

ERWINIA, PECTOBACTERIUM, DICKEA – КАК ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В БГУ

Евтушенко А.Н.

*Белорусский государственный университет, Минск,
evtushenkov@bsu.by*

Обширная коллекция петолитических бактерий, выделенных из природных источников была создана в БГУ в конце 70-х (около 500 штаммов). Необходимо отметить, что среди выделенных штаммов были идентифицированы бактерии *Pectobacterium carotovorum*, *P. atrosepticum*, но не было выделено ни одного штамма *Erwinia chrysanthemi* (в новой классификации *Dickeya dadantii*!). С большой долей уверенности мы можем говорить, что в этот период (примерно с 1975 по 1980) бактерии *Dickeya dadantii* не были причиной бактериозов в республике Беларусь ввиду их отсутствия.

Основным фактором вирулентности пектолитических бактерий считали секрецию внеклеточных ферментов, разрушающих полисахариды растительных клеточных стенок такие как пектины, целлюлоза, гемицеллюлозы, что приводило к мацерации тканей растений и появлению мягких гнилей. Основными ферментами пектолитического комплекса являлись пектатлиазы и они были объектами наших исследований. Интерес к изучению пектатлиаз мотивировался несколькими причинами: во-первых как важнейших факторов вирулентности, а во-вторых как секретлируемых внеклеточных ферментов – феномен редкий у грамотрицательных бактерий.

Изучение пектатлиазной активности 55 штаммов *P. carotovorum*, 9 штаммов *P. atrosepticum* и 4 штаммов *Dickeya dadantii* позволило заключить, что наиболее высокой активностью отличались штаммы *Dickeya dadantii* – 41,8 Е/мл, ниже активность у *P. carotovorum* – 2,50 Е/мл и самая низкая у *P. atrosepticum* – 0,55 Е/мл [2].

Разработанная нами оригинальная буферная для система электрофоретического анализа изоферментов пектатлиаз позволило уверенно разделить основные ферменты бактерий *Pectobacterium carotovorum*, *P. atrosepticum*, *Dickeya dadantii* [3, 8] и изучить их основные свойства (рис.1). С помощью данного метода было проведено изучение влияния условий культивирования бактерий на изоферментный состав пектатлиаз и выявлено, что регуляция синтеза каждой молекулярной формы пектатлиазы *Erwinia* осуществляется независимо. Только продукция ферментов Eca1, Eca2 и Ech2, Ech1 по-видимому, контролируется общим механизмом, о чем косвенно свидетельствуют их примерно одинаковые количественные соотношения на разных средах. Синтез этих четырех "нейтральных" пектатлиаз сравнительно слабо индуцируется полипектатом натрия (особенно это свойственно Eca1 и Eca2), в то время, как синтез "щелочных" пектатлиаз Eca4, Eca5 и Ech4, Ech5

повышается в присутствии полипектата в несколько десятков раз. При этом синтез ферментов Eca4 и Ech5 в значительно меньшей степени, чем двух других, подвержен катаболитной репрессии глюкозой [9].

