

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПРОДУКЦИЮ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ *ERWINIA AMYLOVORA*

Песоцкая К.Ю., Лагоненко А.Л., Евтушенков А.Н.
Белорусский государственный университет, Минск,
lagonenkoal@mail.ru

Бактериальный ожог – одно из наиболее вредоносных заболеваний растений семейства *Rosaceae*, вызываемое фитопатогенными бактериями *Erwinia amylovora*. Основными факторами вирулентности данного фитопатогена являются система секреции III типа (ССТТ), экзополисахариды амиловоран и леван. В растениях амиловоран способен вызвать закупорку ксилемных сосудов, нарушая таким образом работу всей водопроводящей системы растений. Также известно, что вышеупомянутые экзополисахариды принимают участие в формировании клетками *E. amylovora* зрелой биопленки [4].

Растения синтезируют широкий спектр вторичных метаболитов: терпеноиды, алкалоиды, фенольные соединения. К их числу относится и салициловая кислота (СК), относительно недавно причисленная к группе низкомолекулярных органических веществ – фитогормонов. Помимо стимуляции ростовых процессов у растений, данная фенольная кислота принимает участие в развитии реакции сверхчувствительности в ответ на внедрение патогенов в ткани растений [1], а также оказывает влияние на экспрессию факторов вирулентности некоторых фитопатогенных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa* [5], *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*) [3]. Другие фенольные соединения, в частности, *o*-кумаровая и *n*-кумаровая кислоты, способны снижать экспрессию генов системы секреции III типа у *D. dadantii* [6]. На данный момент влияние фенольных соединений растений на экспрессию генов факторов вирулентности бактерий *E. amylovora* практически не исследовано.

Нами было показано, что СК в концентрации 10 мкг/мл более чем в два раза снижает продукцию амиловорана клетками *E. amylovora* E2 (Рисунок 1А). Кроме того, СК подавляет экспрессию репортерного гена *xylE*, находящегося под контролем промотора *ams*-оперона (Рисунок 1Б). Обнаруженный эффект, вероятно, может быть обусловлен влиянием СК на экспрессию и активность набора транскрипционных факторов, что требует дальнейшего изучения. Интересно, что коричневая и ванилиновая кислоты значительно усиливая продукцию амиловорана клетками *E. amylovora*, не влияли на экспрессию репортерного гена.

Также нами было показано, что использованные в работе фенольные соединения растительного происхождения не оказывают значительного влияния на продукцию левана клетками бактерий *E. amylovora* E2.

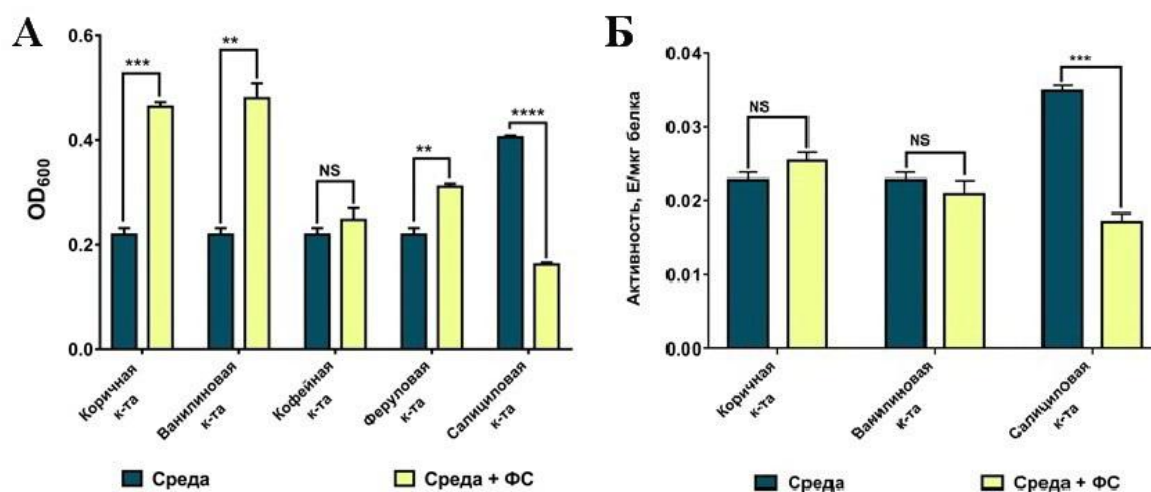


Рисунок 1 – Влияние фенольных соединений растений на продукцию амиловорана штаммом *E. amylovora* E2 (А) и активность катехол-2,3-диоксигеназы штамма *E. amylovora* D4 (Б). Уровень значимости *P* был рассчитан с использованием теста Уэлча (NS – нет достоверных различий; ***P*<0,0332; ****P*<0,0021; *****P*<0,0001). ФС – исследуемое фенольное соединение.

