

ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РАСТЕНИЙ НА ПРОДУКЦИЮ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЯМИ *ERWINIA AMYLOVORA*

INFLUENCE OF PLANT PHENOLIC COMPOUNDS ON THE PRODUCTION OF *ERWINIA AMYLOVORA* EXOPOLYSACCHARIDES

Песоцкая К.Ю., Лагоненко А.Л., Евтущенков А.Н.

УО «Белорусский государственный университет»
220030, Республика Беларусь, г. Минск, проспект
Независимости, д.4
E-mail: lagonenkoal@mail.ru

Pesotskaya K.U., Lagonenko A.L., Evtushenkov A.N.

Belarusian State University
4, Nezavisimosti Avenue, 220030, Republic of Belarus, Minsk
E-mail: lagonenkoal@mail.ru

Бактериальный ожог плодовых культур — одно из самых тяжелых заболеваний плодовых деревьев. Инфекция поражает как культурные, так и дикорастущие растения семейства *Rosaceae*. Возбудителем бактериального ожога плодовых является *Erwinia amylovora*, принадлежащая к семейству *Enterobacteriaceae*. К факторам вирулентности *E. amylovora* традиционно относят систему секреции III типа (ССТТ), экзополисахариды амиловоран и леван. Амиловоран — разветвленный гетерополимер, в состав которого входят остатки глюкозы, галактозы и пирувата. Синтез амиловорана является необходимым условием для развития бактериального ожога, поскольку он способен физически блокировать движение воды по сосудистым элементам растения. Амиловоран и леван в совокупности с белками входят в состав биопленки, образуемой *E. amylovora*. Целью данного исследования явилось изучение влияния ряда фенольных соединений растений на продукцию экзополисахаридов амиловорана и левана бактериями *E. amylovora*. Исследования проводили в 2018–2019 годах на базе на кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ в Республике Беларусь. Объектами исследований выступали штаммы *E. amylovora* E2 и D4 из коллекции кафедры молекулярной биологии. В статье представлены результаты исследования по изучению влияния растительных фенольных соединений на биосинтез амиловорана и левана, а также на активность фермента катехол-2,3-диоксигеназы (XylE). Продукция амиловорана в присутствии в культуральной среде коричневой, ванилиновой и феруловой кислот превышала контроль на 52,7%, 54,31% и 29,4% соответственно. Кофейная кислота не оказывала значительного воздействия на биосинтез данного экзополисахарида. Салициловая кислота вызывала снижение выработки амиловорана на 60% и активность катехол-2,3-диоксигеназы — на 51% по сравнению с контрольными значениями. На биосинтез левана присутствие в среде фенольных кислот не повлияло. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что фенольные кислоты могут изменять уровень биосинтеза амиловорана, однако механизм их воздействия требует дальнейшего подробного изучения.

Ключевые слова: *E. amylovora*, экзополисахариды, амиловоран, леван, катехол-2,3-диоксигеназа, фенольные соединения растений, салициловая кислота.

Для цитирования: Песоцкая К.Ю., Лагоненко А.Л., Евтущенков А.Н. ВЛИЯНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РАСТЕНИЙ НА ПРОДУКЦИЮ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ БАКТЕРИЯМИ *ERWINIA AMYLOVORA*. *Аграрная наука*. 2019; (2): 103–106.

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-2-103-106>

Введение

Бактериальный ожог — это тип бактериоза, вызываемый бактериями различной видовой и родовой принадлежности. Среди фитопатогенных бактерий — возбудителей различных форм ожога — выделяют несколько наиболее значимых видов: *Erwinia amylovora*, *Xanthomonas oryzae*, *Xanthomonas arboricola*, *Xylella fastidiosa*. Наибольшую угрозу представляет *Erwinia*

