ^1H , ^{13}C HMBSC (Рисунок 29, Таблица 11) содержит следующие корреляционные

пики между остатками, δ_H / δ_C : Н-1(**G**)/С-3(**H**), (5,12/80,0) и Н-1 (**H**)/С-3(**F**) (5,06/74,6), которые окончательно подтвердили тип замещения в остатках и последовательность, как в формуле 1:



4.4.6. ЯМР-исследование полисахаридов 1 и 2 препаратов II из штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374

Структуры полисахаридов 1 и 2 из штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374 установлены на основании их 1D ¹³C и 2D гомоядерных ¹H, ¹H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных ¹H, ¹³C HSQC. и спектры НМВС с учетом данных об абсолютной конфигурации сахаров.

Нейтральный полисахарид (полисахарид 1) из штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374

Строение полисахаридов штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374 установлено на основании их 1D (Рисунок 23 и 30) и 2D спектров ЯМР.

Для препаратов II из штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374 регистрировали гомоядерные спектры ¹H, ¹H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерные ¹H, ¹³C HSQC и НМВС и сравнивали с соответствующими спектрами препаратов II из ВКМ Ас-1371. Сравнительный анализ выявил полную идентичность нейтральных полисахаридов у всех трех исследованных штаммов.

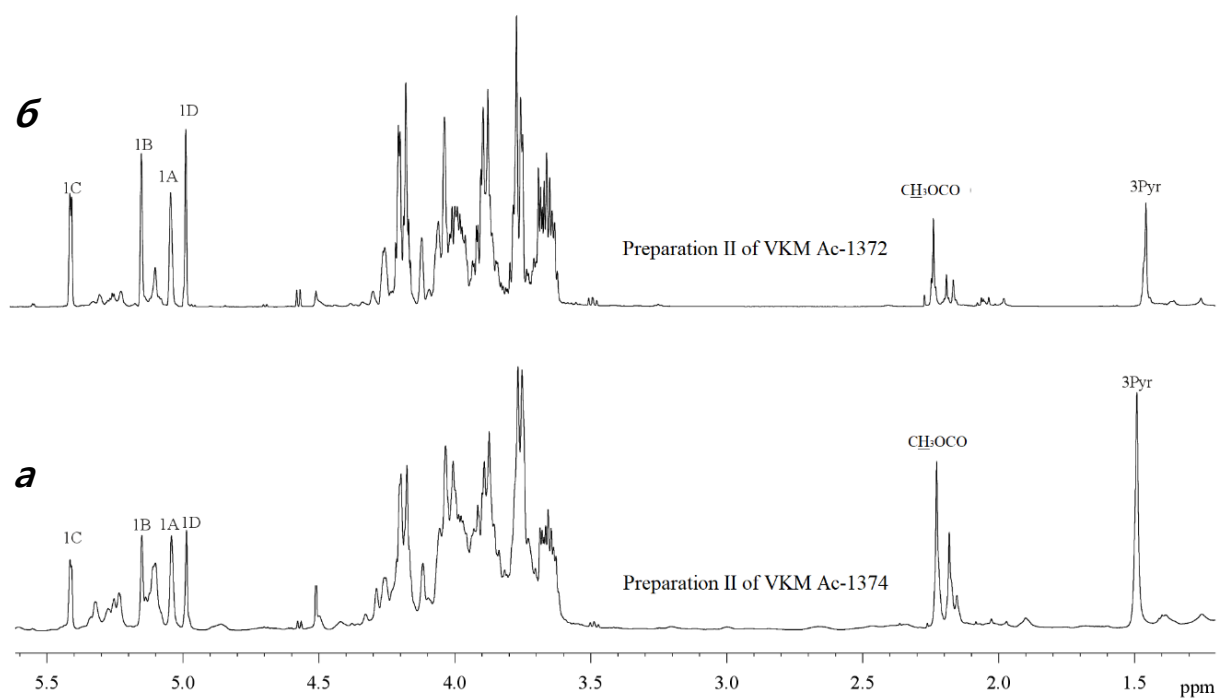


Рисунок 30. Спектры ЯМР ^1H препаратов II а) *Clavibacter* sp. VKM Ac-1374 и б) *Clavibacter* sp. VKM Ac-1372. Арабские цифры относятся к атомам протонов в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблицах 11 и 12.

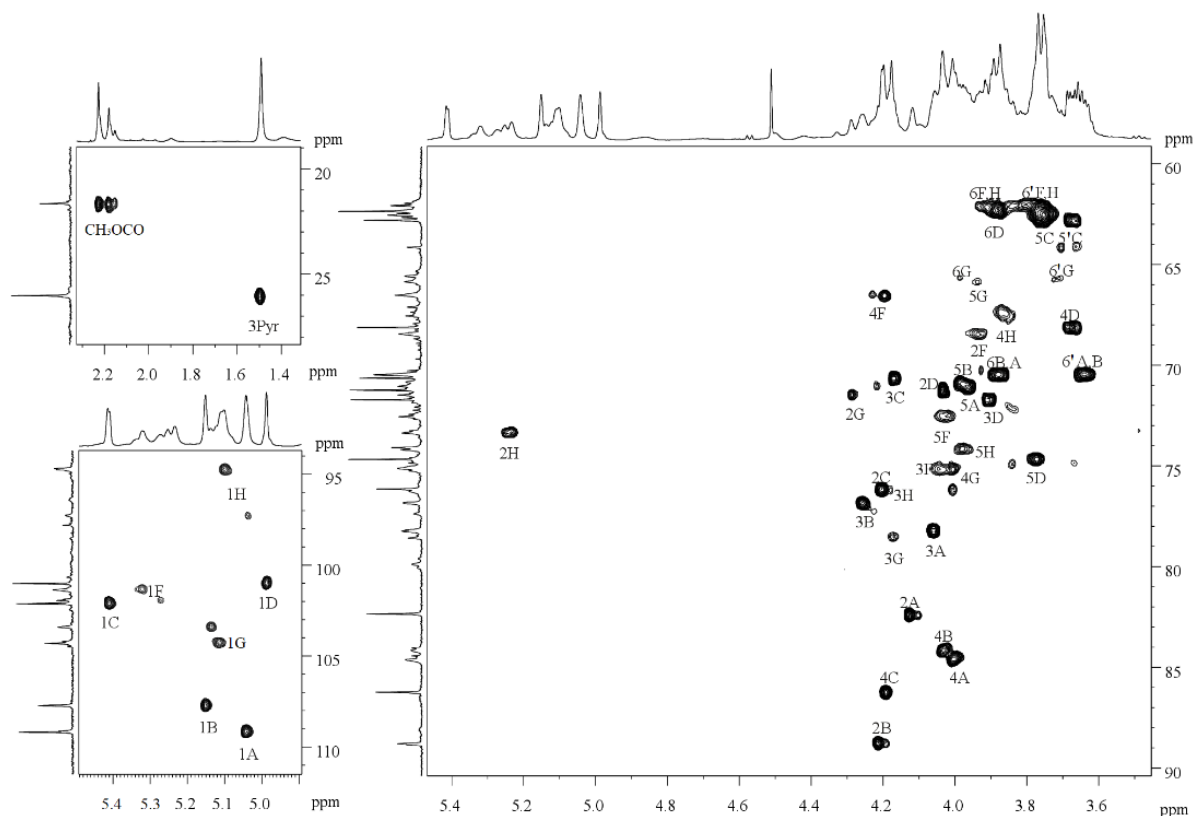


Рисунок 31. Участки двумерного спектра ^1H , ^{13}C HSQC полисахаридов 1 и 2 препарата II *Clavibacter* sp. VKM Ac-1374. Соответствующие фрагменты одномерных спектров ЯМР ^1H и ^{13}C представлены выше и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 12.

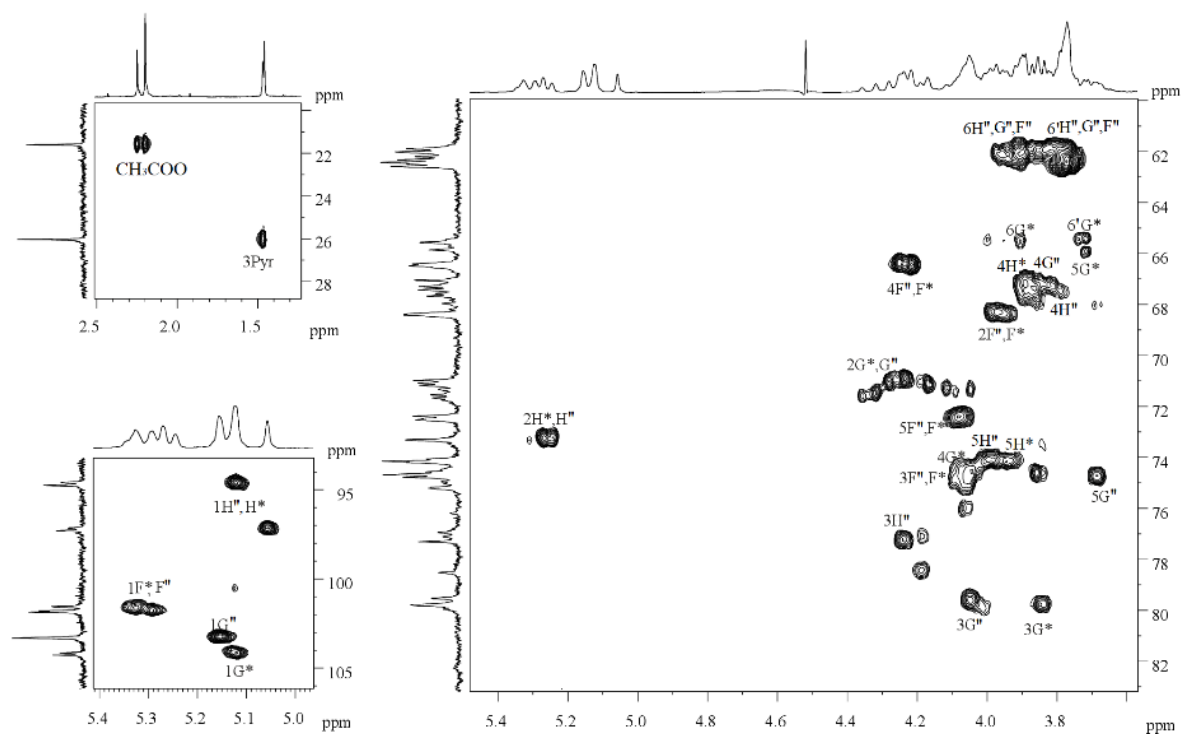


Рисунок 32. Участки двумерного спектра $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC кислого полисахарида 2 препарата II *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374. См. также пояснение к Рисунку 31 и Таблице 12.

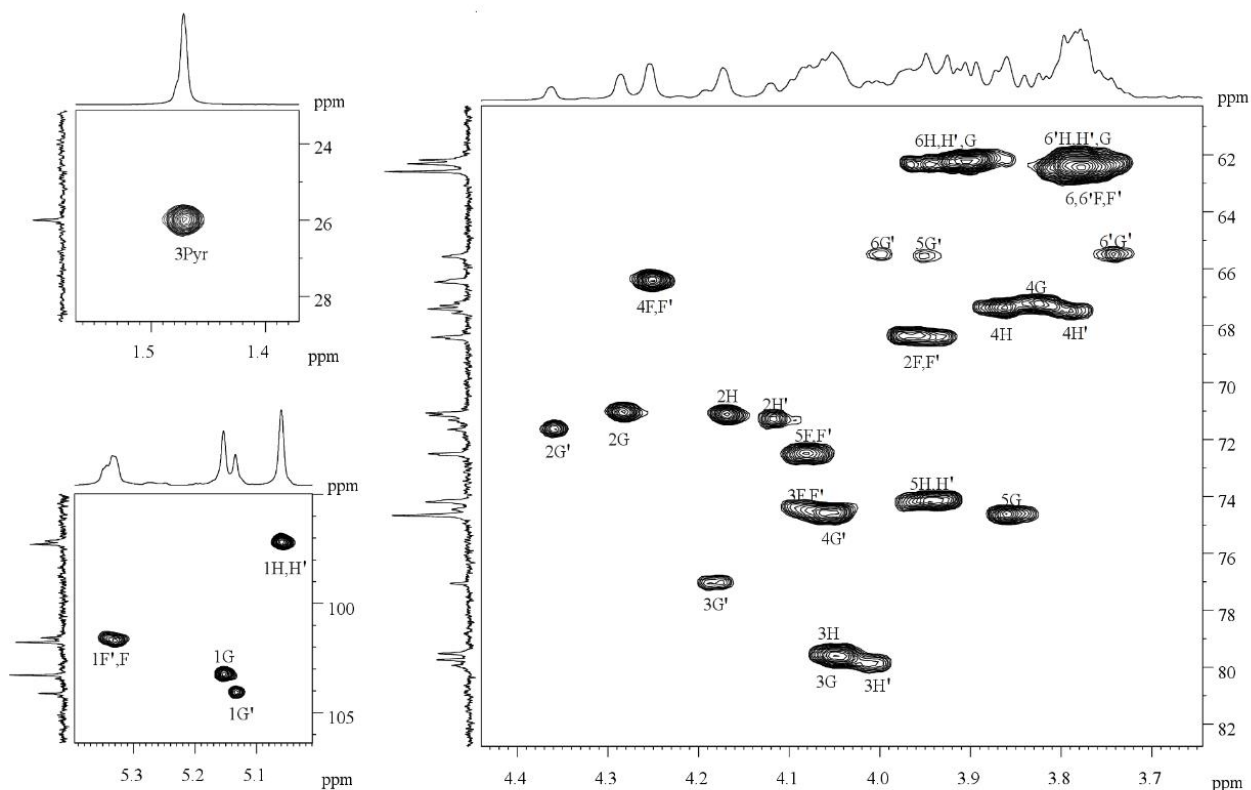


Рисунок 33. Участки 2D $^1\text{H},^{13}\text{C}$ HSQC спектра де-О-ацетилированного кислого полисахарида 2 препарата II *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374. См. также пояснение к Рисунку 31 и Таблице 12.

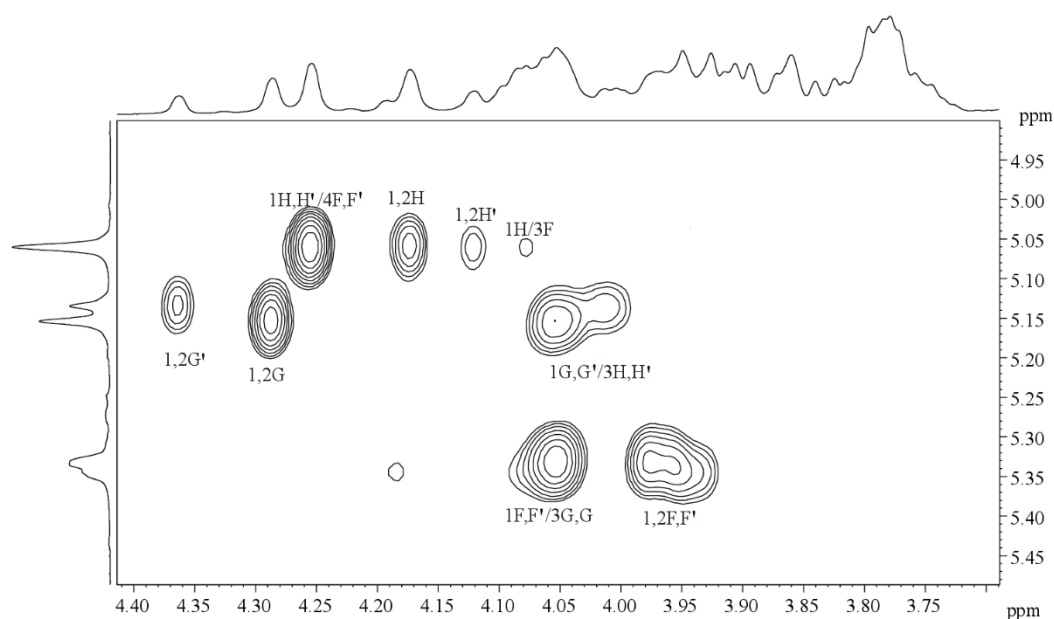


Рисунок 34. Часть 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY спектра кислого де-О-ацетилированного полисахарида 2 препарата II *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374. По осям показаны соответствующие части спектра ЯМР ^1H . Арабские цифры относятся к атомам протонов в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 12. Косая черта используется для обозначения пиков между остатками.

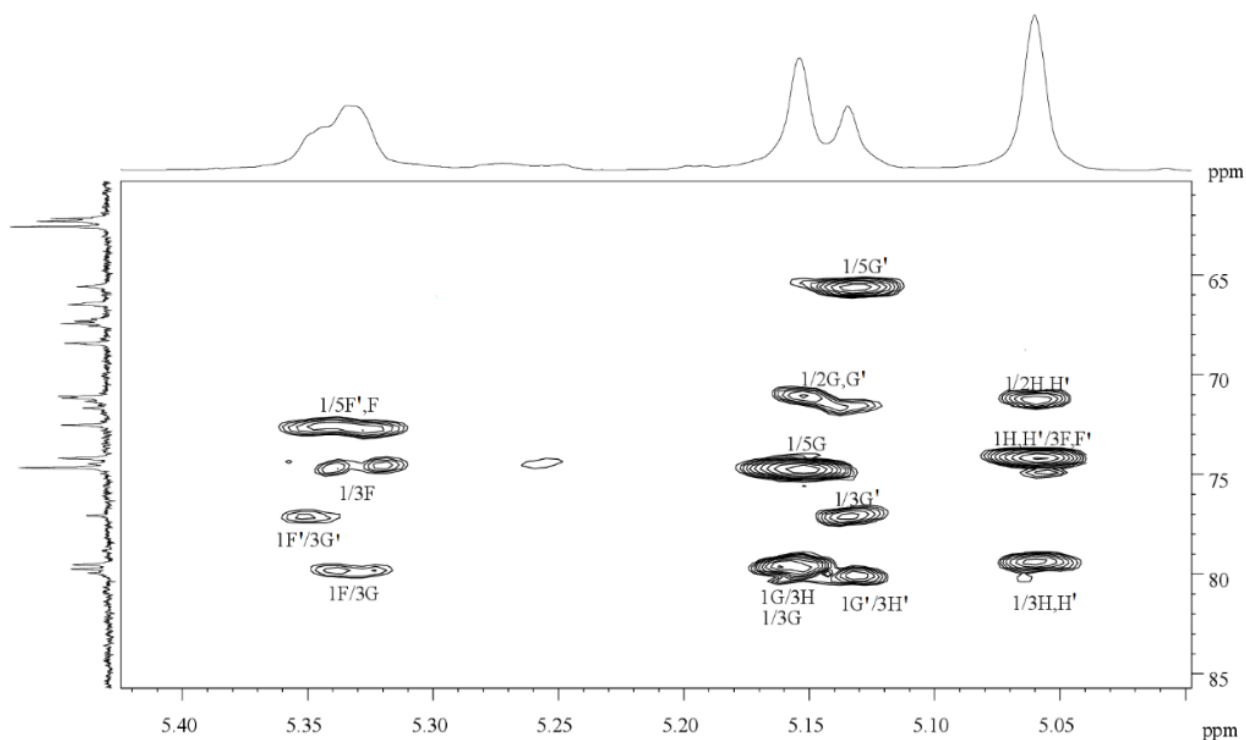


Рисунок 35. Часть 2D спектра $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBSC кислого де-О-ацетилированного полисахарида 2 препарата II *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374. Соответствующие части одномерных спектров ЯМР ^1H и ^{13}C представлены выше и слева от двумерного спектра соответственно. Арабские цифры перед косой чертой относятся к атомам протонов, а после косой черты — к атомам углерода в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 12.