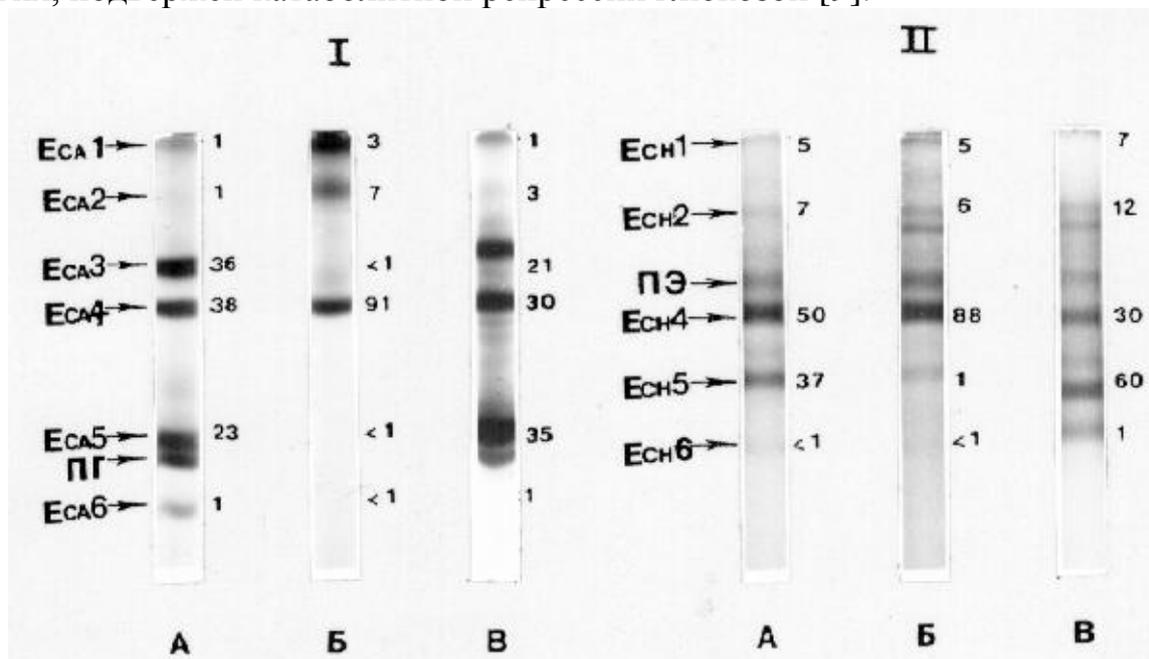


Рисунок 1 – Электрофореграмма препаратов внеклеточных пектатлиаз бактерий *E. carotovora* 550 (I) и *E. chrysanthemi* ENA49 (II), полученных при росте на минеральной среде 1А, содержащей: 0,5% глицерина, 0,5% полипектата (А); стебли льна (Б); клубникартофеля (В).

Цифры указывают значения пектатлиазной активности различных изоферментов (в % от общей активности соответствующего образца).

Принято считать, что мацерирующие свойства бактерий *Pectobacterium* (в основном обусловлены их пектатлиазной активностью, что подтверждается как опытами *in vitro* с чистыми ферментами, так и в экспериментах по клонированию генов пектатлиаз в клетках *E. coli*, которыми в последующем заражаются растительные ткани. Известно также, что бактерии р. *Pectobacterium* различающиеся по уровню пектатлиазной активности в 10 – 100 раз, одинаково эффективно мацерируют растительные ткани. Бактерии изученных штаммов рода *Pectobacterium* характеризовались различной мацерирующей активностью. Так, из проверенных культур клетки только 8 штаммов *Dickeya dadantii* (*E. chrysanthemi*) полностью мацерировали картофельные диски за 15 – 16 ч. Несколько меньшей мацерирующей активностью обладали штаммы *P. carotovorum*, клетки которых обуславливали полную мацерацию дисков в течение 16 – 19 ч. Самой низкой мацерирующей активностью характеризовались бактерии *P. atrosepticum* [5].

Молекулярное клонирование генов пектатлиаз *Pectobacterium* и *Dickeya dadantii* в клетках *E. coli* позволило изучить особенности секреции клетками собственных и чужеродных пектатлиаз. Нами выявлена специфичность систем

секреции пектатлиаз у бактерий *Pectobacterium carotovorum*, *P. atrosepticum* и *Dickeya dadantii* [1, 8]. Анализ результатов экспрессии генов пектатлиаз *Dickeya dadantii* в клетках гомологичных (одного вида *Dickeya dadantii*) и гетерологичных (*Pectobacterium* хозяев позволяет предположить, что у клеток *Pectobacterium* наружная мембрана клеточной стенки препятствует секреции гетерологичной пектатлиазы *Dickeya dadantii* Ech1(pelB) в культуральную жидкость, в то время как для собственных пектолитических ферментов она не является барьером. В отличие от описанной ситуации клетки *Dickeya dadantii*, имеющие плазмиду pPTL1 с геном пектатлиазы Ech1, секретировали данный фермент в культуральную жидкость и не накапливали его ни в периплазматическом пространстве, ни в цитоплазме.