Fire blight is a contagious disease affecting a wide range of host species within the family Rosaceae. The causal pathogen is Erwinia amylovora that belongs to the family Enterobacteriaceae. Many virulence determinants of E. amylovora have been characterized, including the Type III secretion system (T3SS), exopolysaccharides (EPS) amylovoran and levan. Amylovoran is a heteropolysaccharide with pentasaccharide repeating units containing four galactose and one glucuronic acid residues. Amylovoran is a pathogenicity factor in Erwinia amylovora, essential for the development of disease symptoms. It has been suggested to play a major role in disturbance and obstruction of the plant vascular system. Amylovoran and levan are required for biofilm formation by E. amylovora. In this study the following strains were used: Erwinia amylovora E2, D4. We demonstrate the influence of plant phenolic compounds on the production of E. amylovora EPS amylovoran and levan and catechol 2.3-dioxygenase activity. We showed that amylovoran production in presence in cultivation medium of cinnamic, vanillic and ferulic acids increased significantly (52.7%, 54.31% and 29.4% respectively). The presence in cultivation medium of caffeic acid did not influence amylovoran synthesis. Also we investigated that catechol 2.3-dioxygenase activity and amylovoran production was inhibited by salicylic acid (51% and 60% respectively). Unfortunately, we couldn't demonstrate the influence of phenolic acids on levan production. The results indicate that plant phenolic compounds inhibit or increase amylovoran biosynthesis, however, it deserves further research.

Key words: *E. amylovora*, exopolysaccharides, amylovoran, levan, catechol 2.3-dioxygenase, plant phenolic compounds, salicylic acid.

For citation: Pesotskaya K.U., Lagonenko A.L., Evtushenkov A.N. INFLUENCE OF PLANT PHENOLIC COMPOUNDS ON THE PRODUCTION OF *ERWINIA AMYLOVORA* EXOPOLYSACCHARIDES. *Agrarian science*. 2019; (2): 103–106. (In Russ.)

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-2-103-106>

amylovora, полифаг, поражающий более 180 видов дикорастущих и культурных растений семейства *Rosaceae*. В международной терминологии бактериоз получил название Fire blight (огненная болезнь) по одному из основных признаков заболевания: зараженное дерево напоминает обожженное пожаром растение [4].

Ущерб, наносимый ожогом плодовых культур, выражается как в повсеместном снижении урожайности,

так и влечет за собой гибель пораженных растений, в особенности груши и айвы. В настоящее время заболевание широко распространено в США, Канаде, Великобритании, Норвегии, Польше, Швеции, Чехии, Дании, Франции, Германии, Китае, Индии, Вьетнаме, Чили и других странах мира [2], а также в Новой Зеландии. [4] В 2007 году ожог плодовых был зарегистрирован на территории Беларуси в Мядельском и Узденском районах Минской области. Позднее несколько вспышек заболевания было выявлено в Гродненской и Брестской областях [3].

Основными и наиболее экономически значимыми хозяевами бактериального ожога являются дикорастущие и культурные растения из подсемейства *Maloideae* семейства *Rosaceae*: яблоня (*Malus* spp.), груша (*Pyrus* spp.), мушмула (*Eriobotrya japonica*), айва (*Cydonia* spp.), пираканта (*Pyracantha* spp.). Кроме того, бактериоз поражает боярышник, кизильник, рябину (кроме *S. intermedia*), иргу, странвезию [2].

Во взаимодействии фитопатогенных бактерий с растениями ведущую роль играют полисахариды, секретируемые клетками бактерий в окружающую среду, которые получили название «экзополисахариды». Являясь одним из основных факторов вирулентности *Erwinia amylovora*, эти полимеры выполняют множество разных функций, необходимых для установления и развития инфекции у растений-хозяев. Они принимают участие в преодолении фитопатогенами защитных систем растений, нарушают работу проводящей системы растений, вызывая закупорку сосудов ксилемы [9], а также предохраняют бактериальные клетки от потери влаги и питательных веществ при неблагоприятных условиях среды. [10] Также в ряде работ было продемонстрировано, что экзополисахариды участвуют в образовании *Erwinia amylovora* биопленок, способствуя присоединению клеток друг к другу и прикреплению образовавшегося конгломерата к стенкам сосудов ксилемы [5, 6].