Бактериям присущи две различные стратегии поведения: свободное движение или планктонное состояние, при котором одиночные клетки свободно передвигаются в жидкой среде, и прикрепленное состояние, при котором клетки присоединяются друг к другу и к какой-либо поверхности, образуя мультিকлеточное сообщество – так называемую биопленку [7]. На следующем этапе работы мы оценили влияние фенольных соединений на интенсивность образования биопленок и подвижность клеток *E. amylovora*. Было выявлено, что присутствие в минимальной среде МВМА салициловой кислоты в концентрации 10 мкг/мл приводит к снижению формирования биопленок. Однако при культивировании клеток в жидкой питательной среде LB, также содержащей СК в концентрации 10 мкг/мл, достоверной разницы между контрольными и опытными значениями не наблюдалось [2].

Внешне роение (swarming motility) как один из типов подвижности в условиях *in vitro* визуализируется по характерному помутнению агаризованной среды за пределами зоны внесения культуры бактерий. В результате проведенных исследований было установлено, что при культивировании клеток в полужидкой полноценной среде LB салициловая кислота в концентрации 10 мкг/мл повышает подвижность клеток *E. amylovora* (Рисунок 2А). Напротив, при культивировании клеток в полужидкой среде МВМА салициловая кислота ингибирует подвижность бактериальных клеток, в то время как остальные

исследуемые фенольные соединения не оказывают значимого эффекта (Рисунок 2Б).

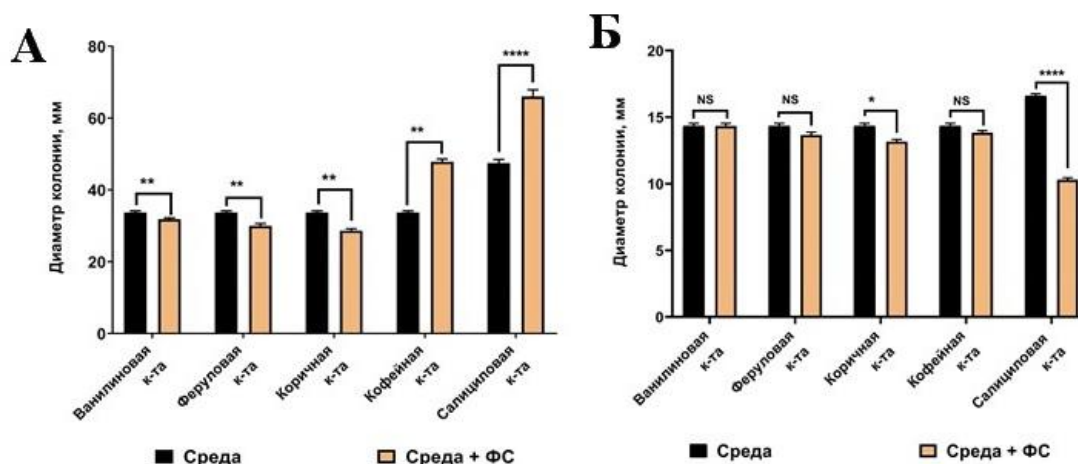


Рисунок 2 – Влияние растительных фенольных соединений на подвижность клеток штамма *E. amylovora* E2 в полужидкой полноценной среде LB (А) и полужидкой минимальной среде МВМА (Б). Уровень значимости *P* был рассчитан с использованием тестов Уэлча и Манна-Уитни (* $P < 0,1234$; ** $P < 0,0332$; **** $P < 0,0001$). ФС – исследуемое фенольное соединение.

Таким образом, нами было продемонстрировано, что салициловая кислота подавляет экспрессию *ams*-оперона бактерий *E. amylovora* E2: это приводит к значительному снижению биосинтеза амиловорана. У многих видов бактерий экзополисахариды являются важным компонентом матрикса биопленок. Вполне вероятно, что выявленное в наших экспериментах снижение формирования биопленок под действием салициловой кислоты напрямую связано со снижением продукции амиловорана.

Литература

1. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. М.: Высш. шк., 2005. 736 с.
2. Микробные биотехнологии : фундаментальные и прикладные аспекты : материалы XI Междунар. науч. конф. (Минск, 3-6 июня 2019 г.) / орг. ком. конф.: Э.И. Коломиец (председатель) [и др.]. – Минск : Беларуская навука, 2019. – 281 с.
3. Lagonenko L., Lagonenko A., Evtushenkov A. Impact of salicylic acid on biofilm formation by plant pathogenic bacteria // J. Biol. Earth Sci. 2013. Vol. 3. P. 176–181.
4. Maes M. Influence of amylovoran production on virulence of *Erwinia amylovora* isolates from *Rubus* // Eur. J. Plant Pathology. 2001. Vol. 107. P. 839–844.
5. Prithiviraj B. Down Regulation of Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* by Salicylic Acid Attenuates Its Virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans* // Infection and Immunity. 2005. Vol. 73. P. 5319–5328.

6. Sklodowska M. Phenolic profiles in apple leaves and the efficacy of selected phenols against fire blight (*Erwinia amylovora*) // Eur. J. Plant Pathology. 2018. Vol. 151. P. 213-228.

7. Verstraeten N. Living on a surface: swarming and biofilm formation // Trends in Microbiology. 2008. Vol.16. P. 496–506.