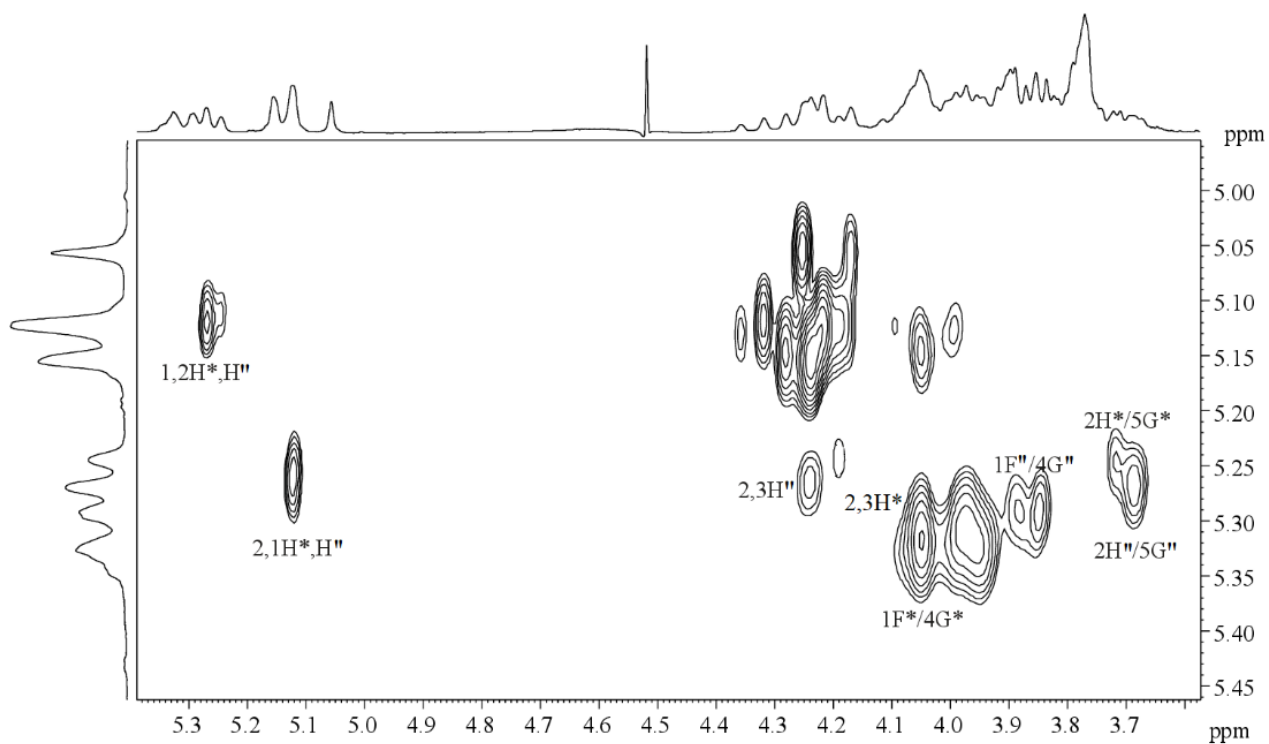


Рисунок 36. Часть 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY спектра кислого полисахарида 2 с пируваткетальными остатками и О-ацетильными группами препарата II *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374. См. также пояснение к Рисунку 34.

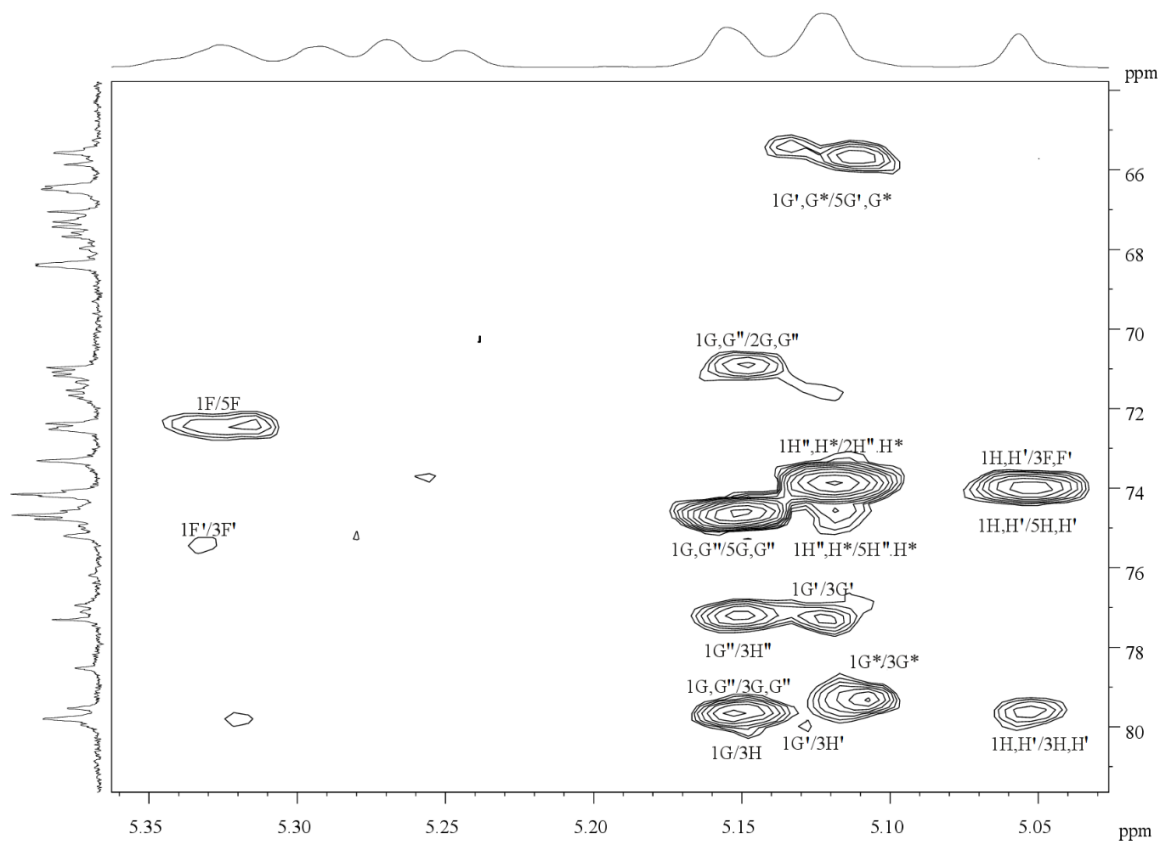


Рисунок 37. Часть 2D спектра $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMQC кислого полисахарида 2 с пируваткетальными остатками и О-ацетильными группами препарата II *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374. См. также пояснение к Рисунку 35.

Кислый полисахарид (полисахарид 2) из штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374

Основная цепь кислых полисахаридов штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374 также идентична таковой из ВКМ Ас-1371, но кислые полимеры ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374 содержат О-ацетильные остатки. Кроме того, часть остатков **G** (Таблица 12) в полисахаридах оказалась непирувилированной. Детальный структурный анализ кислого полимера проводили на препаратах II из штамма ВКМ Ас-1374, где относительное количество кислого полимера было больше, чем в препаратах II из штамма ВКМ Ас-1372.

Разделение препаратов II из штамма ВКМ Ас-1374 на ДЕАЕ-целлюлозе привело к получению двух фракций. Первая фракция еще содержала смесь нейтральных и кислых полимеров, а вторая представляла собой достаточно чистый кислый полимер (полисахарид 2) ВКМ Ас-1374, Рисунок 32). Однако спектры ЯМР полисахарида 2 оставались достаточно сложными для детального анализа из-за нестехиометрического содержания пирувата и ацетата. Полисахарид 2 был де-О-ацетилирован, и структура продукта (де-О-Ас полисахарид 2) была установлена на основании анализа спектров 1D и 2D ЯМР. Анализ спектров 2D ЯМР $^1\text{H}, ^1\text{H}$ (не показан) подтвердил наличие остатков $\alpha\text{-Manp}$ и $\alpha\text{-Galp}$ в соотношении 2 : 1. Спектр $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC полисахарида де-О-Ас 2 (Рисунок 33, Таблица 12) подтвержден (1 \rightarrow 3)-тип связей всех остатков основной цепи и замещение части $\alpha\text{-Manp}$ (остатки **G'**) S-пировиноградной кислотой в положениях 4 и 6. Спектры ^1H ROESY (Рисунок 34, Таблица 12) и $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBC (Рисунок 35, Таблица 12) полностью соответствовали формуле 2 (см. выше).

Теперь полное отнесение в спектрах полисахарида 2 $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC (Рисунок 32) было значительно упрощено за счет возможности исключения из спектра сигналов де-О-ацетилированного полимера. Полное отнесение субспектров ^1H О-ацетилированных остатков и их ближайших соседей выполнено с использованием анализа субспектров $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY, TOCSY и ROESY, а также субспектров $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC и HMBC соответствующего трисахарида. фрагменты (рисунки 32 – 37, Таблица 12).

Таблица 12. Химические сдвиги спектров ЯМР ^{13}C и ^1H (δ_{C} TSP–1,6 и δ_{H} TSP 0,0) интактного и/или частично деградированного кислого полисахарида 2 из *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372 и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374.

Остаток	C1	C2	C3	C4	C5	C6	
	H1	H2	H3	H4	H5	H6, H6'	
Фрагмент без заместителей							
\rightarrow 3)- α -D-Galp-(1 \rightarrow	F	101.6	68.4	74.2	66.4	72.5	62.7
		5.34	3.94	4.08	4.24	4.08	3.78, 3.77

(Продолжение Таблицы 12)

→3)-α-D-Manp-(1→	G	103.3 5.15	71.1 4.29	79.8 4.05	67.3 3.83	74.7 3.86	62.2 3.88, 3.77
→3)-α-D-Manp-(1→	H	97.3 5.06	71.2 4.17	79.5 4.05	67.4 3.84	74.2 3.96	62.3 3.96, 3.75
Фрагмент с Pyr (де-О-ацетилованный полисахарид 2)							
→3)-α-D-Galp-(1→	F'	101.6 5.34	68.4 3.96	74.6 4.09	66.4 4.24	72.5 4.08	62.7 3.78, 3.77
→3)-α-D-Manp-(1→ 4) 6) \\ / S-Pyr	G'	104.1 5.13	71.6 4.36	77.1 4.18	74.7 4.06	65.5 3.95	65.4 4.00, 3.75
→3)-α-D-Manp-(1→	H'	176.3 103.3	103.3 26.1	26.1 1.47			
→3)-α-D-Manp-(1→	H'	97.3 5.06	71.4 4.12	79.9 4.01	67.5 3.79	74.1 3.96	62.3 3.96, 3.75
Фрагмент с OAc^{a,b}							
→3)-α-D-Manp-(1→	G''	103.3 5.15	71.0 4.28	79.5 4.05	67.3 3.85	74.8 3.69	62.2 3.88, 3.77
→3)-α-D-Manp2OAc-(1→	H''	94.7 5.12	73.3 5.24	77.3 4.24	67.3 3.82	74.1 3.99	62.1 3.96, 3.78
→3)-α-D-Galp-(1→	F''	101.8 5.29	68.4 3.94	74.8 4.08	66.5 4.25	72.5 4.09	62.4 3.77, 3.77
Фрагмент с Pyr и OAc^{a,b}							
→3)-α-D-Manp-(1→ 4) 6) \\ / S-Pyr	G*	104.2 5.12	70.9 4.24	79.8 3.84	75.3 4.06	66.0 3.72	65.5 3.90, 3.73
→3)-α-D-Manp2OAc-(1→	H*	176.3 103.3	103.3 26.1	26.1 1.47			
→3)-α-D-Manp2OAc-(1→	H*	94.6 5.12	73.3 5.27	75.9 4.07	67.3 3.89	74.2 3.95	62.1 3.93, 3.78
→3)-α-D-Galp-(1→	F*	101.6 5.32	68.4 3.96	75.2 4.06	66.5 4.22	72.5 4.06	62.4 3.77, 3.77

а Данные для фрагментов трисахаридов с остатком **H*** в качестве среднего сахара, →3)-α-D-Manp-[4,6-S-Pyr]-(1→3)-α-D-Manp-2OAc-(1→3)-α-D-Galp-(1→6 δ_C 21,7 (CH₃) и 174,5, 174,4 (CO)

и $\delta_{\text{H}} 2,23, 2,19$ (CH_3)

После полного отнесения в спектре $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC путем сравнительного анализа 1D- и 2D-спектров исходного и де-О-ацетилизованного полисахаридов установлено расположение нестехиометрических О-ацетильных групп в кислом *полисахарида 2* ВКМ Ас-1374.

Сравнение приписанных спектров $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HSQC (Рисунок 32) выявило расположение ацетильных групп в положении 2 остатков (H'' или H^*) на основе следующих изменений химических сдвигов: i) слабopольный сдвиг С-2 (H) с 71,2 до 73,3 м.д. (остатки H'' и H^*) и Н-2 (H) с 4,17 до 5,24 (5,27) м.д. (остатки H'' или H^*); ii) сдвиг в сильное поле С-1 (остаток H) с 97,3 до 94,6 м.д. (остатки H'' или H^*) и С-3 (с 79,5 до 77,3 или 75,9 м.д. (остатки H'' или H^*). Изменения характерны для эффектов α - и β -ацилирования в углеводных спектрах ЯМР. Ацетилирование приводит к изменению конформационных свойств гликозидных связей между остатками $\text{G}'' - \text{H}''$ и $\text{H}'' - \text{F}''$ по сравнению с $\text{G} - \text{H}$ и $\text{H} - \text{F}$ и, как следствие, к изменению химических сдвигов соответствующих остатков в спектрах ЯМР (Таблица 12).

Таким образом, повторяющееся звено *полисахарида 2* из штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374 представлено в формуле 3 (см. выше). Полное отнесение в спектрах ЯМР нейтральных и кислых полимеров (Таблица 11 и 12) позволило найти общие особенности и различия в первичной структуре полисахаридов из препаратов II для каждого исследуемого штамма.

Таким образом, показано, что каждый штамм содержит два полимера, нейтральный и кислый. Основная цепь нейтрального полимера, одинаковая у всех трех штаммов, представляет собой (1 \rightarrow 6)-связанный галактофуранан, в котором каждый второй остаток галактофуранозы замещен в положение 2 боковыми цепями из дисахарида $\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow\text{2)-}\alpha\text{-D-Ribf-(1}\rightarrow$. Второй полимер представляет собой пируватсодержащий галактоманнан с повторяющимся звеном $\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-[4}, \text{6-S-Pyr]-Manp-(1}\rightarrow\text{3)-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow$, частично ацетилованный у штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374.

4.5. Гликополимеры клеточных стенок *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T

C. tessellarius ВКМ Ас-1406^T является фитопатогеном пшеницы, вызывающим мозаичную болезнь последней, сопровождающуюся пятнистостью и пожелтением листьев и зерна, что приводит к значительным потерям урожая (Таблица 5).

Из клеточной стенки исследуемого штамма был получен препарат гликополимеров с помощью горячей экстракции ТХУ. Препарат, а также выделенные из него гликополимеры (полисахариды) были исследованы химическими и ЯМР-спектроскопическими методами. Были получены одномерные ^1H и ^{13}C ЯМР спектры полисахаридов, которые были расшифрованы с

помощью двумерных гомоядерных ^1H , ^1H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных ^1H , ^{13}C HSQC, HMBC спектров.

4.5.1 Изучение клеточных стенок и гликополимеров из нее химическими методами

Фосфатсодержащие соединения не были обнаружены ни в продуктах кислотного гидролиза клеточных стенок штаммов, ни в выделенных из них препаратах гликополимеров (метод электрофореза). На хроматограммах обнаружены моносахариды: галактоза, манноза, фукоза и рамноза и следовое количество глюкозы (последнее – только в гидролизатах клеточных стенок).

ГЖХ-хроматография препарата гликополимеров подтвердила состав сахаров Gal, Man, Rha и Fuc в соотношении 3,5 : 1,9 : 1,5 : 1.

Gal, Man и Fuc из *полисахаридов 1 и 2* оказались в D-конфигурации, а Rha из *полисахарида 2* оказалась в L-абсолютной конфигурации.

4.5.2 ЯМР исследования структур *полисахаридов 1 и 2*

Предварительные исследования препарата гликополимеров из клеточной стенки Ac-1406^T, проведенные с помощью ЯМР спектроскопии ^{13}C (Рисунок 38) и ^1H (Рисунок 39), выявили две серии сигналов - более интенсивные и второстепенные минорные.

Более интенсивные серии сигналов спектра ЯМР ^{13}C принадлежали нейтральному полисахариду, *полисахариду 1* (Рисунок 38). В области резонанса аномерных атомов углерода (δ_{C} 93 – 109 м.д.) присутствуют шесть сигналов примерно равной интегральной интенсивности и два малых сигнала при δ_{C} 93,7 и 97,8 м.д., характерных для α - и β -пираноз на восстанавливающем конце олигосахаридов. Остальные основные сигналы располагались в областях δ_{C} 62 – 88 и 16 – 18 м.д.

Минорная серия сигналов при δ_{C} 104,2, 103,3, 101,8, 94,4 м.д. (зона аномерных атомов углерода), а также 26,1 м.д. (CH_3 от Ryr) и 21,7 м.д. (CH_3 от OAc) выявила присутствие очень небольшого количества кислого полимера (*полисахарид 2*), типичного для всех ранее исследованных штаммов *Clavibacter*, с повторяющимся звеном $\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -D-[4,6-S-Ryr]-Manp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-[2OAc]0,2-(1 \rightarrow .