E. amylovora продуцирует два основных типа экзополисахаридов: амиловоран и леван. Амиловоран представляет собой разветвленный гетерополисахарид с молекулярной массой около 1 МДа. Количество продуцируемого амиловорана положительно коррелирует со степенью вирулентности различных штаммов *E. amylovora*. [10] Леван — высокомолекулярный полифруктозан, состоящий из остатков фруктозы и образующийся под действием фермента левансуказы в присутствии сахарозы. [1, 8] Мутантные штаммы *E. amylovora*, не обладающие способностью синтезировать леван, также характеризуются пониженной вирулентностью [13].

В ответ на внедрение патогенов в инфицированных тканях растений развивается защитная реакция, реакция сверхчувствительности, которая проявляется в быстрой локальной гибели инфицированных клеток. Сверхчувствительный ответ растения сопровождается накоплением фенольных соединений, фитоалексинов, PR-белков в зоне заражения, в результате чего развивается приобретенная устойчивость, не только в месте внедрения патогена (локальная приобретенная устойчивость — LAR), но и отдаленных частях растения (системная приобретенная устойчивость — SAR). В возникновении SAR ключевую роль играет салициловая кислота — фитогормон фенольной природы. Салициловая кислота участвует в передаче сигналов, активирующих механизмы системной устойчивости в клетках растения, удаленно расположенных от места инфицирования, являясь важнейшей сигнальной молекулой.

[12] При развитии реакции гиперчувствительности в инфицированных тканях возрастает активность кислой бензоил-2-гидроксилазы (фермента конечного этапа образования салициловой кислоты) и происходит усиление биосинтеза салициловой кислоты. [4] Также показано, что салициловая кислота является негативным регулятором экспрессии генов некоторых факторов вирулентности *Pseudomonas aeruginosa*, препятствует образованию биопленок у *Pseudomonas aeruginosa* [11], *Pectobacterium carotovorum*, *Pseudomonas syringae* pv *syringae*, а также ингибирует подвижность у *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas syringae* pv *syringae*, *Pectobacterium carotovorum*. [7] о-Кумаровая и п-кумаровая кислоты способны ингибировать (в некоторых случаях — индуцировать) экспрессию генов системы секреции III типа у *D. dadantii*. [4] Влияние других растительных фенольных соединений на экспрессию факторов вирулентности большинства фитопатогенных бактерий по-прежнему остается неясным.

Принимая во внимание все вышеизложенное, целью настоящего исследования явилось изучение влияния ряда фенольных соединений растений (салициловой, коричной, ванилиновой, кофейной и феруловой кислот) на продукцию экзополисахаридов амиловорана и левана бактериями *E. amylovora*.

Материалы и методы

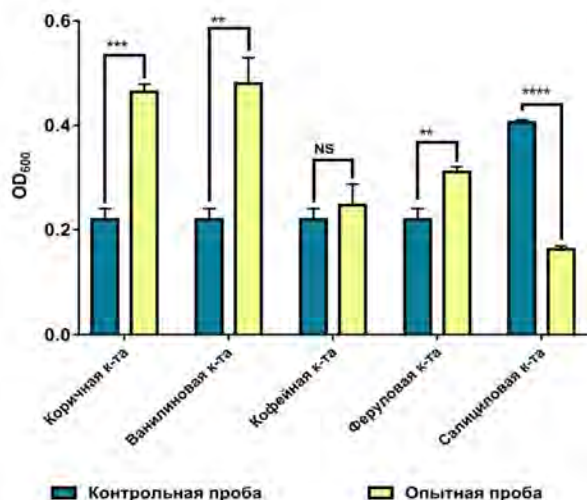
Экспериментальную работу выполняли на базе кафедры молекулярной биологии биологического факультета БГУ. В работе использовали бактерии *E. amylovora* E2 (штамм дикого типа, выделен из побегов яблони в Мядельском районе в 2009 году) и D4 (транспозоновый мутант, инсерция *mini-Tn5xylE* под промотор *ams*-оперона).

Водный стоковый раствор салициловой кислоты, а также стоковые растворы других исследуемых фенольных соединений в этиловом спирте были добавлены в культуральную среду (среду MBMA) перед началом культивирования, так что конечная концентрация всех фенольных соединений в среде составила 10 мкг/мл соответственно.

