

ЭФФЕКТ МУТАЦИЙ ПО ГЕНАМ СИСТЕМЫ СЕКРЕЦИИ III ТИПА НА ВИРУЛЕНТНОСТЬ БАКТЕРИЙ *ERWINIA ATROSEPTICA*

С. Агабозорги, А.Н.Евтушенков

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь.

Введение

Бактерии *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* способны поражать растения как в период вегетации, вызывая сосудистый бактериоз “черную ножку” картофеля, так и при хранении в зимнее время, провоцируя мягкие гнили клубней картофеля.

Основными факторами вирулентности для пектолитических видов *Erwinia* являются внеклеточные деполимеризующие ферменты, в том числе пектолитические, целлюлолитические, протеолитические, а также некоторые другие, роль которых до конца не выяснена [1]. Важную роль как фактора вирулентности среди пектолитических ферментов *Erwinia* играет пектатлиаза, представленная несколькими изоферментами. С помощью деполимеризующих ферментов бактерии *E.carotovora subsp.atroseptica* разрушают (мацерируют) растительные ткани различных растений, таких как клубни картофеля, корнеплодов моркови, свеклы и ряда других культур, демонстрируя тем самым отсутствие специализации и приводя к порче значительной части урожая [2].

До недавнего времени считали, что деполимеризующие ферменты бактерий *E.carotovora subsp.atroseptica* являются основными факторами вирулентности и основное внимание уделяли их регуляции их синтеза и секреции.

Но открытие вначале у специализированных патогенов, а затем и у бактерий *Erwinia*, системы секреции III типа (ССТТ) и белков, субстратов этой системы стимулировало интерес к этой системе и изучению ее роли в вирулентности *E.carotovora subsp.atroseptica* [3].

Первым белком фитопатогенных бактерий, для которого была показана способность к секреции через ССТТ был HrpN из *Erwinia amylovora* [4]. Этот небольшой (385 а.о.), термостабильный, богатый глицином, гидрофильный белок, названный харпином_{Еа}, обладал уникальной способностью при инфильтрации в ткани листьев табака вызывать развитие реакции гиперчувствительности, приводящей к локальной гибели растительных клеток. В настоящее время описано большое количество белков харпинов у разных фитопатогенов, и проводится выяснение их роли в вирулентности бактерий [5].

Ранее в нашей лаборатории были получены мутанты по разным генам ССТТ *E.carotovora subsp.atroseptica* и показана роль этих генов в индукции реакции гиперчувствительности и работе секреторной системы [6-8]. Целью данной работы являлось изучение роли генов ССТТ в мацерации бактериями тканей клубней картофеля.

Методы исследования

В работе использовали бактерии *Erwinia carotovora subsp.atroseptica* дикого типа и мутанты, свойства которых приведены в табл.1.

Таблица 1. Штаммы бактерий , использованные в данной работе

Штаммы	Характеристика	Происхождение, ссылка
1	2	3
<i>E.carotovora subsp. atroseptica</i>		
JN42	Rif ^R Cm ^R (Tn9) r ⁻	Коллекция кафедры молекулярной биологии
JN504	hrpN::pJP5603, hrpW::Ωsp/sm r ⁻ rif ^R Cm ^R (Tn9)	Коллекция кафедры молекулярной биологии
3311	rsmA - rif ^R Km ^R (TnS)	Коллекция кафедры молекулярной биологии
HW1	JN42 hrpW::Ωsp/sm	Коллекция кафедры молекулярной биологии [8]
JN502	JN42 hrpN::pJP5603; Km ^r	Коллекция кафедры молекулярной биологии
TA85	JN42 hrpJ::pJP5603	Коллекция кафедры молекулярной биологии [6]
VKE	JN42 dspE:: pJP5603	Коллекция кафедры молекулярной биологии [7]
21A	Дикий тип Выделен из стебля картофеля	Коллекция кафедры молекулярной биологии
36A	Дикий тип Выделен из клубня картофеля	Коллекция кафедры молекулярной биологии

Культуры бактерий хранили в пробирках, содержащих 5 мл 0,5% мясopептoнного агара под слоем стерильного вазелинового масла при температуре 40С. Выращивали бактерии либо в жидкой питательной среде LB при 28 С, либо на чашках с агаризованной средой (LB-агар).

Для определения пекталиазной активности бактерии выращивали в минеральной среде 1А с 0,3% полипектата натрия и 0,5% глицерина .

Минеральную среду 1А готовили по прописи, приведенной в руководстве Дж.Миллер [9]. Среда 1А включала (в г/л): K_2PO_4 -10,5, KH_2PO_4 - 4,5, $(NH_4)_2SO_4$ - 1,0, цитрат Na - 0,5, источник углерода - 5,0. Питательная среда LB, производства фирмы Sigma (США) состояла (в г/л): триптон - 10, дрожжевой экстракт - 5, NaCl - 10. Полипектат натрия производства фирмы Sigma (США).