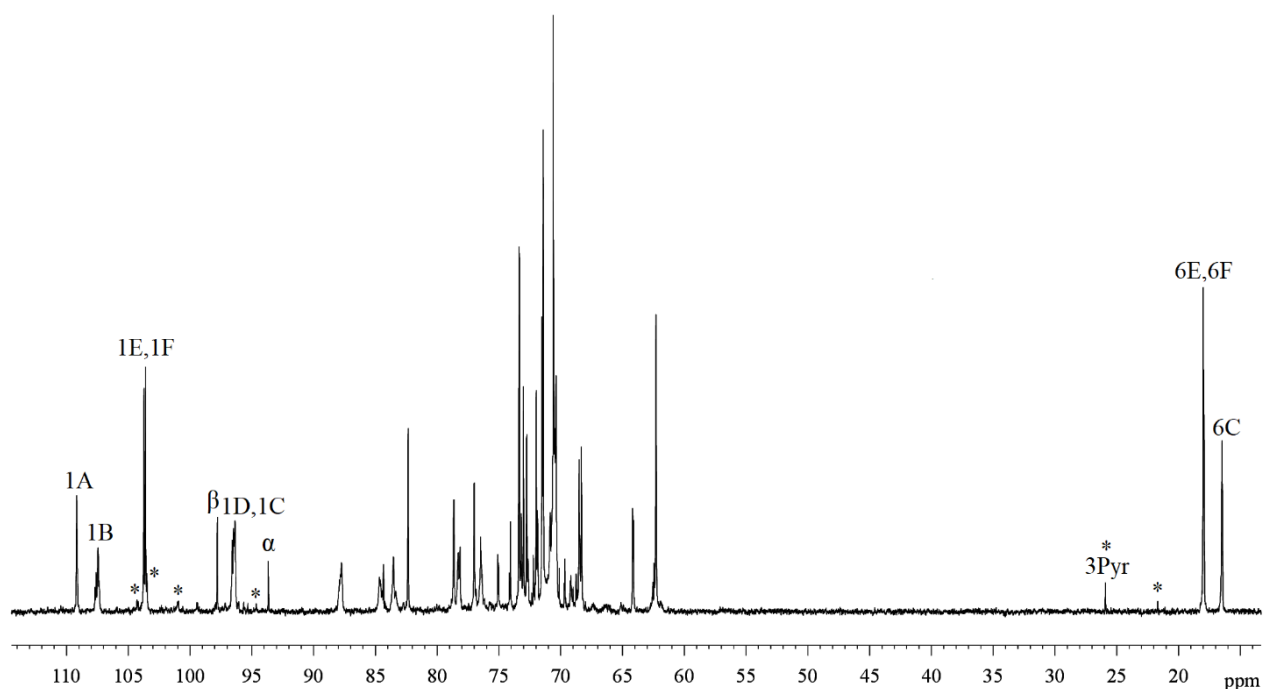


Рисунок 38. Спектр ЯМР ^{13}C препарата гликополимеров клеточной стенки *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T. Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 13. Сигналы кислого полисахарида (полисахарида 2, см. текст) обозначены звездочками.

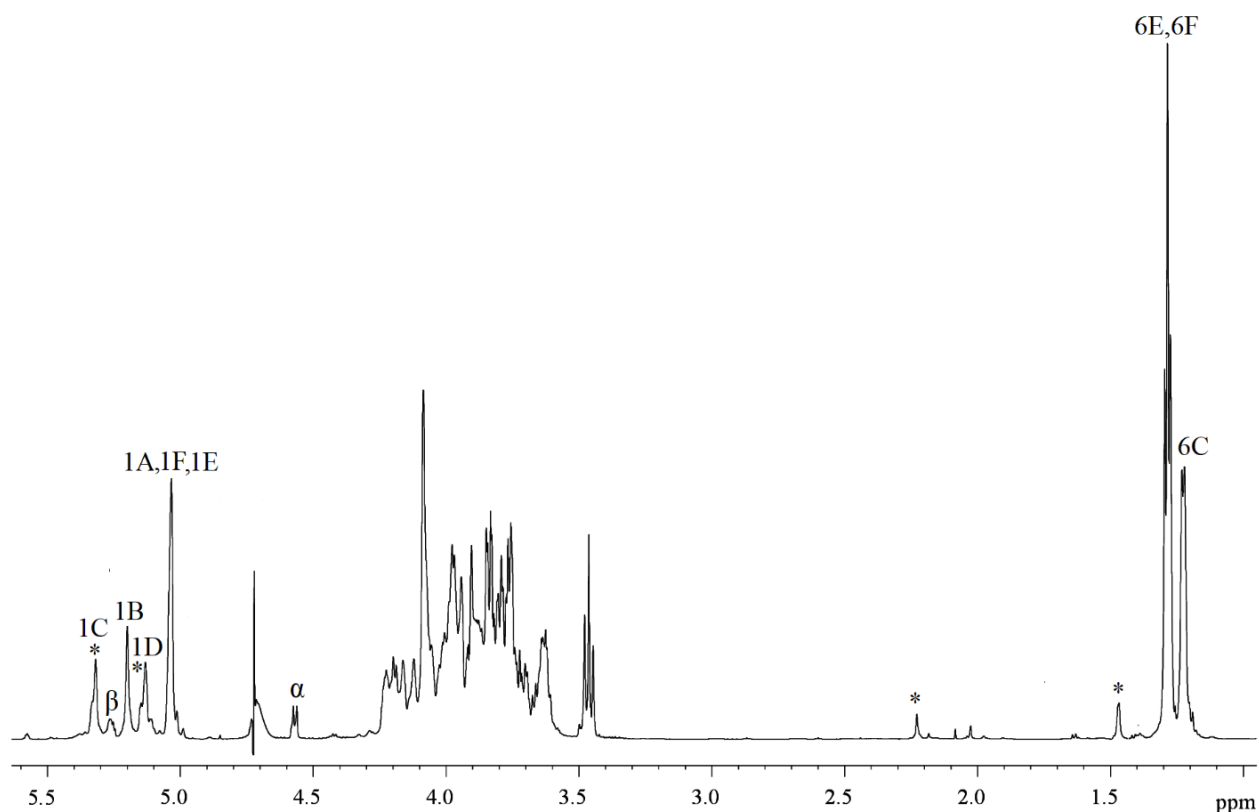


Рисунок 39. Спектр ЯМР ^1H препарата клеточной стенки *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T (полисахарид 1). Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 13. Сигналы кислого полисахарида (полисахарида 2, см. текст) обозначены звездочками.

Спектр ^1H ЯМР нейтрального полисахарида Ас-1406^Т (Рисунок 39) содержал четыре сигнала в аномерной области δ_{H} 4,99 – 5,45 м. д., один из них (5,04 м. д.) имеет тройную интегральную интенсивность. Два небольших пика при 4,57 и 5,25 м.д. принадлежали пиранозе на восстанавливающем конце цепи. Наблюдались такие же сигналы кислого полимера, например, 1,47 м.д. ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$ от Рур) и 2,23 м.д. ($\underline{\text{C}}\text{H}_3$ от ОАс).

Полученные таким образом предварительные данные подтвердили наличие в исследованной клеточной стенке двух бесфосфатных гликополимеров.

Структуры *полисахаридов 1 и 2* установлены на основании их двумерных гомоядерных ^1H , ^1H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных ^1H , ^{13}C HSQC и HMBC спектров с учетом данных об абсолютной конфигурации сахаров.

Анализ спектров ^1H , ^1H COSY, TOCSY и ROESY выявил два остатка β -галактофуранозы (β -Gal f , остатки **A** и **B** в Таблица 13), α -фукопиранозы (α -Fuc p , остаток **C**), α -галактопиранозы (α -Gal p , остаток **D**) и два остатка α -рамнопиранозы (α -Rhap, остатки **E** и **F**). Выводы о составе сахаров, размере кольца и аномерной конфигурации были сделаны на основе сравнения видимых констант связи и химических сдвигов остатков сахаров и соответствующих пираноз (Altona and Haasnoot, 1980; Janson et al., 1989) и фураноз (Angyal, 1979 ; Syr and Perlin, 1979).

Таблица 13. Химические сдвиги ^{13}C (δ_{C} TSP -1,6) и ^1H (δ_{H} TSP 0,0) галактофурана *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^Т.

Остаток	C-1 <i>H-1</i>	C-2 <i>H-2</i>	C-3 <i>H-3</i>	C-4 <i>H-4</i>	C-5 <i>H-5</i>	C-6 <i>H-6 (H-6a,6b)</i>
$\rightarrow 6)$ - β -D-Gal f -(1 \rightarrow A	109.1 5.04	82.3 4.12	78.3 4.06	84.6 4.00	70.7 3.97	70.5 3.88, 3.63
$\rightarrow 6)$ - β -D-Gal f -(1 \rightarrow B 2) ↑	107.4 5.20	87.7 4.16	76.5 4.23	83.8 4.02	70.9 3.96	70.5 3.86, 3.64
(F) $\rightarrow 3)$ - α -D-Fuc p -(1 2) ↑	96.4 5.32	71.4 4.08	76.9 4.09	73.0 3.90	68.3 4.17	16.5 1.23
α -D-Gal p -(1 3) ↑	96.8 5.13	68.5 3.97	78.6 3.78	70.5 4.09	72.7 3.98	62.3 3.76, 3.76
α -L-Rhap-(1 E	103.7 5.03	72.0 3.94	71.4 3.83	73.5 3.47	70.6 3.81	18.05 1.29
α -L-Rhap-(1 \rightarrow (3 C) F	103.6 5.04	72.0 3.94	71.4 3.84	73.5 3.47	70.6 3.80	18.0 1.28

Спектр ^{13}C ЯМР ВКМ Ас-1406^T (Рисунок 38) отнесен с использованием спектра ^1H , ^{13}C HSQC. Анализ спектра ^1H , ^{13}C HSQC (Рисунок 40, Таблица 13) выявил замещение в остатках сахаров на основании сравнения их химических сдвигов ^{13}C со сдвигами исходных пираноз и фураноз (Bock and Pedersen, 1983). Остатки $\beta\text{-Galf}$ оказались замещенными в положение 6 (δ_{C} -6 70,5 м.д., остаток **A**) и положениях 2 и 6 (δ_{C} -2 87,7 м.д. и δ_{C} -6 70,5 м.д., остаток **B**), остаток $\alpha\text{-Fucp}$ (остаток **C**) оказался дважды замещенным в положение 2 (δ_{C} -2 71,4 м.д. и δ_{C} -3 76,9 м.д.), $\alpha\text{-Galp}$ (остаток **D**) замещен в положение 3 (δ_{C} -3 78,6 м.д.) и $\alpha\text{-Rhap}$ (оба остатка **E** и **F**) были концевыми.

Последовательность остатков в повторяющемся звене определяли при анализе двумерного спектра 2D ^1H , ^1H ROESY (Рисунок 41). В спектре обнаружены следующие корреляционные пики между остатками $\delta_{\text{H}} / \delta_{\text{H}}$: Н-1(**A**)/Н-6' (**B**) 5,04/3,64; Н-1(**B**)/Н-6' (**A**), 5,20/3,63 и; Н-1(**C**)/Н-2(**B**), 5,32/4,16, Н-1(**D**)/Н-2(**C**), 5,13/4,09; Н-1(**E**)/Н-3(**D**) 5,03/3,78 и Н-1(**F**)/Н-3(**C**) 5,04/4,09.

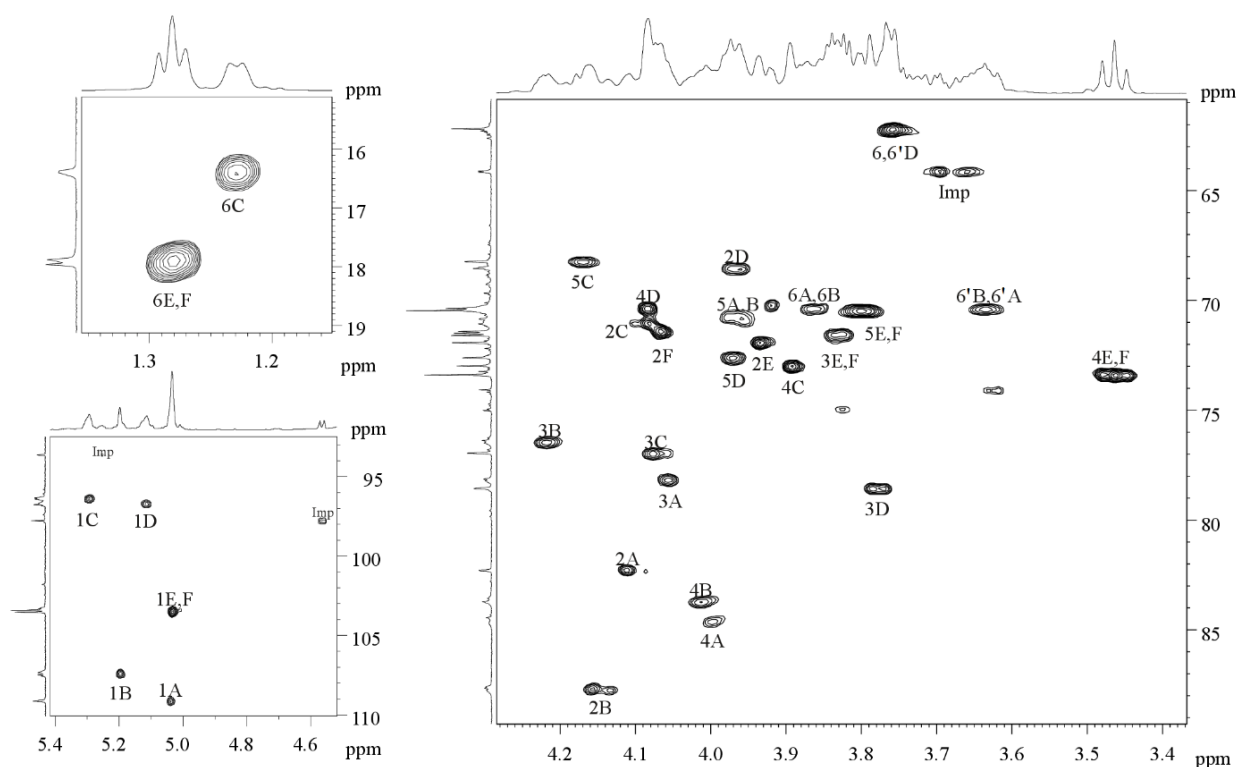


Рисунок 40. Участки 2D-спектра ^1H , ^{13}C HSQC полисахарида *I* из клеточной стенки *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T. Соответствующие части спектров ЯМР ^1H и ^{13}C отложены по горизонтальной и вертикальной осям соответственно. Арабские цифры относятся к атомам углерода в остатках, как указано в Таблице 13.

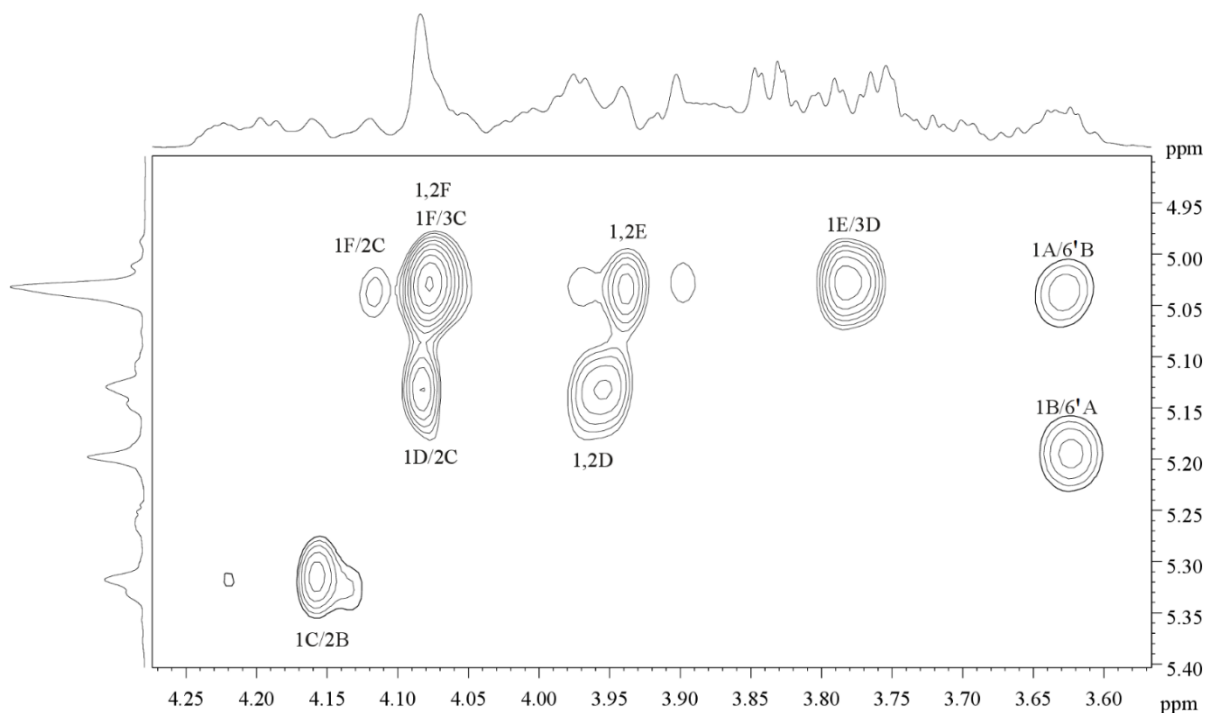


Рисунок 41. Часть 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY спектра полисахарида 1 клеточной стенки *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T. По осям показаны соответствующие части спектра ^1H ЯМР. Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 13. Пики межстаточной корреляции обозначены косой чертой.

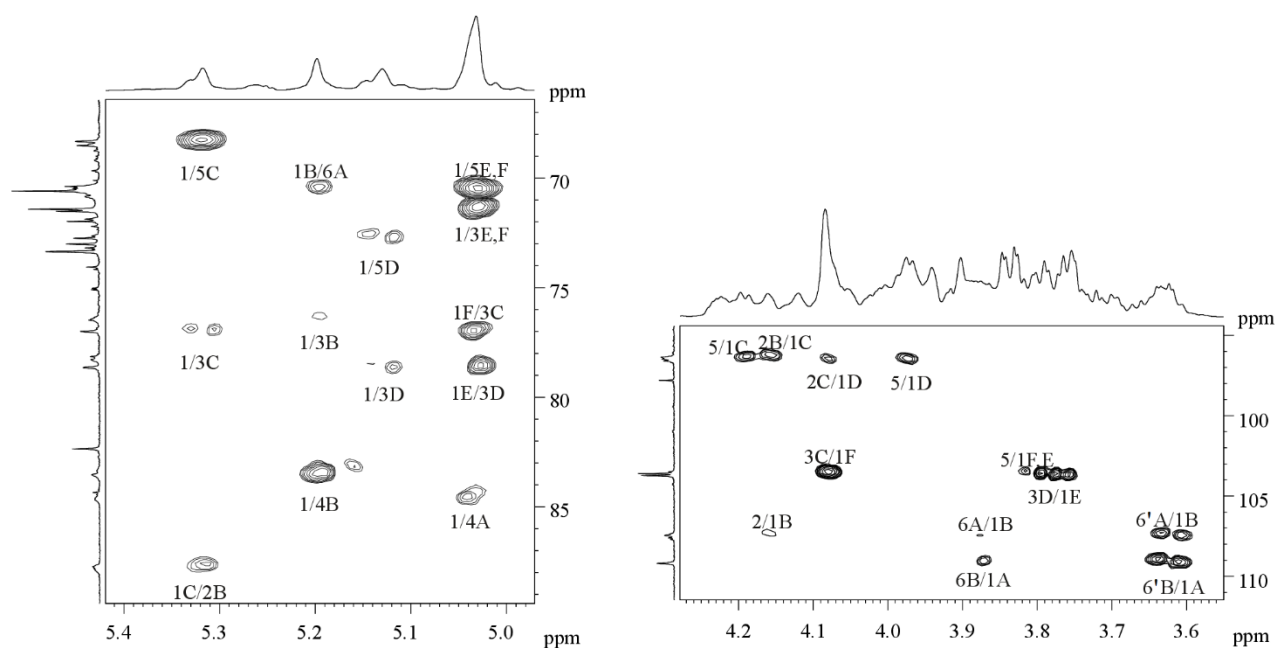
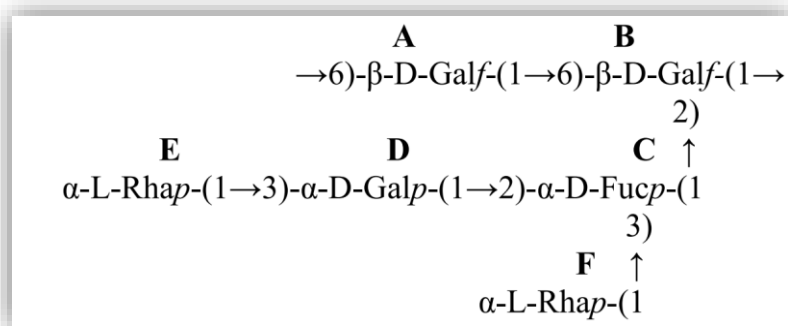


Рисунок 42. Участки 2D $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBSC спектра полисахарида 1 клеточной стенки *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T. Соответствующие части спектров ЯМР ^1H и ^{13}C отложены по горизонтальной и вертикальной осям соответственно. Арабские цифры перед косой чертой относятся к протонам, а после косой черты относятся к атомам углерода в соответствующих остатках, как указано в Таблице 13.