Количественная оценка уровня продукции амиловорана проводилась путем измерения степени мутности опытного раствора. 1,5 мл ночной культуры бактерий центрифугировали в течение 5 минут при 6000 g. Клетки трижды отмывали 0,1 М Na-фосфатным буфером (pH 7,4), затем полностью отбирали супернатант, а образовавшийся осадок ресуспендировали в 200 мкл 0,1 М Na-фосфатного буфера (pH=7,4). В стерильные колбы, содержащие 10 мл жидкой минимальной среды MBMA (г/л: KH_2PO_4 — 3; K_2HPO_4 — 7; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 1; MgSO_4 — 0,03; лимонная кислота — 0,5; глицерол — 2 мл), вносили 100 мкл полученной клеточной суспензии. Клетки бактерий выращивали с аэрацией в течение 22 ч при 28 °C, центрифугировали (10 000 g., 5 мин), затем к 1 мл отобранного супернатанта добавляли 50 мкл раствора хлорида цетилпиридиния в концентрации 50 мг/мл, после чего инкубировали 10 минут при комнатной температуре и измеряли оптическую плотность при 600 нм. Полученные значения были пересчитаны на значение оптической плотности культуры равное 1.0 [13].

Для оценки уровня продукции левана измеряли активность левансуказы. Для этого 100 мкл ночной культуры бактерий вносили в стерильные колбы, содержащие 10 мл питательного бульона, и выращивали с аэрацией в течение 22 ч при 28 °C (180 rpm). Клетки бактерий осаждали центрифугированием (13 000 g, 5 мин),

Рис. 1. Влияние фенольных соединений растений на продукцию амиловорана штаммом *E. amylovora* E2. Уровень значимости *P* был рассчитан с использованием теста Уэлча (NS – нет достоверных различий; ***P*<0,0332; ****P*<0,0021; *****P*<0,0001)



1 мл полученного супернатанта добавляли к 1 мл LS-буфера (50 мМ К-фосфатный буфер, pH 7,0; 2 М сахара; раствор канамицина (конечная концентрация 50 мкг/мл) для предотвращения дальнейшего бактериального роста) и инкубировали 24 ч при 28°C. После инкубации измеряли оптическую плотность при 600 нм. Полученные значения были пересчитаны на значение оптической плотности культуры равное 1.0 [3, 13].

Измерение активности катехол-2,3-диоксигеназы (*XylE*) проводили на спектрофотометре Cary 50. 100 мкл ночной культуры бактерий вносили в стерильные колбы, содержащие 10 мл среды MBMA, и выращивали с аэрацией в течение 22–24 ч при 28 °C. Клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 6000 g, осадок клеток ресуспендировали в 1,5 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера (pH 8,0) и гомогенизировали на льду ультразвуком с частотой 22 кГц на дезинтеграторе УЗДН-2Т тремя импульсами по 30 сек с интервалом в 90 сек. Пробу освобождали от обломков клеток центрифугированием в течение 5 мин при 12 000 g. Полученный супернатант (100 мкл) добавляли к субстратной смеси, содержащей 2,88 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера (pH 8,0) и 20 мкл 0,01 М катехола. Реакцию проводили в объеме 3 мл в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см, помещенных в термостатируемую ячейку (30 °C). Увеличение оптической плотности при 375 нм свидетельствовало об образовании 2-гидроксимуконного семиальдегида из катехола. За единицу активности *XylE* принимали количество фермента, вызывающее увеличение абсорбции реакционной смеси при 375 нм на 0,11 за 1 мин, что соответствовало образованию 1нМ продуктов реакции. Количественное определение белка проводили с использованием красителя кумасси синего G-250 по методу Брэдфорда [1].

Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism 7.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе проведенных нами исследований было установлено, что фенольные соединения растений в концентрации 10 мкг/мл оказывают влияние на продукцию амиловорана клетками бактерий штамма *E. amylovora* E2. Так, коричная и ванилиновая кислоты вызывали уве-

Рис. 2. Влияние фенольных соединений растений на активность катехол-2,3-диоксигеназы штамма *E. amylovora* D4. Уровень значимости *P* был рассчитан с использованием теста Уэлча (NS – нет достоверных различий; ****P*<0,0021)

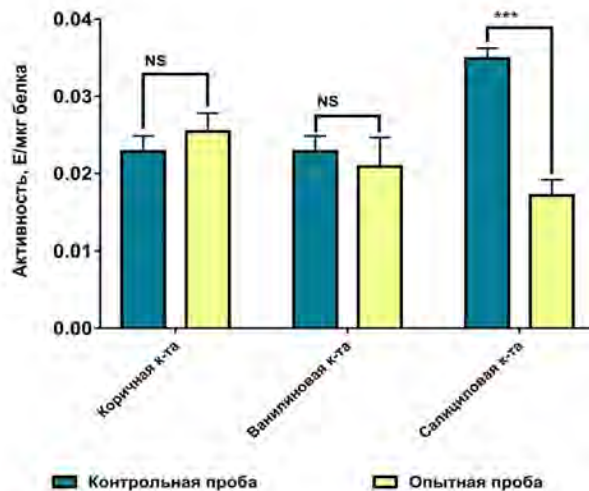
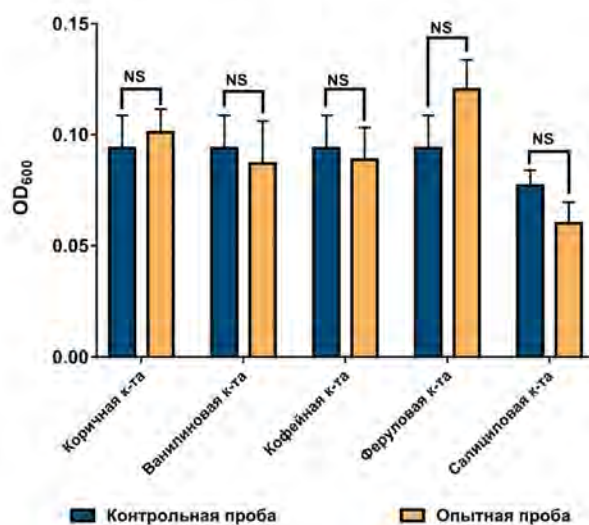


Рис. 3. Влияние фенольных соединений растений на продукцию левана штаммом *E. amylovora* E2. Уровень значимости *P* был рассчитан с использованием теста Уэлча (NS – нет достоверных различий)



личение продукции амиловорана примерно в 2 раза, феруловая — в 1,4 раза. Кофейная кислота не оказывала значительного воздействия на биосинтез данного экзополисахарида. Салициловая кислота снижала продукцию амиловорана примерно в 2,2 раза (рис. 1).

Для того чтобы установить возможное влияние фенольных соединений на работу генов на транскрипционном уровне, нами было проведено измерение активности кодируемой *xylE*-геном катехол-2,3-диоксигеназы у штамма *E. amylovora* D4, мутантного по биосинтезу амиловорана. Наличие в составе хромосомы репортерного гена *xylE*, встроившегося в нужной ориентации за промоторной частью *ams*-оперона, позволяет судить об интенсивности экспрессии анализируемых генов по изменению образования окрашенного в желтый цвет 2-гидроксимуконного семиальдегида из катехола. В результате было обнаружено, что салициловая кислота вызывает значительное ингибиро-

ние синтеза катехол-2,3-диоксигеназы, в отличие от ванилиновой и коричной кислот, не оказавших воздействия на продукцию фермента (рис. 2). Обнаруженный эффект, вероятно, может быть обусловлен влиянием салициловой кислоты на экспрессию и активность набора транскрипционных факторов, что требует дальнейшего изучения.

Также нами была изучена влияние растительных фенольных соединений и на продукцию левана клетками бактерий штамма *E. amylovora* E2. Существует несколько различных способов определения содержания данного экзополисахарида, однако самый распространенный из них основан на определении активности леван-синтезирующего фермента левансукразы. Показано, что фенольные соединения растительного происхождения не оказывают значительного влияния на продукцию левана (рис. 3).