Пекталиазную активность определяли по образованию ненасыщенной дигалактуроновой кислоты путем спектрофотометрического измерения увеличения УФ-абсорбции реакционной смеси при длине волны 235нм в термостатируемых (30⁰С) кварцевых кюветах (длина оптического пути 1 см). К 3 мл 0,05%-ного раствора полипектата натрия в трис-HCl буфере (0,05M, pH 8,5), содержащего 0,1 мМ хлорида кальция добавляли 10-20 мкл фермента. Для расчета активности пекталиазы использовали коэффициент молярной экстинкции 4800 M⁻¹ см⁻¹. За единицу активности пекталиазы (Е) принимали количество фермента, вызывающее образование 1 мкмоль ненасыщенной дигалактуроновой кислоты за 1 мин, что в условиях опыта соответствовало приросту оптической плотности на 1,6 оптических единиц за 1 мин.

Мацерирующую активность определяли путем заражения стерильных ломтиков картофеля 18 часовой культурой бактерий. На картофельные срезы толщиной 1см и площадью 2-3 см² наносили 50 мкл культуры и ломтики инкубировали в чашках Петри при 28⁰ С в течение суток, после чего взвешивали массу мацерированной ткани. Каждый эксперимент ставили минимум в трехкратной повторности и данные обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение.

Фитопатогенные бактерии *Erwinia carotovora subsp.atroseptica* JN42 вызывают «черную ножку» картофеля при заражении стеблей и поражают клубни картофеля провоцируя мягкие гнили. При инокуляции клеток бактерий в растения табака они индуцируют реакцию гиперчувствительности, которая обеспечивается функционированием ССТТ [5]. Ранее нами получены мутанты по различным компонентам ССТТ , которые наряду с изменением ряда свойств, характеризовались утратой способности индуцировать реакцию гиперчувствительности. В данной работе ставилась задача изучить влияние мутаций по ССТТ на мацерацию клетками бактерий

тканей клубней картофеля и пектатлиазную активность бактерий. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2. Мацерирующая и пектатлиазные активности бактерий *E.carotovora subsp.atroseptica*.

Штаммы	Мацерация бактерий (в мг мацерированной ткани на один ломтик картофеля)	Пектатлиазная активность бактерий (Е/мл)
JN42	870,0	4,0
JN504	1387.5	3.4
3311	980,0	3.8
HW1	2062,0	3.7
JN502	1420,0	3,6
TA85	1432.5	3,3
VKE	1650,0	3,4
21A	682.5	0.72
36A	400,0	0.36

Все изученные штаммы эффективно разрушали ткани клубней картофеля в течение суток с момента заражения. Но масса мацерированной ткани (мацерирующая активность) существенно различалась у бактерий «дикого» типа и мутантов. Мацерация различалась и у разных исходных штаммов «дикого» типа – это штаммы JN42, 21A, 36A. У штаммов бактерий *E.carotovora subsp.atroseptica* JN42, 21A, 36A наблюдалась четкая корреляция между мацерирующей и пектатлиазной активностями, что нами отмечалось и ранее [10]. Бактерии *E.carotovora subsp.atroseptica* JN42, обладавшие наиболее высокой пектатлиазной активностью эффективнее мацерировали ломтики картофеля, а бактерии *E.carotovora subsp.atroseptica* 36A слабее всех, что также соответствовало их низкой пектатлиазной активности.

У всех мутантов *E.carotovora subsp.atroseptica* по генам системы секреции III типа (штаммы JN504, HW1, JN502, TA85, VKE) наблюдалось значительное увеличение мацерирующей активности (на 60-130%) в сравнении с активностью исходного штамма JN42 (табл.2). В то же время пектатлиазная активность мутантных бактерий не превышала активность исходного штамма и даже была чуть ниже, т.е. повышение мацерирующей активности мутантов по генам ССТТ нельзя связать с пектатлиазной активностью.