Наконец, последовательность была подтверждена при анализе спектров $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBSC (Рисунок 42, Таблица 13). Спектр $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMBSC показал, среди прочего, следующие

корреляционные пики между остатками δ_H/δ_C : Н-6'(A)/C-1(B), 3.63/107.4; Н-6'(B)/C-1(A), 3.64/109.1; Н-2(B)/C-1(C), 4.16/96.4; Н-2(C)/C-1(D), 4.08/96.8; Н-3(C)/C-1(F), 4.09/103.6; Н-3(D)/C-1(E), 3.78/103.7; Н-1(B)/C-6(A) (5.20/70.5), Н-1(C)/C-2(A) (5.32/87.7), Н-1(F)/C-3(C) (5.04/76.9), Н-1(E)/C-3(C) (5.03/78.6).

Итак, химические данные и данные ЯМР соответствуют формуле повторяющегося звена полисахарида 1:



Таким образом, выявлено, что штамм *Clavibacter tessellarius* ВКМ Ас-1406^T содержит нейтральный гликополимер полисахарид 1 с сильно разветвленным повторяющимся звеном цепи. Основная цепь полимера состоит из (1→6)-связанной β-D-галактофуранозы, где каждый второй остаток галактофуранозы замещен в положение 2 боковым разветвленным тетрасахаридом, α-L-Rhap-(1→3)-α-D-Galp-(1→2)-[α-L-Rhap-(1→3)]-α-D-Fucp-(1→). Кроме того, были обнаружены следы второго кислого полимера – полисахарида 2. Полимер был идентифицирован как пируватсодержащий галактоманнан с повторяющимся звеном →3)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-[4,6-S-Pyr]-Manp-(1→3)-α-D-Manp-[2OAc]_{0,2}-(1→, типичный для всех ранее исследованных штаммов *Clavibacter*.

4.6. Гликополимеры клеточных стенок *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555

Clavibacter phaseoli ВКМ Ас-2641^T является возбудителем бактериального заболевания фасоли, вызывающего пожелтение листьев фасоли (Gonzalez et al., 2014). *Clavibacter* ВКМ sp. Ас-2555 был выделен в Белгородской области, из осоки (*Carex* sp.) без видимых симптомов заболевания. Таксономическое родство штаммов подтверждено результатами изучения нуклеотидных последовательностей 16S рРНК генов (100 % ; 1405 п.н.) и фрагментов гиразных генов (*gyrB*) (744 п.н.), спектров целых клеток, полученных с использованием метода масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI TOF), и физиолого- биохимических характеристик штаммов (личное сообщение д.б.н. Л.И. Евтушенко).

Препараты гликополимеров выделяли из клеточных стенок с помощью 5% ТХУ экстракции при 90°C (горячая экстракция). Препарат, а также выделенные из него гликополимеры были исследованы химическими и ЯМР-спектроскопическими методами.

Предварительные исследования препаратов проводили химическими методами и 1D спектроскопией ЯМР на ядрах протона и углерода (^1H и ^{13}C). Спектры ЯМР показали, что препарат из штамма ВКМ Ас-2641^T содержал нейтральный *полисахарид 1*, а препарат из штамма ВКМ Ас-2555 представлял собой смесь нейтрального *полисахарида 1* и кислого *полисахарида 2* (небольшое количество).

4.6.1. Предварительное изучение клеточных стенок из ВКМ Ас-2641^T и ВКМ Ас-2555, а также гликополимеров из них химическими методами

В кислотных гидролизатах клеточных стенок *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555 и препаратов из них выявлены галактоза, манноза, рибоза и следовые количества глюкозы (следовые количества только в гидролизатах клеточных стенок; Рисунок 9, Рисунок 10), а фосфатсодержащие соединения не обнаружены (электрофорез). Однако, пировиноградная кислота обнаружена во всех гидролизатах клеточных стенок. Можно предположить, что эти соединения входят в состав гликополимеров клеточных стенок изучаемых актинобактерий.

ГЖХ-хроматография гидролизатов гликополимерных препаратов выявила Gal, Rib и Man в соотношении 2 : 1 : 2 (штамм ВКМ Ас-2641^T) и 2 : 0,8 : 2 (штамм ВКМ Ас-2555). Все сахара из *полисахаридов 1* и *2* оказались D-конфигурации.

4.6.2. Предварительное ЯМР-исследование препаратов из штаммов ВКМ Ас-2641^T и ВКМ Ас-2555

Предварительное изучение структуры полимеров проводили методами 1D спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C . Спектр ^{13}C ЯМР препарата из штамма ВКМ Ас-2641^T (Рисунок 43) был характерен для регулярного полисахарида. Область резонанса аномерных атомов углерода (δ_{C} 100 – 109 м.д.) содержала пять сигналов примерно равной интегральной интенсивности. Остальные сигналы располагались в области δ_{C} 62 – 88 м.д. и 16–18 м.д.

Спектр ЯМР ^1H препарата из штамма ВКМ Ас-2641^T (Рисунок 44) содержал четыре сигнала в аномерной области δ_{H} 4,99 – 5,45 м. д., один из них (4,99 м. д.) имел двойную интегральную интенсивность.

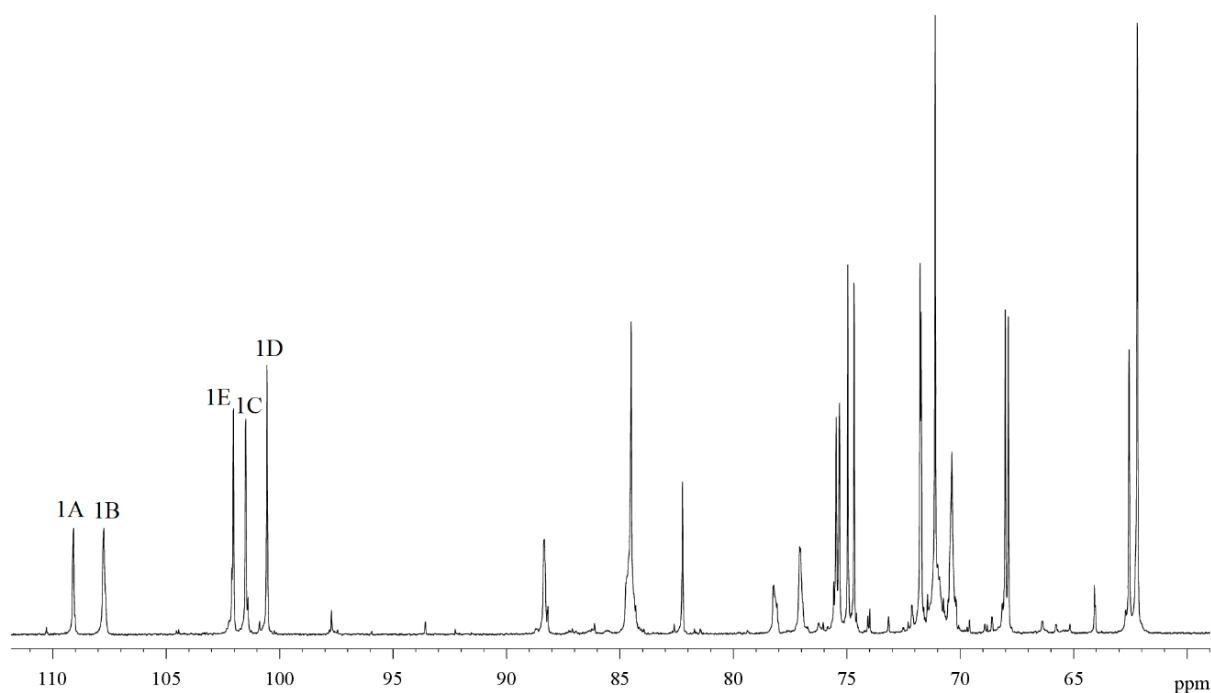


Рисунок 43. Спектр ЯМР ^{13}C препарата клеточной стенки *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^Т (полисахарид 1). Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 14.

Основные сигналы в спектре ЯМР ^{13}C препарата штамма ВКМ Ас-2555 (Рисунок 45) идентичны таковым в спектре препарата штамма ВКМ Ас-2641^Т. Кроме того, в спектре наблюдался набор второстепенных сигналов (около 5 – 7%) (обозначены звездочками). Анализ химических сдвигов показал полную идентичность подспектра ^{13}C минорного полисахарида спектру ЯМР ^{13}C кислого полисахарида *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372 и Ас-1374 со структурой повторяющихся звеньев $\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-[4,6-S-Pyr]-Manp-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Manp-(1}\rightarrow$, где часть остатков маннозы несет группу ОАс в положение 2.

Основные сигналы спектра ЯМР ^1H штамма ВКМ Ас-2555 (Рисунок 46) идентичны сигналам штамма ВКМ Ас-2641^Т. Второстепенные пики (обозначенные звездочками) были типичны для вышеупомянутого кислого полисахарида.

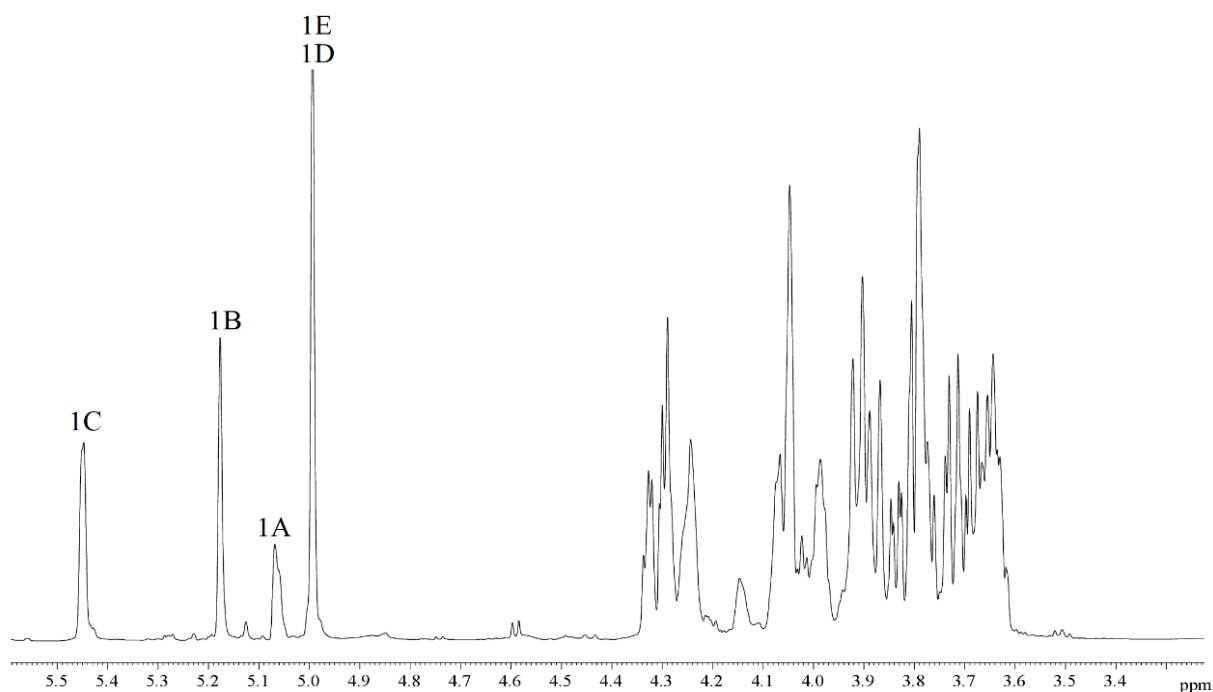


Рисунок 44. Спектр ЯМР ^1H препарата клеточной стенки *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T (полисахарид 1). Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 14.

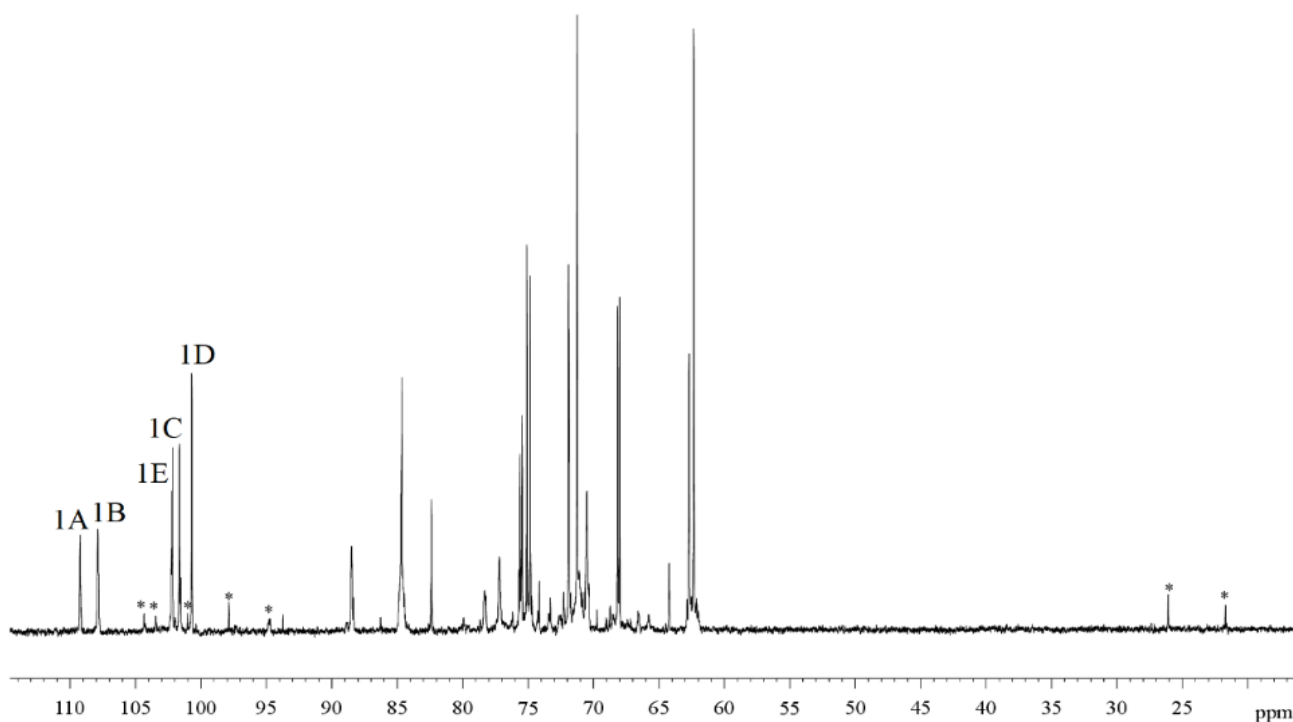


Рисунок 45. Спектр ЯМР ^{13}C препарата клеточной стенки *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555 (смесь полисахаридов 1 и 2). Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 14. Сигналы кислого полисахарида обозначены звездочкой.

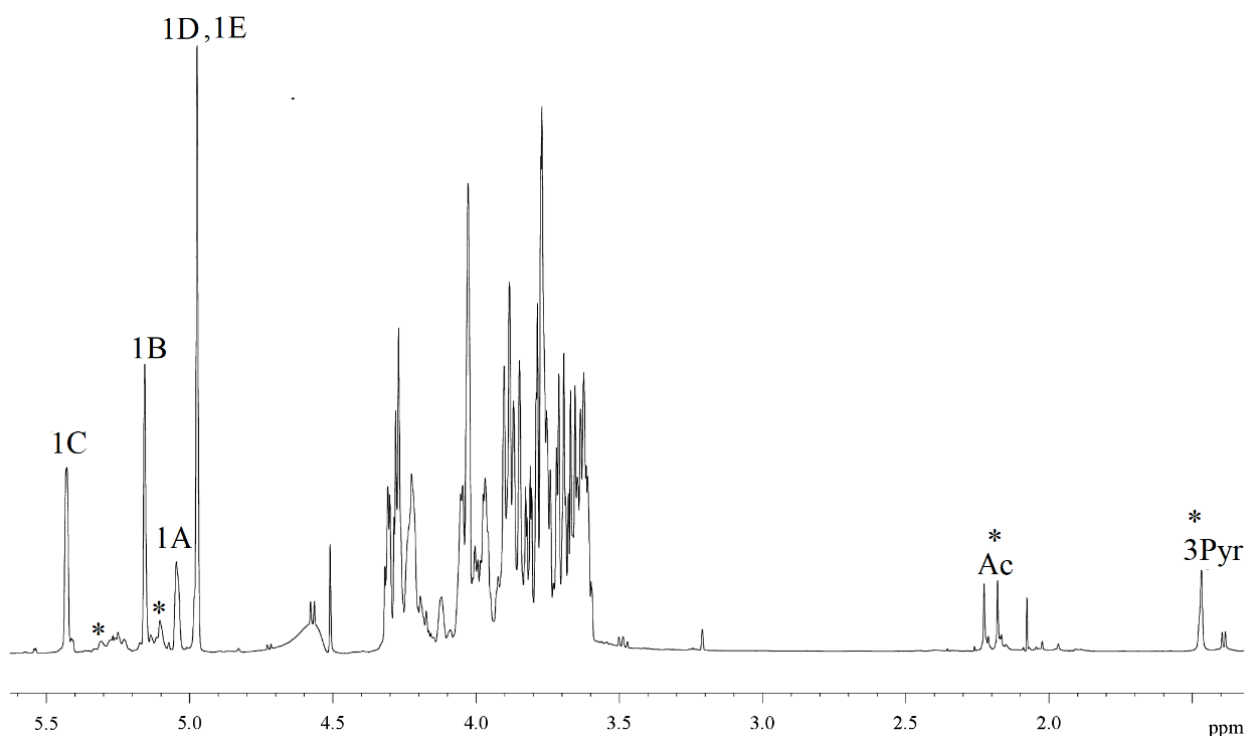


Рисунок 46. Спектр ЯМР ^1H препарата клеточной стенки *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555 (смесь полисахаридов 1 и 2). Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 14. Сигналы кислого полисахарида (см. текст) обозначены звездочкой.