Даже пектатлиазы бактерий *P. carotovorum* транзистентно накапливались в периплазме клеток *P. atrosepticum* при клонировании в них генов Eca3, Eca4, Eca5 *P. atrosepticum*. Этот факт в свою очередь говорит о высокой специфичности секреторных систем пектиназ у бактерий, принадлежащих не только к разным родам, но и даже близким видам. Использование плазмид с клонированными генами позволило определить эффективность систем секреции [6].

Изучение реакции растений на бактериальную инфекцию позволило оценить роль белков системы секреции белков пектобактерий во взаимодействии с растениями. Выявлен белок DspE экспортируемый бактериями в клетку растений и изучаются механизмы распознавания растениями бактериальных патогенов. В ответ на бактериальную инфекцию клетка синтезируют ряд PR-белков, позволяющих ограничить распространение патогена. Изучение экспрессии ряда PR-генов в клетках картофеля позволило выявить корреляцию высокого уровня экспрессии PR-5 гена с повышенной устойчивостью к мацерации тканей клубней пектобактериями [7].

Секвенирование геномов пектобактерий не выявило существенных различий между видами *P. carotovorum* и *P. atrosepticum* [10]. У них одинаковый набор гидролитических ферментов, но выявленные нами различия в пектатлиазной и мацерирующей активности могут быть следствием более строгой регуляции синтеза и секреции внеклеточных ферментов у *P. atrosepticum* как более специализированного патогена растений.

Литература

1. Е.В. Бабицкая, А.Н. Евтушенков, В.Е. Шевчик, Р.А. Желдакова. Экспрессия pel -генов *Erwinia chrysanthemi* в клетках *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* 36A // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 1993. - № 4. - С. 12-15.
2. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Пектатлиазная активность бактерий рода *Erwinia*// Вестн.Бел.ун-та, сер.II, N 2, 1978, С.25-28.

3. А.Н. Евтушенков, В.Е. Шевчик, Л.Б. Попова, Ю.К. Фомичев. Очистка и свойства двух внеклеточных пектатлиаз штамма *Erwinia chrysanthemi* ENA49 / Прикладная биохимия и микробиология. - 1986. - Т. 22, В. 2.- С. 187-192.
4. Евтушенков А.Н., Шевчик В.Е., Фомичев Ю.К. Экспрессия гена пектатлиазы *Erwinia chrysanthemi* ENA49 в клетках других представителей рода *Erwinia* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 1987. - № 5. - С. 22-25.
5. А.Н. Евтушенков, С.П. Чернов, В.Е. Шевчик, Ю.К. Фомичев. Мадерирующая активность пектолитических бактерий рода *Erwinia* // Биотехнология. - 1989. - Т.5, №2. - С. 226-228
6. Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Секретия пектатлиаз клетками *Erwinia chrysanthemi* и *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* // Микробиология. - 1996. - Т. 65, В. 3. - С. 333-338.
7. О.М. Третьякова, А.Н. Евтушенков Экспрессия PR генов картофеля при бактериальной инфекции // Тр. Белорус. гос. ун-та. Сер. физиол., биохим. и молекуляр. основы функционирования биосистем. – 2011. – Т. 6, ч. 1 – С. 163–167.
8. Шевчик В.Е., Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Изоферменты внеклеточных пектатлиаз бактерий рода *Erwinia* // Биохимия. - 1988. - Т.53, В. 10. - С. 1628-1638.
9. V.E. Shevchick, A.N. Evtushenkov, E.V. Babitskaya, Yu.K. Fomichev. Production of pectolytic enzymes from *Erwinia* grown on different carbon sources // World Journal of Microbiology and Biotechnology. - 1992. -Vol. 8. - P. 115-120.
10. Nikolaichik Y, Gorshkov V, Gogolev Y, Valentovich L, Evtushenkov A. 2014. Genome sequence of *Pectobacterium atrosepticum* strain 21A. // Genome Announc. 2(5): e00935-14. doi:10.1128/genomeA.00935-14.