У мутантов JN502, HW1 нарушен синтез белков харпинов HrpN и HrpW соответственно, а штамм JN504 дефектный по синтезу обоих этих белков. Предполагается что белки харпины необходимы для обеспечения функции транспорта белков авирулентности из бактериальной в растительную клетку [11]. В силу своих гидрофобных свойств, белки- харпины встраиваются в мембраны растительной клетки, формируя транспортные каналы. Следствием этого процесса встраивания является нарушение проницаемости растительных мембран и потеря клетками низкомолекулярных веществ, используемых в метаболизме клеток бактерий. С этой стороны белки харпины выступают как факторы вирулентности бактерий, так как способствуют размножению клеток в растительной ткани, обеспечивая приток питательных веществ. Можно было бы ожидать, что мутации по генам hrpN, hrpW у бактерий *E.carotovora subsp.atroseptica* приведут к снижению вирулентности бактерий, но не усилению мацерации растительной ткани, что мы наблюдаем на самом деле. С другой стороны белки харпины необходимы для индукции реакции гиперчувствительности, т.е.защитной реакции растений. Можно предположить, что в данном случае нарушение у мутантных бактерий способности индуцировать защитную реакцию у растений привело к усилению мацерирующей активности. В пользу данной гипотезы свидетельствуют и данные полученные для мутантов *E.carotovora subsp.atroseptica* TA85 и VKE , у которых также повысилась мацерирующая активность (табл.2). Мутация по гену hrpJ (штамм TA85) нарушает функцию всей системы секреции III типа [6], в том числе приводит к утрате способности индуцировать гиперчувствительный ответ. Аналогичный эффект вызывает и мутация по гену dspE (штамм VKE).

Секреция белков харпинов фитопатогенными бактериями осуществляется посредством системы секреции III типа (ССТТ), в то время как другие факторы вирулентности такие как пектолитические и целлюлолитические ферменты секретируются посредством системы секреции II типа. Поэтому не удивительно, что пектацелиазная активность не изменилась ни у одного из изученных мутантных штаммов.

Заключение.

Установлено, что мутации по генам hrpW, hrpN, hrpJ, dspE увеличивают способность бактерий мацерировать ткани клубней картофеля, в то же время указанные мутации не влияли на пектолитическую активность бактерий. Возможно, выявленный эффект мутаций связан с утратой мутантными бактериями способности индуцировать реакцию гиперчувствительности.

Литература.

1. Barras F. Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*/ F. Barras [et al.]// Annu.Rev.Phytopathol. - 1994.- Vol.32.- P.201-234.
2. Pérombelon, M.C.M. and Salmond, G.P.C. Bacterial soft rots. In: Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases/ Pérombelon, M.C.M. and Salmond, G.P.C//Prokaryotes /Singh, U.S., Singh, R.P. and Kohmoto, K., eds/- Oxford, UK: Pergamon ,1995.- Vol. 1. -P 1–20.
3. Bell. Sample sequencing of a selected region of the genome of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* reveals candidate phytopathogenicity genes and allows comparison with *Escherichia coli*/ Bell [et al.] // Microbiology.-2002.- Vol.148. P. 1367– 1378.
4. Wei Z. M., Laby R. J., Zumoff C. H., Bauer D. W., He S. Y. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora* // Science – 1992. – 257. – P. 85 – 88
5. Nissinen R.M. Analyses of the secretomes of *Erwinia amylovora* and selected hrp mutants reveal novel type III secreted proteins and an effect of HrpJ on extracellular harpin levels/ R.M. Nissinen [et al.] //Molecular Plant Pathology.-2007.-Vol. 8, № 1.-P. 55–67
6. Лагоненко А.Л. «Характеристика локализации белка HrpJ , компонента системы секреции III типа бактерий *Erwinia carotovora* subsp.*atroseptica*/ Лагоненко А.Л. [и др.] //Доклады НАН Б.- 2004.- Т. 48, №5.-С.65-69
7. .Николайчик Е.А .Транслокация белка DspE фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* в клетки *Nicotiana Tabacum* и его необходимость для индукции реакции гиперчувствительности как необходимое условие / Николайчик Е.А [и др.] // Доклады НАНБ.- 2005.- Т.49.- Стр.81-85.
8. Лагоненко А. Л. Характеристика харпина HrpW бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* / Лагоненко А. Л., Николайчик Е. А., Евтушенков А. Н // Доклады НАН Беларуси. Т.50.-2006.-№1.-С.70-73.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике/ Миллер Дж. – М.:Мир, 1976. – 436 с
10. Чернов С.П. Мацерация тканей клубней картофеля пектолитическими бактериями рода *Erwinia*/ Чернов С.П, Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К // Прикладная биохимия и микробиология. - 1991. - Т.21. - С.885-889.
11. Collmer A. Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors/ A.Collmer [et al.] // Trends Microbiol.-2002.-Vol. 10.-P. 462–46.

TYPE III SECRETION SYSTEM GENE MUTATION EFFECTS ON VIRULENCE OF
ERWINIA ATROSEPTICA

S.Aghabozorgy, A.N.Evtushenkov

Belurussian State University, Minsk, Belarus

We have investigated the effect of some gene mutations in type III secretion system on virulence activity of a bacteria *E.atroseptica*. It was established that mutations in *hrpW*, *hrpN*, *hrpJ*, *dspE* genes increase the bacterial ability of disrupting potato's tissue ,while mutation remarks did not affect on bacterial pectolytic activity. It seems that this mutation effect's relates to waste of ability to induce of the hypersensitive response.