Таблица 14. Химические сдвиги в спектрах ЯМР ^{13}C и ^1H (δ_{C} TSP – 1.6 и δ_{H} TSP 0.0) нейтральных полимеров клеточных стенок *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555

Остатки	C1 <i>H1</i>	C2 <i>H2</i>	C3 <i>H3</i>	C4 <i>H4</i>	C5 <i>H5</i>	C6 <i>H6, H6'</i>
$\rightarrow 6)$ - β -D-Galf-(1 \rightarrow (A)	109.1 5.05	82.4 4.13	78.3 4.06	84.6 4.01	71.2 3.98	70.5 3.93; 3.66
$\rightarrow 6)$ - β -D-Galf-(1 \rightarrow (B) 2)	107.8 5.17	88.4 4.23	77.2 4.25	84.6 4.05	71.2 3.98	70.5 3.92; 3.66
$\rightarrow 2,3)$ - α -D-Ribf-(1 \rightarrow (C) ↑	101.5 5.45	75.5 4.33	75.6 4.31	84.7 4.28	62.6 3.79; 3.72	
α -D-Manp-(1 \rightarrow 2) (D)	100.6 4.99	71.2 4.04	71.9 ^a 3.88	68.1 ^a 3.69	75.1 ^a 3.62	62.3 ^a 3.90; 3.77
α -D-Manp-(1 \rightarrow 3) (E)	102.1 4.99	71.2 4.04	71.9 ^a 3.84	68.0 ^a 3.71	74.9 ^a 3.63	62.3 ^a 3.87; 3.77

Структура нейтрального полисахарида из штамма ВКМ Ас-2641^T установлена на основании 2D-гомоядерных ^1H , ^1H -COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных ^1H , ^{13}C -HSQC и НМВС-спектров и подтверждена 1D-спектрами ЯМР с селективным возбуждением аномерных протонов (не приведено).

В спектрах ^1H , ^1H COSY, TOCSY и ROESY обнаружены два остатка β -галактофуранозы (β -Gal f , остатки **A** и **B** в Таблице 14), α -рибофуранозы (α -Rib f , остаток **C**) и два остатка α -маннопиранозы (α -Man p , остатки **D** и **E**). Одномерные спектры ЯМР были полезны для точного определения химических сдвигов и для визуализации формы сигнала. Выводы о составе сахаров, размере кольца и аномерной конфигурации были сделаны на основе сравнения видимых констант связи и химических сдвигов остатков сахаров и соответствующих пираноз (*Altona & Haasnoot, 1980; Janson et al., 1989*) и фураноз (*Angyal, 1979; Syr and Perlin, 1979*).

Спектр ЯМР ^{13}C нейтрального полисахарида из штамма ВКМ Ас-2641^T (Рисунок 43) расшифрован с использованием спектра ^1H , ^{13}C HSQC. Анализ спектра ^1H , ^{13}C HSQC (Рисунок 47, Таблица 14) выявил замещения в остатках сахаров на основании сравнения их химических сдвигов ^{13}C со сдвигами исходных пираноз и фураноз. Остатки β -Gal f оказались замещенными в положении 6 (δ_{C} -6 70,5 м.д., остаток **A**) и положениях 2, 6 (δ_{C} -2 88,4 м.д. и δ_{C} -6 70,5 м.д., остаток **B**), остатки α -Rib f были замещены в положениях 2 и 3 (δ_{C} -2 75,5 м.д. и δ_{C} -3 75,6 м.д., остаток **C**), а α -Man p (остатки **D** и **E**) оказались концевыми.

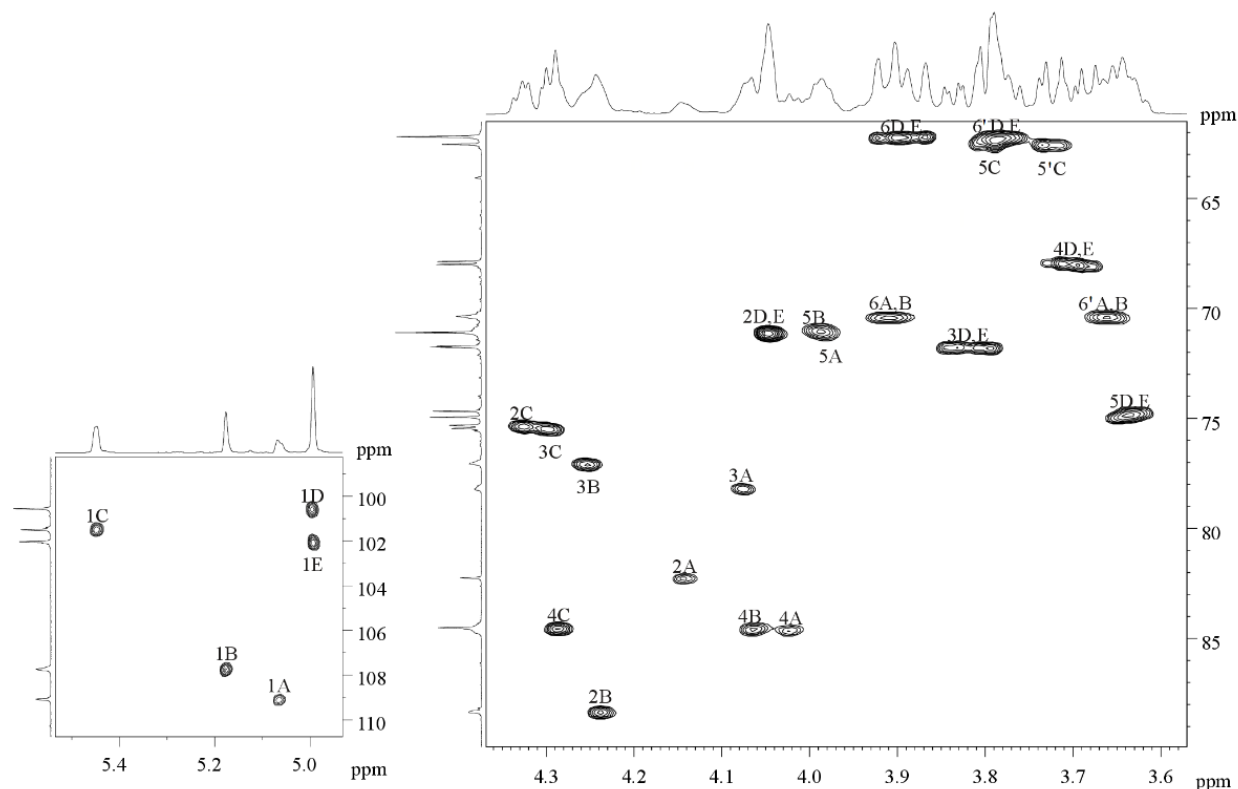


Рисунок 47. Части 2D ^1H , ^{13}C HSQC спектра полисахарида 1 из клеточной стенки *C.phaseoli* ВКМ Ас-2641^T. Соответствующие части спектров ЯМР ^1H и ^{13}C отложены по горизонтальной и вертикальной осям соответственно. Арабские цифры относятся к атомам углерода в остатках, как указано в Таблице 14.

Последовательность остатков в повторяющемся звене определяли при анализе 1D- и 2D-спектров ^1H , ^1H ROESY (Рисунок 48). В 1D- и 2D-спектрах ^1H , ^1H ROESY обнаружены следующие

межстаточные пики корреляции δ_H / δ_H : H-1(A)/H-6,6' (B), 5.05/3.92 и 3.66; H-1(B)/H-6,6' (A), 5.17/3.93 and 3.66; H-1(C)/H-2(B), 5.45/4.23, H-1(D, E)/ H-2,3(C), 4.99/4.33 и 4.31.

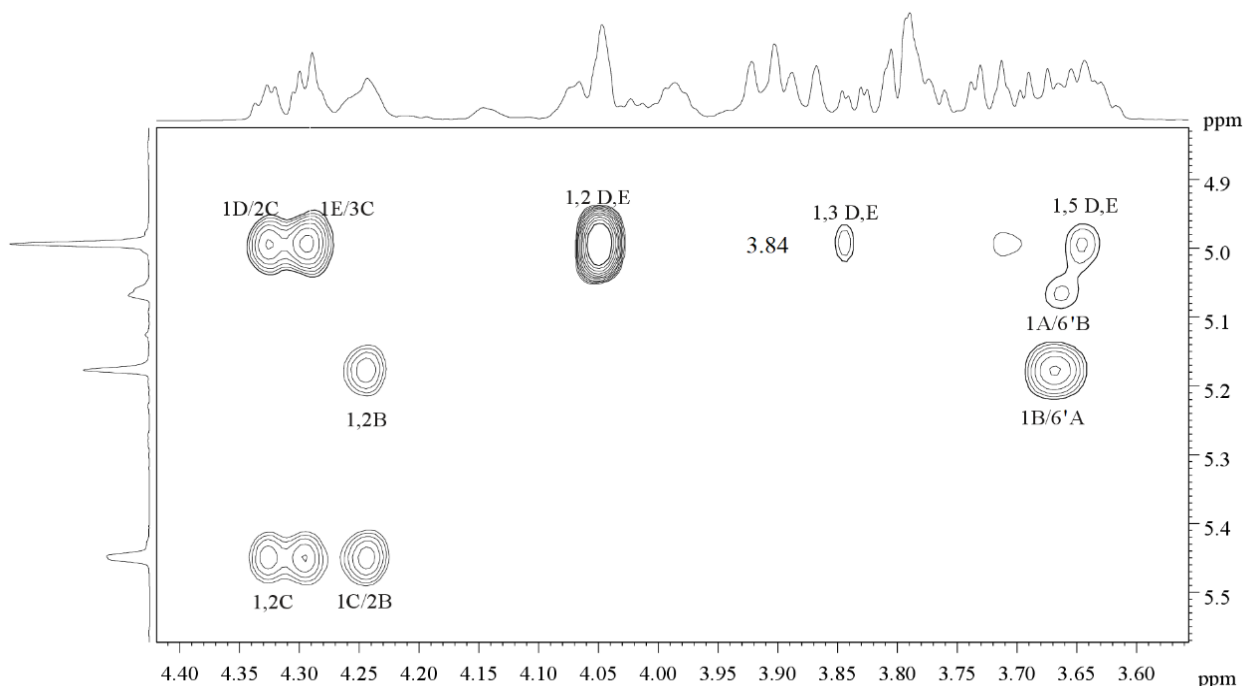


Рисунок 48. Часть 2D $^1\text{H}, ^1\text{H}$ ROESY спектра полисахарида 1 клеточной стенки *S. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T. По осям показаны соответствующие части спектра ЯМР ^1H . Арабские цифры относятся к атомам в остатках, обозначенных заглавными буквами, как в Таблице 14. Пики корреляции между остатками обозначены косой чертой.

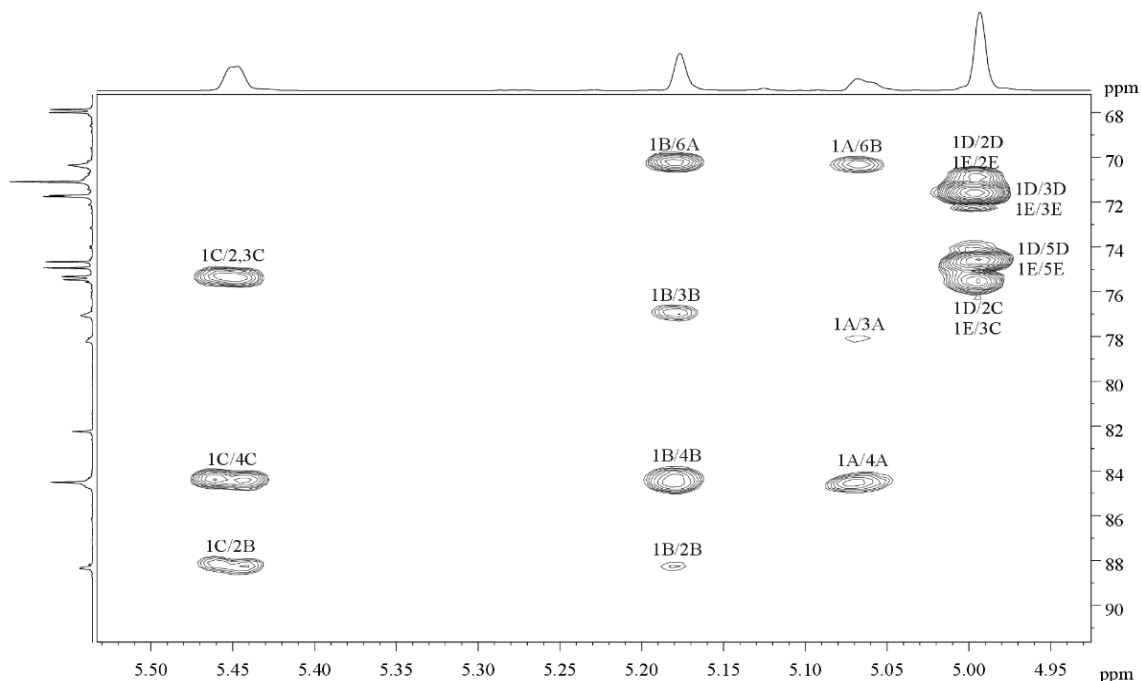


Рисунок 49. Участки двумерного спектра $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ HMQC полисахарида 1 клеточной стенки *S. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T. Соответствующие части спектров ЯМР ^1H и ^{13}C отложены по горизонтальной и вертикальной осям соответственно. Арабские цифры перед косой чертой относятся к протонам, а после косой черты относятся к атомам углерода в соответствующих остатках, как указано в Таблице 14.

Итак, в результате наших исследований была установлена структура шести нейтральных гликополимеров, в интегральную цепь которых входит (1→6)-связанный β-D-галактофуранан, каждый второй остаток которого замещён по гидроксилу при C-2/3 ди-, три- либо тетрасахаридом различного состава. Кроме того, выявлен кислый галактоманнан, общий для всех изученных клавибактеров (для штамма ВКМ Ас-2641^T этот полимер не выявлен методом ЯМР-спектроскопии, видимо, из-за незначительного количества в клеточной стенке; однако на его присутствие указывало наличие пировиноградной кислоты на хроматограммах кислотных гидролизатов препаратов, как компонентов этого гликополимера). Отметим, что структуры всех эти гликополимеров уникальны и обнаружены впервые в природе.

Глава V. Обсуждение результатов

Новые структуры гликополимеров служат хемотаксономическими маркерами видов рода *Clavibacter*

Настоящая работа выполнена с целью изучения моносахаридного состава и гликополимеров клеточных стенок некоторых представителей рода *Clavibacter* для дальнейшего использования в установлении или уточнении видового статуса изучаемых штаммов и создания более совершенной системы идентификации фитопатогенов, а также оценки таксономической значимости признака «состав и структура гликополимеров клеточных стенок» для бактерий этого рода.

В соответствии с поставленной целью были получены клеточные стенки 9 штаммов актинобактерий, изучен их моносахаридный состав, а также состав и структуры гликополимеров этих актинобактерий.

Сахара клеточной стенки в характеристике бактерий рода Clavibacter

Сравнительный анализ опубликованных в литературе и данных настоящей работы по «сахарам клеточных стенок» показал, что определение сахаров в препаратах клеточных стенок является наиболее информативным и позволяет: а) локализовать найденные моносахариды; б) выявить дополнительные диагностические для таксона моносахариды, которые ранее не считались таковыми. Обнаружение характерных моносахаридов в составе клеточных стенок в некоторых случаях может достаточно точно указывать на принадлежность к определенному роду.

Клеточные стенки всех девяти исследованных штаммов (Таблица 15) содержали набор сахаров, среди которых галактоза, манноза, глюкоза (следовые количества) были выявлены во всех организмах. У некоторых штаммов дополнительно обнаружены фукоза, рамноза, глюкозамин и рибоза.

Наши результаты для *C. michiganensis*, *C. insidiosus*, *C. nebraskensis* и *C. tesselarius* в целом совпадают с данными, приведенными для этих видов в работе Davis et al. (1984). Однако у отдельных штаммов, в том числе у изученных претендентов на новый вид, нами были дополнительно выявлены глюкозамин и рибоза (Таблица 15). Отметим, что хемотаксономический признак «состав сахаров клеточной стенки» как правило отражает состав структурных компонентов гликополимеров клеточной стенки.

Таким образом, различный моносахаридный профиль клеточных стенок типовых штаммов клавибактерий согласуется с их принадлежностью к разным видам рода, поскольку обнаружение у штамма моносахарида, не найденного в составе клеточных стенок известных (близких) видов, с высокой степенью вероятности свидетельствует о том, что такой штамм относится к другому виду (Stackebrandt, 2006; Тульская, 2009).

Таблица 15. Сахара клеточных стенок изученных штаммов рода *Clavibacter*

Штаммы	Сахара в гидролизатах клеточной стенки*					
	Gal	Man	Fuc	Rib	Rha	GlcN
<i>C. insidiosus</i> ВКМ Ас-1402 ^T	+	+	+	(+)	+	+
<i>C. nebraskensis</i> ВКМ Ас-1404 ^T	+	+	+	–	+	+
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1403 ^T	+	+	+	–	+	+
<i>C. tessellarius</i> ВКМ Ас-1406 ^T	+	+	+	–	+	–
<i>C. phaseoli</i> ВКМ Ас-2641 ^T	+	+	–	+	–	–
<i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас -2555	+	+	–	+	–	–
<i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1371	+	+	–	+	–	–
<i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1372	+	+	–	+	–	–
<i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1372	+	+	–	+	–	–

+ – присутствует, – – отсутствует, (+) – следовые количества, н.р. – настоящая работа

*У всех штаммов обнаруживается также глюкоза в следовых количествах.

Структуры гликополимеров, как хемотаксономический маркер видов рода *Clavibacter*.

В работе показано, что **набор гликополимеров клеточных стенок** исследованных штаммов включает два гликополимера – нейтральной и кислой природы (Таблица 16). При этом кислый гликополимер – пируватсодержащий галактоманнан с повторяющимся звеном $\rightarrow 3$)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -D-[4,6-S-Pyr]-Manp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-(1 \rightarrow (в ряде случаев несущий O-ацетильные группы), присутствовал в составе клеточных стенок всех 9 изученных штаммов *Clavibacter*. Полимер с такой структурой является уникальным и к настоящему времени описан только у представителей рода *Clavibacter* (<http://csdb.glycoscience.ru>, 2024). И хотя методами ЯМР-спектроскопии не удалось определить присутствие пируватсодержащего галактоманнана у *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T (вероятно, из-за его незначительного количества), химическими методами был обнаружен его компонент (пировиноградная кислота) в составе препарата «горячей экстракции», полученного из клеточных стенок штамма при повторных выращиваниях (наши неопубликованные данные).

Обнаружение идентичного по структуре гликополимера у пяти типовых штаммов и четырех не определённых до вида штаммов *Clavibacter* может свидетельствовать о том, что, этот гликополимер является **хемотаксономическим признаком актинобактерий на уровне рода**.

В клеточных стенках исследуемых актинобактерий также были выявлены нейтральные гликополимеры – (1 \rightarrow 6)-связанные галактофурананы (Таблица 16). Вероятно, интегральная цепь

галактофурананов, идентичная для всех штаммов, также как пируватсодержащий галактоманнан, может являться хемотаксономическим признаком бактерий рода *Clavibacter*.

Таблица 16. Гликополимеры клеточных стенок изученных представителей рода *Clavibacter*

Штаммы ВКМ	Гликополимеры						
	ГФ 1	ГФ 2	ГФ 3	ГФ 4	ГФ 5	ГФ 6	ГМ
<i>C. insidiosus</i> Ac-1402 ^T	◆						●
<i>C. michiganensis</i> Ac-1403 ^T		◆					●
<i>C. nebraskensis</i> Ac-1404 ^T			◆				●
<i>C. tessellarius</i> Ac-1406 ^T				◆			● O-Ac
<i>C. phaseoli</i> Ac-2641 ^T					◆		●*
<i>Clavibacter</i> sp. Ac-2555					◆		● O-Ac
<i>Clavibacter</i> sp. Ac-1371						◆	●
<i>Clavibacter</i> sp. Ac-1372						◆	● O-Ac
<i>Clavibacter</i> sp. Ac-1374						◆	● O-Ac

(◆) – ГФ, галактофуранан, (●) – ГМ, галактоманнан;

ГМ: $\rightarrow 3$ - α -D-Galp-(1 \rightarrow 3)- α -D-[4,6-S-Pyr]-Manp-(1 \rightarrow 3)- α -D-Manp-(1 \rightarrow ;

ГФ 1: $\rightarrow 6$ - β -D-Galf-(1 \rightarrow 6)- β -D-[β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Fucp-(1 \rightarrow 3)]-Galf-(1 \rightarrow ;

ГФ 2: $\rightarrow 6$ - β -D-Galf-(1 \rightarrow 6)- β -D-[β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 2)- α -D-Fucp-(1 \rightarrow 3)]-Galf-(1 \rightarrow ;

ГФ 3: $\rightarrow 6$ - β -D-Galf-(1 \rightarrow 6)- β -D-[β -D-GlcpNAc-(1 \rightarrow 3)- α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Fucp-(1 \rightarrow 3)]-Galf-(1 \rightarrow 6)- β -D-Galf-(1 \rightarrow 6)- β -D-[α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Fucp-(1 \rightarrow 3)]-Galf-(1 \rightarrow ;

ГФ 4: $\rightarrow 6$ - β -D-Galf-(1 \rightarrow 6)- β -D-{ α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)- α -D-Galp-(1 \rightarrow 2)- α -D-[α -L-Rhap-(1 \rightarrow 3)]-Fucp-(1 \rightarrow 2)}-Galf-(1 \rightarrow ;

ГФ 5: $\rightarrow 6$ - β -D-Galf-(1 \rightarrow 6)- β -D-{ α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-[α -D-Manp-(1 \rightarrow 3)]-Ribf-(1 \rightarrow 2)}-Galf-(1 \rightarrow ;

ГФ 6: $\rightarrow 6$ - β -D-Galf-(1 \rightarrow 6)- β -D-[α -D-Manp-(1 \rightarrow 2)- α -D-Ribf-(1 \rightarrow 2)]-Galf-(1 \rightarrow .

Если интегральная цепь нейтральных полимеров построена одинаково, то боковые заместители, ди-, три- и тетрасахариды, различаются по составу и структуре у представителей разных видов, что указывает на различие в структуре самих галактофурананов. Различающийся состав и структуры гликополимеров, характерных для представителей изученных видов клавибактерий приведены в Таблица 16.

Отметим, что *C. insidiosus* ВКМ Ac-1402^T, *C. michiganensis* ВКМ Ac-1403^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ac-1404^T содержат идентичные по качественному составу нейтральные полимеры, галактофурананы. Так, галактофурананы, в качестве заместителя несут боковой трисахарид, состоящий из фукопиранозы, рамнопиранозы и глюкозамина. Однако их структуры различаются по ряду параметров. У *C. insidiosus* ВКМ Ac-1402^T и *C. nebraskensis* ВКМ Ac-1404^T гликозидная связь между рамнопиранозой и фукопиранозой – (1 \rightarrow 3), в то время как у *C. michiganensis* ВКМ Ac-1403^T связь – (1 \rightarrow 2). Кроме того, каждый второй остаток галактофуранозы *C. nebraskensis* ВКМ Ac-1404^T гликозилирован либо трисахаридом, либо дисахаридом, что отличает этот полимер от такового у *C. insidiosus* ВКМ Ac-1402^T.

Структуры и состав гликополимеров клеточных стенок изученных актинобактерий рода *Clavibacter* (Таблица 16) хорошо коррелируют с филогенетической группировкой этих организмов (Li et al., 2018; Starodumova et al., 2018).

Сравнивая данные о структурах гликополимерах клеточных стенок с результатами исследований, других авторов (Li et al., 2018), можно увидеть, что штамм *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T достаточно удален от *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T и *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T (примерно 92% средней идентичности нуклеотидов (ANI), и около 48% по цифровой ДНК-ДНК-гибридации (dDDH)). Что касается штаммов *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T и *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T, то они являются “более близкими родственниками” по генетическим показателям (примерно 95% ANI и примерно 60% по dDDH), которые являются практически пограничными значениями при определении степени родства микроорганизмов. Таким образом, незначительная разница в структурах гликополимеров, чётко определяемая в ЯМР-спектроскопических исследованиях, достаточно хорошо согласуется с генетическими данными.

Таким образом, пируватсодержащий галактоманнан и галактофурананы с олигосахаридными боковыми заместителями специфичны для представителей рода *Clavibacter*. С другой стороны, структуры галактофурананов с ди-, три- или тетрасахаридными заместителями различного состава и структуры могут служить диагностическими признаками или хемотаксономическими маркерами видов *Clavibacter*.

ЯМР спектроскопия является важным аналитическим методом для характеристики новых видов

Хемотаксономические методы сыграли важную роль в развитии полифазного подхода в классификации архей и бактерий. В настоящее время считается, что применение этих методов не является необходимым в эпоху, когда геномные данные доступны и достаточны для определения видов. Однако, ведущие микробиологи утверждают (Vandame and Sutcliffe, 2021), что «хемотаксономия будет процветать, если улучшенные аналитические методы будут внедрены и использованы, в первую очередь специализированными лабораториями, в исследованиях на таксономических уровнях, выходящих за рамки характеристики новых видов».

Так, сравнение ¹³C ЯМР-спектров как своеобразных «фингерпринтов» позволило визуализировать **различия** в составе гликополимеров изучаемых штаммов, что свидетельствовало о различиях типовых штаммов (и штаммов-претендентов на новые виды) на фенотипическом уровне. Такой метод был предложен ранее для идентификации типовых штаммов рода *Nocardiopsis* (Naumova et al., 2001; Tul'skaya et al., 2014), рода *Streptomyces* (Тульская и др., 2007).

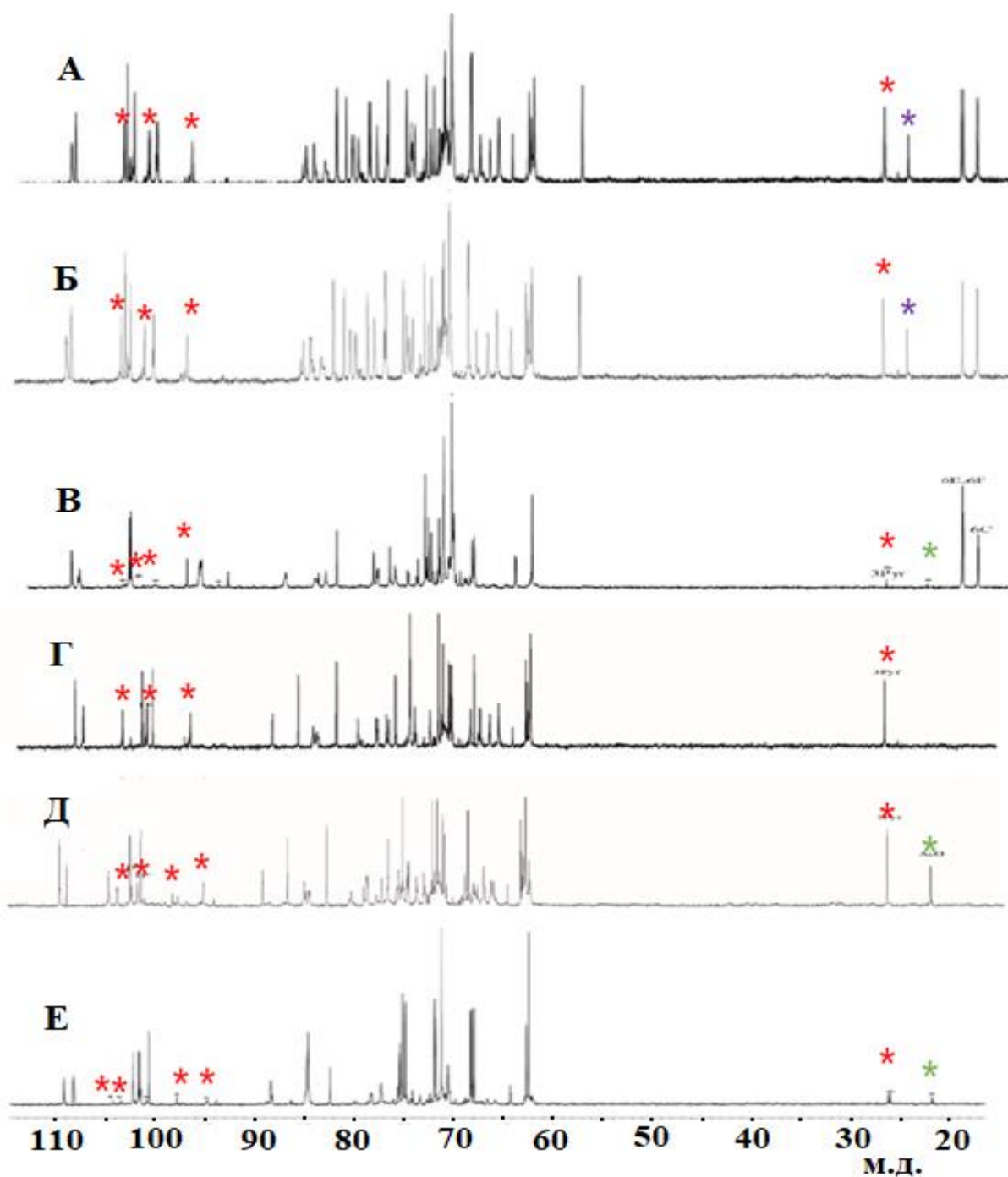


Рисунок 50. ^{13}C ЯМР – спектры суммарных препаратов (кислый + нейтральный гликополимеры): *C. insidiosus* Ac-1402^T, *C. nebraskensis* Ac-1404^T (А); *C. michiganensis* Ac-1403^T (Б); *C. tessellarius* Ac-1406^T (В); *Clavibacter* sp. Ac-1371 (Г); *Clavibacter* sp. Ac-1372 и *Clavibacter* sp. Ac-1374 (Д); *C. phaseoli* Ac-2641^T и *Clavibacter* sp. Ac-2555 (Е). Красными звездочками обозначены кислый ГП, фиолетовыми – CH_3 группы N ацетила, зелеными – О-ацетильные группы.

В нашей работе характерные особенности первичной структуры гликополимеров удалось выявить с помощью ЯМР-спектроскопических исследований. Лишь с помощью метода ЯМР удалось локализовать гликозидные связи между рамнопиранозой и фукопиранозой в галактофурананах *C. insidiosus* ВКМ Ac-1402^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ac-1404^T и *C. michiganensis*

ВКМ Ас-1403^T. Кроме того, именно с помощью двумерной ЯМР-спектроскопии в галактофуранане *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T обнаружены как три-, так и дисахаридные боковые заместители, а также выявить и локализовать остатки пировиноградной кислоты в общем для всех изученных актинобактерий кислотном полимере галактоманнана. На Рисунке 9 представлены одномерные ¹³C ЯМР спектры суммарных препаратов изученных клавибактерий. Сравнение этих спектров уже на этом уровне позволяет выявить чёткую разницу в структурах гликополимеров у различных видов. А некую «похожесть» **A** и **B** спектров, но различие выявленных структур, легко объяснить с помощью двумерных ¹H,¹³C HSQC, ¹H,¹³C HMBC спектров (Tul'skaya et al., 2024).

Таким образом, применение методов ЯМР-спектроскопии является надежным и основополагающим методом в изучении структур углеводсодержащих бактериальных гликополимеров.

В целом настоящее исследование демонстрирует, что структуры и состав гликополимеров клеточной стенки вместе с продуктами их химической деградации и спектрами ЯМР являются индикаторными для видов рода *Clavibacter* и могут быть использованы в качестве надежных хемотаксономических критериев, в том числе и в качестве фингерпринтов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа выполнена в рамках изучения биологического разнообразия актинобактерий, а также структурного разнообразия природных биополимеров и посвящена изучению углеводного состава клеточных стенок фитопатогенных видов, а также новых представителей рода – претендентов на новый вид, из рода *Clavibacter*, не изученных в этом отношении ранее.

Актинобактерии рода *Clavibacter* представляют собой группу грамположительных актинобактерий (семейство *Microbacteriaceae*, порядок *Micrococcales*, класс *Actinomycetes*). Восемь известных видов рода – специализированные возбудители сосудистых заболеваний растений, три из которых являются карантинными объектами во многих странах мира (Li et al., 2018; <https://lpsn.dsmz.de/genus/clavibacter>, 2024; <https://gd.eppo.int>, 2024). Кроме того, были предложены к изучению претенденты на новые виды рода *Clavibacter*, включая непатогенные эндофиты, что подчеркивает генетические и экологические различия внутри этого рода (Starodumova et al., 2018).

В результате проведенных исследований получены новые данные о химическом составе клеточных стенок пяти типовых штаммов валидных фитопатогенных видов, а также четырёх претендентов на новый вид, выделенных из растений без признаков заболевания рода *Clavibacter*.

Каждый штамм содержал кислый и нейтральный полимер. Установлено шесть новых структур нейтральных гликополимеров, интегральная цепь которых построена из (1→6)-связанных остатков β-D-галактофуранозы, каждый второй остаток которой гликозилирован по второму или третьему гидроксилу ди-, три- или тетрасахаридом различного состава и строения. Кроме того, описана структура нового кислого гликополимера – галактоманнана с пируват-кетальными группами на остатках маннозы (в некоторых случаях несущего ещё и O-ацетильные группы).

Все выявленные структуры гликополимеров являются уникальными для *Clavibacter* и найдены впервые у прокариот.

Состав сахаров клеточной стенки, описанный ранее, был уточнен и дополнен новыми данными, которые войдут в характеристику представителей рода и исследованных видов.

Сравнительный анализ гликополимеров клеточных стенок представителей *Clavibacter*, изученных в настоящей работе, показал, что состав и структуры гликополимеров и их структурные компоненты (определяемые в кислотных гидролизатах клеточных стенок) являются специфичными и могут служить хемотаксономическими маркерами рода и видов *Clavibacter*.

Применение методов ЯМР-спектроскопии для изучения структур гликополимеров у представителей одного рода открывает новые возможности для использования полученных данных в качестве своеобразных фингерпринтов видов для идентификации новых изолятов, предварительно отнесенных к роду *Clavibacter*-(Рисунок 50).

Помимо таксономического аспекта, изучение галактофурананов как небелковых адгезинов, а также путей их биосинтеза может представлять интерес для разработки средств борьбы с фитопатогенными видами *Clavibacter*. Кроме того, описанные новые химические структуры полимеров расширяют представления о многообразии органического мира и биосинтетическом потенциале микроорганизмов, и представляют интерес для будущих исследований в области молекулярной и клеточной биологии, экологии, эволюции микроорганизмов, в частности фитопатогенных и эндофитных представителей рода *Clavibacter*, а полученные результаты будут, несомненно, востребованы при аннотации полных геномов актинобактерий этого рода.

ВЫВОДЫ

1. Охарактеризован состав сахаров, а также структуры гликополимеров клеточных стенок *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T, *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T и *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T, а также четырех новых изолятов – претендентов на новый вид: *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374 и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555.
2. У всех исследованных штаммов выявлены преобладающие моносахариды клеточных стенок – галактоза, манноза и следовые количества глюкозы; у штаммов *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T – глюкозамин; у штаммов *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T и *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T – фукоза и рамноза; у штаммов *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374 – рибоза.
3. Показано, что в клеточных стенках 9 изученных штаммов содержится по два бесфосфатных гликополимера с новыми, не описанными ранее, структурами. Первый – идентичный для всех штаммов пирувилированный (частично ацетилированный у некоторых штаммов) галактоманнан, второй – (1→6)-связанный галактофуранан с ди-, три- или тетрасахаридным заместителем различной структуры.
4. Присутствие пирувилированного галактоманнана с соотношением моносахаридов Gal : Man = 1 : 2, а также (1→6)-связанного β-D-галактофуранана с различными боковыми заместителями может рассматриваться как хемотаксономический признак для бактерий рода *Clavibacter*.
5. Признаком, дифференцирующим виды *Clavibacter*, могут являться особенности строения различных боковых ди-, три- и тетрасахаридных заместителей в структуре галактофуранана.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Gal p	галактоза в пиранозной (p) форме
Gal f	галактоза в фуранозной (f) форме
GalNAc	N-ацетилгалактозамин
GlcNAc	N-ацетилглюкозамин
Glc p	глюкоза в пиранозной (p) форме
Man p	манноза пиранозной (p) форме
Xyl	ксилоза
Fuc	фукоза [6-дезоксид-D-галактоза]
Rha	рамноза [6-дезоксид-L-манноза]
Pyr	пировиноградная кислота
Gro	глицерин
GroP	монофосфат глицерина
GroP ₂	дифосфат глицерина
P _i	фосфор неорганический

Методы ЯМР-спектроскопии

- COSY (**C**orrelated **S**pectroscopy) – корреляционная спектроскопия,
- TOCSY (**T**otal **C**orrelation **S**pectroscopy) – тотальная корреляционная спектроскопия
- ROESY (**R**otating **F**rame **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscopy) – спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат
- HSQC (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence) – гетероядерная моноквантовая когеренция
- HMBC (**H**eteronuclear **M**ultiple-**B**ond **C**orrelation) – гетероядерная корреляция через несколько связей
- HMQC (**H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence) – гетероядерная моноквантовая когеренция
- RCT (**R**elay **C**oherence **T**ransfer) – релейный перенос когеренции
- HETCOR (**H**eteronuclear **C**orrelation **S**pectroscopy) – гетероядерная корреляционная спектроскопия
- ppm =м.д. =миллионные доли

Остальные сокращения, используемые в работе, являются общепринятыми.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автух А.Н., Арискина Е.В., Барышникова Л.М., Тульская Е.М., Потехина Н.В., Шашков А.С., Сузина Н.Е., Присяжная Н.В., Стародумова И.П., Василенко О.В., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И. «Семь новых видов актиномицетов рода *Kribbella* с уникальными полимерами клеточной стенки и дополненное и исправленное описание рода *Kribbella*» // Микробиология. – 2023. – Т. 92. – №5. – С. 453-466. doi.org/10.31857/S0026365623600220.
2. Бенсон А. Фосфорилированные сахара. // В книге: Биохимические методы анализа растений. – 1960. – С. 146-182.
3. Евтушенко Л.И., Янушкене Н.А., Стрешинская Г.М., Наумова И.Б., Агре Н.С. Распространение тейхоевых кислот в представителях порядка *Actinomycetales*. // ДАН СССР. – 1984. – Т. 278. – С. 237-240.
4. Наумова И.Б. Тейхоевые кислоты микроорганизмов. // Усп. Биол. Химии. – 1964. – Т. 6. – С. 199-214.
5. Наумова И.Б. Особенности структуры, биосинтез и биологическая функция тейхоевых кислот микроорганизмов // Усп. Современ. Биол. – 1973. – Т. 75. – С. 357-378.
6. Наумова И.Б. Тейхоевые кислоты грамположительных бактерий // Усп. Биол. Химии. – 1979. – Т. 20. – С. 128-151.
7. Наумова И.Б., Шашков А.С. Анионные полимеры клеточных стенок грамположительных бактерий // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 947-982.
8. Потехина Н.В. Тейхоевые кислоты актиномицетов // Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. – 2005. – С.285.
9. Потехина Н.В. Тейхоевые кислоты актиномицетов и других грамположительных бактерий // Обзор в «Успехи Биохимии». – 2006. – Т. 46. – С. 225-278
10. Тоукач Ф.В. Информационные технологии в структурной гликохимии и гликобиологии // Автореферат. – 2019. – С. 51.
11. Тульская Е.М. Тейхоевые кислоты и гликополимеры актиномицетов: разнообразие структур, таксономические и экологические аспекты // Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук. – 2009. – С. 365.
12. Тульская Е.М., Шашков А.С., Стрешинская Г.М., Сенченкова С.Н., Потехина Н.В., Козлова Ю.И., Евтушенко Л.И. Тейхуроновые и тейхулозоновые кислоты актиномицетов // Биохимия. – 2011. – Т. 76. – №7. – С. 904-913. doi.org/10.1134/S0006297911070030

13. Шашков А.С. и Чижев О.С. ^{13}C -ЯМР спектроскопия в химии углеводов и родственных соединений. // Биоорган. химия. – 1976. – Т. 2. – С. 437-497.
14. Шашков А.С., Тульская Е.М., Дмитренко А.С., Стрешинская Г.М., Потехина Н.В., Сенченкова С.Н., Пискункова Н.Ф., Дорофеева Л.В., Евтушенко Л.И. Рамносодержащие гликополимеры клеточных стенок *Rathayibacter toxicus* ВКМ Ас-1600 и «*Rathayibacter tanacetii*» ВКМ Ас-2596 // Биохимия. – 2018. – V. 83. – № 6. – С. 915-925. doi.org/10.1134/S0006297918070106
15. Altona C., Haasnoot C.A.G. Prediction of anti and gauche vicinal proton-proton coupling constants in carbohydrates: a simple additivity rule for pyranose rings // Org. Magn. Reson. – 1980. – V. 13. – P. 417–429. doi.org/10.1002/mrc.1270130606
16. Anderson A.J., Green R.S., Sturman A.J., and Archibald A.R. Cell Wall Assembly in *Bacillus subtilis*: Location of Wall Material Incorporated During Pulsed Release of Phosphate Limitation, Its Accessibility to Bacteriophages and Concanavalin A, and Its Susceptibility to Turnover // J. Bacteriol. – 1978. – V. 136. – P. 886–899. doi.org/10.1128/jb.136.3.886-899.1978
17. Angyal S.J. Hudson's rules of isorotation as applied to furanosides, and the conformations of methyl aldofuranosides // Carbohydr. Res. – 1979. V. 77. – P. 37–50. doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83791-X
18. Archibald A. R. The structure, biosynthesis and function of teichoic acid // Adv. Microbiol. Physiol. – 1974. – V. 11. – P. 53-95. doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60269-6
19. Archibald A.R. Cell Wall Assembly in *Bacillus subtilis*: Development of Bacteriophage-Binding Properties as a Result of the Pulsed Incorporation of Teichoic Acid // J. Bacteriol. – 1976. – V.127. – P. 956-960. doi.org/10.1128/jb.127.2.956-960.1976
20. Baddiley J. and Davison A. L. The occurrence and location of teichoic acids in *Lactobacilli* // J. Gen. Microbiol. – 1961. – V. 24. P. 295–299. doi.org/10.1099/00221287-24-2-295
21. Baddiley J. Teichoic acids in cell walls and membranes of bacteria // Essays Biochem. – 1972. – V. 8. – P. 35–77.
22. Bayer M.E. and Sloyer J.L.Jr. The electrophoretic mobility of gram-negative and gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis // J. Gen Microbiol. – 1990. – V. 136. – P. 867-874. doi.org/10.1099/00221287-136-5-867
23. Berrmpohl A., Dreier J., Bahro R., Eichenlaub R. Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants // Microbiol. Res. – 1996. – V. 151– P. 391–399. doi.org/10.1016/S0944-5013(96)80009-7
24. Brown S., Santa Maria J. P., Walker S. Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria // Annual Review of Microbiology. – 2013. – V. 67 –№ 1. –P.313-336. doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155620

25. Chalupowicz L., Barash I., Reuven M., Dror O., Sharabani G., Gartemann K.H., Eichenlaub R., Sessa G., and Manulis-Sasson S. Differential contribution of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* virulence factors to systemic and local infection in tomato // Mol. Plant Pathol. – 2017. – V. 18. – P. 336 - 346. doi.org/10.1111/mpp.12400
26. Chalupowicz L., Zellermann E.-M., Fluegel M., Dror O., Eichenlaub R., Gartemann K.-H., Savidor A., Sessa G., Iraki N., Barash I., and Manulis-Sasson S. Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection // Phytopathology. – 2012. – V. 102. – P. 23 - 31. doi.org/10.1094/PHYTO-05-11-0135
27. Chapot-Chartier M.P., Kulakauskas S. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria // Microb cell fact. – 2014. – V. 13. – P. 1-23. doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S9
28. Choi J., Baek K. H. and Moon E. Antimicrobial effects of a hexapeptide KCM21 against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* // The Plant Pathol. J. – 2014. – V. 30. – №3. – P. 245-253. doi.org/10.5423/PPJ.OA.02.2014.0011
29. Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D.R., da Costa M.S., Rooney A.P., Yi H., Xu X.W., De Meyer S., Trujillo M.E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. –2018. – V. 68. – P. 461–466. doi.org/10.1099/ijsem.0.002516
30. Cummins C.S. La composition chimique des parois cellulaires d' *actinomycetes* et son application taxonomique // Ann. Inst. Pasteur. –1962. –V. 1 –№ 3. – P. 385–391.
31. Davis M.J., Graves Gillaspie A. Jr, Vidaver A.M., Harris R.W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., Pathogens That Cause Ratoon Stunting Disease of Sugarcane and Bermudagrass Stunting Disease // Papers in Plant Pathology. – 1984. – P. 254. doi.org/10.1099/00207713-34-2-107
32. Davis M.J., Vidaver A.K. Coryneform plant pathogens // In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3d edn. Schaad N.W., Jones J.B. and Chun W. (eds), St Paul. – MN: APS Press. – 2001. – P. 218–234.
33. Davison A.L. and Baddiley J. The distribution of teichoic acids in *Staphylococci* // Gen. Microbiol. – 1963. – V. 32. – P. 271-276. doi.org/10.1099/00221287-32-2-271
34. de León L., Siverio F., López M.M. and Rodríguez A. Comparative efficiency of chemical compounds for in vitro and in vivo activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker // Crop Prot. – 2008. – V. 27. – №9. – P. 1277–1283.
35. de León L., Siverio F., López M.M. and Rodríguez A. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal // Plant Dis. – 2011. – V. 95. – № 11. – P. 1328-1338. doi.org/10.1016/j.cropro.2008.04.004

36. Divsalar M., Shakeri M. and Khandan A. Study on thermotherapy treatment effects on seed germination and vigor of tomato cultivars // *Int. J. Plant & Soil Sci.* – 2014. – V. 3. –№ 6. – P. 799-809. doi.org/10.9734/IJPSS/2014/8466
37. Dixon G. R., and Pegg G. F. Changes in amino-acid content of tomato xylem sap following infection with strains of *Verticillium albo-atrum* // *Ann. Bot.* –1972. – V. 36. –P. 147 – 154. doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a084567
38. Dmitrenok A.S., Streshinskaya G.M., Tul'skaya E.M., Potekhina N.V., Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Bilan M.I., Bueva O.V., Evtushenko L.I. Pyruvylated cell wall glycopolymers of *Promicromonospora citrea* VKM Ac-665^T and *Promicromonospora* sp. VKM Ac-1028 // *Carbohydr.Res.* – 2017. – V. 449. – P. 134-142. doi.org/10.1016/j.carres.2017.07.008
39. Dreier J., Bermpohl A., Eichenlaub R. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* // *Phytopathology.* – 1995. – V. 85. –P. 462-468. doi.org/10.1094/PHYTO-85-462
40. Dreier J., Meletzus D., and Eichenlaub R. Characterization of the plasmid encoded virulence region *pat-1* of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* // *Mol Plant Microbe Interact.* – 1997. – V. 10. – P. 195-206. doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.2.195
41. Eichenlaub R., Gartemann K. H. & Burger, A. *Clavibacter michiganensis*, a group of Gram-positive phytopathogenic bacteria // *In Plant-Associated Bacteria.* – 2006. – P. 385-422.
42. Eichenlaub R. and Gartemann K. H. The *Clavibacter michiganensis* Subspecies: Molecular Investigation of Gram-Positive Bacterial Plant Pathogens // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2011. – V. 49. – P. 445-464. doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095258
43. Evtushenko, L.I. and Ariskina, E.V. *Nocardioideae*, in: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, Whitman, W.B., Ed., 2015, pp. 1–18. doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00042
44. Evtushenko L.I. and Takeuchi M. The Family *Microbacteriaceae*. // *In: The Prokaryotes*. 3d edn. Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. (eds) Springer Science. –2006. – V. 3. – P. 1020-1098. doi.org/10.1007/0-387-30743-5_43
45. Fiedler F. and Schäffler M.J. Teichoic acids in cell wall of strains of “nicotianae” group of *Arthrobacter* a chemotaxonomic marker // *System. Appl. Microbiol.* – 1987. – V. 9. –P. 16-21. doi.org/10.1016/S0723-2020(87)80050-4
46. Fischer W. Physiology of lipoteichoic acids in bacteria // *Adv. Microb. Physiol.* – 1988. – V. 29. – P. 233-302. doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60349-5
47. Fischer W., Behr T., Hartmann R., Peter-Katalinic J., Egge H. Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – V. 215. – P. 851-857 doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18102.x

48. Garegg P.J., Jansson P.E., Lindberg B., Lindh F., Lonngren J., Kvarnstrom I. and Nimmich W. Configuration of the acetal carbon atom of pyruvic acid acetals in some bacterial polysaccharides. // Carbohydr. Res. – 1980. – V. 78. – P. 127-132. doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83666-6
49. Gartemann K.-H., Abt B., Bekel T., Burger A., Engemann J., Flügel M., Gaigalat L., Goesmann A., Gräfen I., Kalinowski J., Kaup O., Kirchner O., Krause L., Linke B., McHardy A., Meyer F., Pohle S., Rückert C., Schneiker S., Zellermann E. M., Pühler A., Eichenlaub R., Kaiser O., and Bartels D. The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity // J. Bacteriol. – 2008. – V. 190, P. 2138 – 2149. doi.org/10.1128/JB.01595-07
50. Gonzalez A.J., Trapiello E. *Clavibacter michiganensis* subsp. *phaseoli* subsp. nov., pathogenic in bean // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. –2014. – V. 64. – №5. – P. 1752 – 1755. doi.org/10.1099/ijs.0.058099-0
51. Goodfellow M., Jones A.L., Order V. *Corynebacteriales* ord. nov. // In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2d edition. Whitmann W., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M., Ludwig W., Suzuki K. (eds) Springer New York Dordrecht Heidelberg London. –2012. –V. 5. – P. 1-14.
52. Hausmann E., Lüderitz O., Knox K., Weinfeld N. Structural requirements for bone resorption by endotoxin and lipoteichoic acid // Journal of Dental Research. – 1975. – V. 54. –P. 94-99. doi.org/10.1177/00220345750540023401
53. Hwang I. S., Oh E.J., Lee H. B., and Oh C. S. Functional characterization of two cellulase genes in the Gram-positive pathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* for wilting in tomato // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2018. – V. 32. – P. 491-501. doi.org/10.1094/MPMI-08-18-0227-R
54. Jacques M. A., Durand K., Orgeur G., Balidas S., Fricot C., Bonneau S., Quillévéré A., Audusseau C., Olivier V., Grimault V., Mathis R. Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* // Applied and environmental microbiology. – 2012. – V. 78. – № 23. – P. 8388–8402. doi.org/10.1128/AEM.02158-12
55. Jahr H., Dreier J., Meletzus D., Bahro R., and Eichenlaub R. The endo- β -1,4-glucanase *CelA* of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato // Mol. Plant-Microbe Interact. –2000. – V. 13. – P. 703 – 714. doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.7.703
56. Janson P. E., Kenne L., and Widmalm G., Computer assisted structural analysis of polysaccharides with an extended version of CASPER using ^1H - and ^{13}C -n.m.r. data // Carbohydr. Res. – 1989. – V. 188. – P. 169–191. doi.org/10.1016/0008-6215(89)84069-8

57. Jones J., Jackson L., Balogh B., Obradovic A., Iriarte F. and Momol M. Bacteriophages for plant disease control // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2007. – V. 45. – P. 245-262. doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094411
58. Kämpfer P. The characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes // *Int J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2010. – V. 60. – P. 7. doi.org/10.1099/ijs.0.020768-0
59. Kasselaki, A. M., Goumas, D., Tamm, L., Fuchs, J., Cooper, J. and Leifert, C. Effect of alternative strategies for the disinfection of tomato seed infected with bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) // *NJAS – Wageningen J. Life Sci.* –2011. – V. 58. – P. 145 – 147. doi.org/10.1016/j.njas.2011.07.001
60. Kaup O.,Gräfen I., Zellermann E.M.,Eichenlaub R.,Gartemann K.H. Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 // *Mol. Plant-Microbe Interact.* –2005. – V.18. – P.1090–1098. doi.org/10.1094/MPMI-18-1090
61. Kim D., Shashkov A.S., Dmitrenok A.S., Potekhina N.V., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I, and Tul'skaya E.M., Novel galactofuranan and pyruvylated galactomannan in the cell wall of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* VKM Ac-1403^T // *Carbohydr. Res.* – 2021. – V. 500. – P. 108247. doi.org/10.1016/j.carres.2021.108247
62. Kleitman F., Barash I., Burger A., Iraki N., Falah Y. Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel // *Eur. J. Plant Pathol.* –2008. – V.121 – P. 463–475. doi.org/10.1007/s10658-007-9264-z
63. Knirel Y.A., Shevelev D.S., Perepelov A.V. Highter aldulosonic acids: components of bacterial glycans // *Mendelev comm.* – 2011. – V.21. – P.173-182. doi.org/10.1016/j.mencom.2011.07.001
64. Knox K. W. and Wicken A. J. Immunological properties of teichoic acids // *Bacteriological reviews.* – 1973. – V. 37. - № 2. – P. 215–257. doi.org/10.1128/br.37.2.215-257.1973
65. Kohler T., Weidenmaier C., and Peschel A. (2009). Wall teichoic acid protects *Staphylococcus aureus* against antimicrobial fatty acids from human skin // *J. Bacteriol.* – 2009. – P. 4482–4484. doi.org/10.1128/JB.00221-09
66. Lechevalier M. P., Lechevalier H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic *Actinomycetes* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 1970. – V. 20. – P. 435-443. doi.org/10.1099/00207713-20-4-435
67. Li X., Tambong J., Yuan K., Chen W., Xu H., Levesque A., Solke H. Re-cassification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* –2018. – V. 68 – P.234 -240. doi.org/10.1099/ijsem.0.002492

68. Matas A. J., Yeats T. H., Buda G. J., Zheng Y., Chatterjee S., Tohge T. Tissue and cell-type specific transcriptome profiling of expanding tomato fruit provides insights into metabolic and regulatory specialization and cuticle formation // *Plant Cell*. – 2011. – V. 23. – P. 3893-3910. doi.org/10.1105/tpc.111.091173
69. Medina-Mora C. M., Hausbeck M. K., and Fulbright D. W. Bird's eye lesions of tomato fruit produced by aerosol and direct application of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* // *Plant Dis*. –2001. – V. 85, P. 88-91 doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.1.88
70. Meletzus D., Bempohl A., Dreier J., Eichenlaub R. Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. // *J. Bacteriol*. –1993. – V. 175. – P.2131–2136. doi.org/10.1128/jb.175.7.2131-2136.1993
71. Mistou M.-Y., Sutcliffe I.C., and Van Sorge N.M. Bacterial glycobiology: rhamnose-containing cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria // *FEMS Microbiol. Rev*. –2016. – V. 40. P.464–479. doi.org/10.1093/femsre/fuw006
72. Murray T.D., Schroeder B.K., Schneider W.L., Luster D.G., Sechler A., Rogers E.E., and Subbotin S.A. *Rathayibacter toxicus*, other *Rathayibacter* species inducing bacterial head blight of grasses, and the potential for live-stock poisonings // *Phytopathology*. –2017. – V.107. – P. 804–815. doi.org/10.1094/PHYTO-02-17-0047-RVW
73. Nandi M., Macdonald J., Liu P., Weselowski B., and Yuan Z. C. *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management // *Mol. Plant Pathol*. – 2018. – V. 19 – P. 2036 – 2050. doi.org/10.1111/mpp.12678
74. Naumova I.B., Kuznetsov V.D., Kudrina K.S. and Bezzubenkova A.P. The occurrence of teichoic acids in *Streptomyces* // *Arch. Microbiol*. –1980. – V. 126. – P. 71-75. doi.org/10.1007/BF00421893
75. Naumova I.B., Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Streshinskaya G.M., Kozlova Y.I., Potekhina N.V., Evtushenko L.I. and Stackebrandt E. Cell wall teichoic acids: structural diversity, species-specificity in the genus *Nocardopsis*, and chemotaxonomic perspective // *FEMS Microbiol. Rev*. – 2001. – V. 25. –P. 269-284. doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00578.x
76. Nazina T., Grigor'yan A., Xue Y., Sokolova D., Novikova E., Tourova T. Phylogenetic diversity of aerobic saprotrophic bacteria isolated from the Dazing oil field // *Microbiology*. – 2002. – V.71. – P. 91-97.
77. Neuhaus F.C. and Baddiley J. A continuum of anionic charge: structures and functions of d-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. –2003. –V. 67. P. 686-723. doi.org/10.1128/MMBR.67.4.686-723.2003
78. Nouioui I., Carro L., Garcia-Lopez M., Meier-Kolthoff J.P., Woyke T., Kyrpides N.C., Pukall R., Klenk H.P., Goodfellow M., Goker M. Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria* // *Front. Microbiol*. –2018. – V. 9. doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007

79. Oh E.J., Bae C., Lee H.B., Hwang I.S., Lee H.I. et al. *Clavibacter michiganensis* subsp. *capsici* subsp. nov., causing bacterial canker disease in pepper // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* –2016. – V. 66 – P. 4065-4070. doi.org/10.1099/ijsem.0.001311
80. Peltier P., Euzen R., Daniellou R., Nugier-Chauvin C. and Ferrières V. Recent knowledge and innovations related to hexofuranosides: structure, synthesis and applications // *Carbohydrate research.* – 2008. – V. 343 № 12. – P. 1897-1923. doi.org/10.1016/j.carres.2008.02.010
81. Peritore F.C. Colonization studies of *Clavibacter michiganensis* in fruit and xylem of diverse *Solanum* species // A Dissertation Presented to the Faculty of the Graduate School of Cornell University In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy. – 2020.
82. Peritore-Galve F. C., Miller C., and Smart C. D. Characterizing colonization patterns of *Clavibacter michiganensis* during infection of tolerant wild *Solanum* species // *Phytopathology.* – 2020. – V. 110. – P. 574 – 581. doi.org/10.1094/PHTO-09-19-0329-R
83. Peritore-Galve F.C., Tancos M.A., Smart C.D. Bacterial Canker of Tomato: Revisiting a Global and Economically Damaging Seedborne Pathogen // *Plant Dis.* – 2021. – V. 105. - № 6. – P. 1581-1595. doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1732-FE
84. Philip A., Gorin J., Spencer J. F. T., Can. J. Extracellular acidic polysaccharides from *C. insidiosum* and other *Corynebacterium* spp. // *Chem.* – 1961. – V. 39. – P. 2274-2281. doi.org/10.1139/v61-301
85. Philip A., Gorin J., Spencer J.F.T., Bengt L., Frank L. Structure of the extracellular polysaccharide from *Corynebacterium insidiosum* // *Carbohydrate Research.* – 1980. – P. 313-315. doi.org/10.1016/s0008-6215(00)83846-x
86. Potekhina N.V., Streshinskaya G.M., Tul'skaya E.M., and Shashkov A.S. Cell wall teichoic acids in the taxonomy and characterization of Gram-positive bacteria, in *Taxonomy of Prokaryotes // Methods in Microbiology.* – 2011. – V. 38. – № 6. –P. 132–164. doi.org/10.1016/B978-0-12-387730-7.00006-1
87. Potekhina N.V., Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Ariskina E.V., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. Cell Wall Galactofuranan of the *Paenarthrobacter* Actinobacteria // *Microbiology* – 2021. – V. 90. – № 1. – P. 122-128. doi.org/106-111 10.1134/S0026261720060156
88. Potekhina N. V., Tul'skaya E. M., Ospennikov Y. V., Evtushenko L. I. Cell Wall Glycopolymers as Chemotaxonomic Characteristics of the Genus and Species *Rathayibacter* // *Microbiology.* – 2023. – V.92. – P. S2-S6. doi.org//10.1134/S0026261723603822
89. Ramasamy D., A.K.Mishra, Lagier J.-C., Padhmanabhan R., Rossi M., Sentausa E., D. Raoult and P.-E. Fournier A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* – 2014, –V. 64. – P. 384–391.

doi.org/10.1099/ijs.0.057091-0

90. Riley I.T., Allen J.G., and Barbetti M.J. *Rathayibacter toxicus*. // in: Manual of security sensitive microbes and toxins. Liu D.(eds), United States: CRC Press. – 2014. – P. 775–785. doi.org/10.1201/b16752-74
91. Robson R.L. and Baddiley J. Role of teichuronic acid in *Bacillus licheniformis*: defective autolysis due to deficiency of teichuronic acid in novobiocin-resistant mutant // J. Bacteriol. – 1977. – V. 129. – P. 1051-1058. doi.org/10.1128/jb.129.2.1051-1058.1977
92. Schade J., Weidenmaier C. Cell wall glycopolymers of Firmicutes and their role as nonprotein adhesins // FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett. – 2016. – V. 590. –P. 3758–3771. doi.org/10.1002/1873-3468.12288
93. Schäffer C. and Messner P. The structure of secondary wall polymers: how Gram-positive bacteria stick their cell walls together // Microbiology. –2005. – V. 151. P. 643-651. doi.org/10.1099/mic.0.27749-0
94. Scheffers D. J. , Pinho M. G. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies // Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. –2005. – V. 69. - № 4. – P. 585-607. doi.org/10.1128/MMBR.69.4.585-607.2005
95. Schleifer K.H. and Stackebrandt E. Molecular systematics of prokaryotes // Ann. Rev. Microbiol. – 1983. – V. 37. – P. 143-187. doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.001043
96. Schumann P., Kämpfer P., Busse H.J., Evtushenko L.I. Proposed minimal standards for describing new genera and species of the suborder *Micrococccineae* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2009. –V. 59. – P. 1823-1829. doi.org/10.1099/ijs.0.012971-0
97. Schumann P. Peptidoglycan structure // Methods Microbiol. – 2011. – V. 38. - P. 101-129. doi.org/10.1016/B978-0-12-387730-7.00005-X
98. Seltmann G. and Holst O. The bacterial cell wall // Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. – 2014. – P. 280.
99. Severn W.B. and Richards J. The acidic specific capsular polysaccharide of *Rhodococcus equi* serotype 3. structural elucidation and stereochemical analysis of the lactate ether and pyruvate acetal substituents // Can. J. Chem. – 1992. –V. 70. – P. 2664-2676. doi.org/10.1139/v92-336
100. Sharabani G., Shtienberg D., Borenstein M., Shulhani R., Lofthouse M., Sofer M., Chalupowicz L., Barel V. and Manulis-Sasson S. Effects of plant age on disease development and virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato // Plant Pathol. – 2013. – V. 62. – №5. – P. 1114-1122. doi.org/10.1111/ppa.12013
101. Shashkov A.S., Potekhina N.V., Naumova I.B., Evtushenko L.I., and Widmalm G. Cell wall teichoic acids of *Actinomadura viridis* VKM Ac-1315^T // Eur. J. Biochem. –1999. – V. 262. –№ 3. – P. 688-695. doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00412.x

102. Shashkov A.S., Streshinskaya G.M., Kosmachevskaya L.N., Evtushenko L.I. and Naumova I.B. A polymer of 8-O-glucosylated 2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonic acid (Kdn) in the cell wall of *Streptomyces* sp. VKM Ac- 2090 // Mendeleev. Commun. – 2000. – № 5. – P. 167-168. doi.org/10.1070/MC2000v010n05ABEH001338
103. Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Evtushenko L.I., Denisenko V.A., Ivanyuk V.G., Stomakhin A.A., Naumova I.B. and Stackebrandt E. Cell wall anionic polymers of *Streptomyces* sp. MB-8, the causative agent of potato scab // Carbohydr. Res. – 2002. – V. 337, – P. 2255-2261. doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00188-X
104. Shashkov A.S., Potekhina N.V., Kachala V.V., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. A novel galactofuranan from the cell wall of *Arthrobacter* sp. VKM Ac-2576 // Carbohydr. Res. – 2012. – V. 352. P. 215–218. doi.org/10.1016/j.carres.2012.02.011
105. Shashkov A. S., Potekhina N. V., Senchenkova S. N. and Evtushenko L. I. Teichoic, teichulosonic and teichuronic acids in the cell wall of *Brevibacterium aurantiacum* VKM Ac-2111^T // Carbohydrate research. – 2016. – V. 421, P. 17–24. doi.org/10.1016/j.carres.2015.12.007
106. Shashkov A. S., Tul'skaya E. M., Dorofeeva L. V., Evtushenko L. I. , Potekhina, N. V. Two Glycosyl 1-phosphate polymers and teichulosonic acid from *Glutamicibacter protophormiae* VKM Ac-2104^T Cell Wall // Biochemistry. – 2020. – V. 85. № 5. P. 629–635. doi.org/10.1134/S0006297920050120
107. Shashkov A.S., Tul'skaya E.M., Streshinskaya G.M., Dmitrenok A.S., Potekhina N.V., Senchenkova S.N., Piskunkova N.F., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. Rhamnomannans and teichuronic acid from cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603^T // Biochemistry. – 2020. – V. 85. – P. 369–377. doi.org/10.1134/S0006297920030128
108. Shashkov A.S., Potekhina N.V., Kim D., Dmitrenok A.S., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I., Tul'skaya E.M. Cell wall galactofuranan and pyruvate-containing galactomannan in the cell walls of *Clavibacter* strains // Carbohydr. Res. – 2021. – V. 510. – P. 108-435. doi.org/10.1016/j.carres.2021.108435
109. Silhavy T.J., Kahne D., Walker S. The bacterial cell envelope // Cold spring harb perspect biol. – 2010. –V. 2, – №5. – P. 1-17. doi.org/10.1101/cshperspect.a000414
110. Sonnenfeld E.M., Beveridge T.J., Koch A.L. and Doyle R.J. Asymmetric distribution of charge on the cell wall of *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. –1985. –V. 163. – P. 1167-1171. doi.org/10.1128/jb.163.3.1167-1171.1985
111. Stackebrandt E. Defining Taxonomic Ranks. // In: Prokaryotes. –2006. –V. 1. – P. 29-57.
112. Starodumova I., Prisyazhnaya N., Tarlachkov S., Dorofeeva L., Vasilenko O., Evtushenko L., Taxonomy of the genus *Clavibacter*, in: XXXVII Annual Meeting of the European Culture Collections' Organisation Conference Proceedings, MaksPress – 2018. – P. 107.

113. Stefanović C., Hager F.F., Schäffer C. LytR-CpsA-Psr Glycopolymer Transferases: Essential Bricks in Gram-Positive Bacterial Cell Wall Assembly // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – P. 908. doi.org/10.3390/ijms22020908
114. Suddler G.D. and Kerr E.M. Genus V. *Clavibacter* Davis, Gillaspie, Vidaver and Harris 1984. // In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2d edition. Whitmann W., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M., Ludwig W., Suzuki K. (eds) Springer New York Dordrecht Heidelberg London. –2012. – V. 5. – P. 877 – 883.
115. Sutherland I.W. Bacterial surface polysaccharides: structure and function // *Int. Rev. Cytol.* –1988. – V. 113. – P.187-231. doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60849-9
116. Svircev A., Roach D., and Castle A. 2018. Framing the future with bacteriophages in agriculture // *Viruses*. – 2018. – V. 10. – P. 218. doi.org/10.3390/v10050218
117. Syr N. and Perlin A.S. The conformations of furanosides. A ¹³C nuclear magnetic resonance study // *Can. J. Chem.* – 1979. – V. 57. – P. 2504–2511. doi.org/10.1139/v79-399
118. Tancos M. A., Chalupowicz L., Barash I., Manulis-Sasson S., and Smart C. D. Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2013. –V. 79, P. 6948-6957. doi.org/10.1128/AEM.02495-13
119. Tancos M. A., Lowe-Power T. M., Peritore-Galve F. C., Tran T. M., Allen C., and Smart C. D. Plant-like bacterial expansins play contrasting roles in two tomato vascular pathogens // *Mol. Plant Pathol.* – 2018. – V. 19. – P. 1210-1221. doi.org/10.1111/mpp.12611
120. Tefsen B., Ram A.F.J., van Die I., Routier F.H., Galactofuranose in eukaryotes: aspects of biosynthesis and functional impact // *Glycobiology*. – 2012. – V. 22. – P. 456–469. doi.org/10.1093/glycob/cwr144
121. Thapa S. P., Pattathil S., Hahn M. G., Jacques M. A., Gilbertson R. L. and Coaker G. Genomic Analysis of *Clavibacter michiganensis* reveals insight into virulence strategies and genetic diversity of a gram-positive bacterial pathogen // *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*. – 2017. – V. 30. - №. – 10. – P. 786-802. doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0146-R
122. Tul'skaya E. M., Shashkov A. S., Streshinskaya G. M., Potekhina N. V., Evtushenko L. I. New structures and composition of cell wall teichoic acids from *Nocardiopsis synnemataformans*, *Nocardiopsis halotolerans*, *Nocardiopsis composta* and *Nocardiopsis metallicus*: a chemotaxonomic value // *Antonie van Leeuwenhoek*. –2014. –V. 106. – № 6. – P. 1105-1117. doi.org/10.1007/s10482-014-0280-7
123. Vandamme P. and Sutcliffe I. Out with the old and in with the new: time to rethink twentieth century chemotaxonomic practices in bacterial taxonomy // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* –2021. –V. 71. – № 11. – P. 005127. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005127

124. Varbanets L.D., Shashkov A.S. and Kocharova N.A. Phosphorus-containing glycopolymers of *Clavibacter michiganensis* cell walls // Carbohydr. Res. –1990. – V. 204. – P. 157-160. doi.org/10.1016/0008-6215(90)84031-O
125. Varki A. Biological roles of glycans // Glycobiology. –2017. –V. 27. –№ 1. – P. 3-49. doi.org/10.1093/glycob/cww086
126. Venturas M. D., Sperry J. S., and Hacke U. G. Plant xylem hydraulics: what we understand, current research, and future challenges // J. Int. Plant Biol. – 2017. – V. 59. – P.356-389. doi.org/10.1111/jipb.12534
127. Vidaver A.K. and Mandel M. *Corynebacterium nebraskense*, a new, orange-pigmented phytopathogenic species // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 1974. – V. 24. - №.4. – P. 48. doi.org/10.1099/00207713-24-4-482
128. Wang Y., Narain R., and Liu Y. Study of bacterial adhesion on different glycopolymer surfaces by quartz crystal microbalance with dissipation // Langmuir. – 2014. – V. 30. – № 25. – P. 7377–7387. doi.org/10.1021/la5016115
129. Ward J. B. Teichoic and teichuronic acids: biosynthesis, assembly, and location // Microbiol. Rev. –1981. – V. 45. – P. 211–243. doi.org/10.1128/mr.45.2.211-243.1981
130. Weidenmaier C. and Peschel A. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions // Nat. Rev. Microbiol. –2008. – V. 6. – P. 276-287. doi.org/10.1038/nrmicro1861
131. Weller D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria // Annu. Rev. Phytopathol. – 1988. – V. 26. – P. 379-407. doi.org/10.1146/annurev.py.26.090188.002115
132. Whitfield C., Wear S.S., Sande C. Assembly of bacterial capsular polysaccharides and exopolysaccharides // Annu. Rev. Microbiol. – 2020. – V. 74. – P. 521–543. doi.org/10.1146/annurev-micro-011420-075607
133. Wicken A.J. and Knox K.W. Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen // Science. –1975. –V. 187. – P. 1161–1167. doi.org/10.1126/science.46620
134. Wittmann J., Eichenlaub R., Dreiseikermann B. The endolysins of bacteriophages CMP1 and CN77 are specific for the lysis of *Clavibacter michiganensis* strains // Microbiology. –2010. – V. 156, P. 2366-2373. doi.org/10.1099/mic.0.037291-0
135. Woese C.R. Bacterial evolution // Microbiol. Rev. – 1987. – V. 51. – P. 221-271. doi.org/10.1128/mr.51.2.221-271.1987
136. Xu X., Kumar A., Deblais L., Pina-Mimbela R., Nislow C., Fuchs J.R., Miller S.A. and Rajashekara G. Discovery of novel small molecule modulators of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* // Front. Microbiol. – 2015. – V. 6. – P. 1127. doi.org/10.3389/fmicb.2015.01127

137. Yamada M., Hirose A. and Matsushashi M. Association of lack of cell wall teichuronic acid with formation of cell packets of *Micrococcus lysodeicticus (luteus)* mutants // J. Bacteriol. – 1975. – V. 123. – P. 678-686. doi.org/10.1128/jb.123.2.678-686.1975
138. Yamazaki K., Suzuki M., Inukai K., Kuga H., Korenaga H. Structural study on a sulfated polysaccharide-peptidoglycan complex produced by *Arthrobacter* sp. // Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. – 1988. – V. 62. – P. 2138-2144. doi. org/10.1271/bbb.62.2138.
139. Yang X.E., Long X.X., Ni W. Z., Ye Z. Q., He Z. L., Stoffella P. J. and Calvert D. V. Assessing copper thresholds for phytotoxicity and potential dietary toxicity in selected vegetable crops // J. Environ. Sci. Health Part B. –2002. – V. 37. № 6 –P. 625-635. doi.org/10.1081/PFC-120015443
140. Yasuhara-Bell J. and Alvares A.M. Seed-associated subspecies of the genus *Clavibacter* are clearly distinguishable from *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* // Int. J. Evol. Microbiol. – 2015. – V.65. – P.811 – 826. doi.org/10.1099/ijms.0.000022
141. Zaluga J., Van Vaerenbergh J., Stragier P., Maes M. and De Vos, P. Genetic diversity of non-pathogenic *Clavibacter* strains isolated from tomato seeds // Syst. Appl. Microbiol. – 2013. – V. 36. - №6. – P. 426-435. doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.005
142. Zaychikov V. A., Potekhina N. V., Dmitrenok A. S., Ding Fan, Tul'skaya E. M., Dorofeeva L. V., Evtushenko L. I. Cell Wall Rhamnan in *Actinobacteria* of the genus *Curtobacterium* // Microbiology. – 2021. – V. 90. – № 3. – P. 343-348. doi.org/10.1134/S0026261721030139
143. Zgurskaya H.I., Evtushenko L.I., Akimov V.N., and Kalakoutskaa L.V. *Rathayibacter* gen, nov., including the species *Rathayibacter rathayi* comb. nov., *Rathayibacter tritici* comb. nov., *Rathayibacter iranicus* comb., nov., and six strains from annual grasses // Int. J. Sys. Bacteriol. – 1993. –V. 43, P.143–149. doi.org/10.1099/00207713-43-1-143