ЛИТЕРАТУРА

1. Досон Р., Эллиот Д. Справочник биохимика: пер. с. англ. М.: Мир, 1991. 544 с.
2. Ерохова М.Д., Орлинский А.Д. Бактериальный ожог плодовых — опасное карантинное заболевание // Защита и карантин растений. 2017. № 11. С. 32–34.

REFERENCES

1. Dawson R., Elliot D. Handbook of biochemistry: Per. with. English M.: Mir, 1991. 544 p.
2. Erokhova M.D., Orlinsky A.D. Bacterial fruit burn is a dangerous quarantine disease // Protection and quarantine of plants. 2017. № 11. P. 32–34.
3. Kudina I.V., Zagday E.I. Genetic characteristics of the Belarusian strains of *Erwinia amylovora* // Biological spring: Sat. abstracts of the conference of young scientists of the Biological Faculty of the Belarusian State University. 2010. p. 22.
4. Chakaev D.Sh., Chakaeva A.Sh. Burn of fruit trees in Kyrgyzstan // News of the NAS KR. 2010. No. 4. P. 61–64.
5. Du Z., Geider K. Characterization of an activator gene upstream of *lsc*, involved in levan synthesis of *Erwinia amylovora* // Physiological and Molecular Plant Pathology. 2002. V.60, № 1. P. 9–17.
6. Eastgate J.M. *Erwinia amylovora*: the molecular basis of fireblight disease // Molecular Plant Pathology. 2000. V.1, № 6. P. 325–329.
7. Hildebrand M., Aldridge P., Geider K. Characterization of *hns* genes from *Erwinia amylovora* // Mol Gen Genomics. 2006. V.275, № 3. P. 310–319.
8. Khokhani D., Zhang C., Li Y. Discovery of Plant Phenolic Compounds That Act as Type III Secretion System Inhibitors or Inducers of the Fire Blight Pathogen, *Erwinia amylovora* // Applied and Environmental Microbiology. 2013. V.79, № 18. P. 5424–5436.
9. Koczan J.M., Lenneman B.R., McGrath M.J. Cell Surface Attachment Structures Contribute to Biofilm Formation and Xylem Colonization by *Erwinia amylovora* // Applied and Environmental

Заклучение

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что некоторые растительные фенольные соединения в концентрации 10 мкг/мл изменяют интенсивность продукции амиловорана.

Салициловая кислота вызывает значительное снижение продукции амиловорана клетками бактерий *E. amylovora* E2 (на 60%). Наблюдаемый эффект, по всей видимости, связан с репрессией транскрипции оперона, ответственного за биосинтез этого экзополисахарида. Ванилиновая, коричная и феруловая кислоты индуцировали биосинтез амиловорана (в 2,2 раза, 2,1 раза и 1,4 раза соответственно), однако не влияли на транскрипцию *ams*-оперона.

Изучаемые фенольные соединения в выбранной концентрации не оказывали влияния на активность ключевого фермента биосинтеза левана.

3. Кудина И.В., Загдай Е.И. Генетическая характеристика белорусских штаммов *Erwinia amylovora* // Биологическая весна: сб. тезисов конференции молодых ученых биологического факультета БГУ. 2010. С. 22.
4. Чакаев Д.Ш., Чакаева А.Ш. Ожог плодовых деревьев в Кыргызстане // Известия НАН КР. 2010. № 4. С. 61–64.

Microbiology. 2011. V.77, № 19. P. 7031–7039.

10. Koczan J.M., McGrath M.J., Zhao Y. Contribution of *Erwinia amylovora* Exopolysaccharides Amylovan and Levan to Biofilm Formation: Implications in Pathogenicity // Phytopathology. 2009. V.99, № 11. P. 1237–1244.
11. Lagonenko L., Lagonenko A., Evtushenkov A. Impact of salicylic acid on biofilm formation by plant pathogenic bacteria // J. Biol. Earth Sci. 2013. V.3, № 2. P. 176–181.
12. Limoli D.H., Jones C.J., Wozniak D.J. Bacterial Extracellular Polysaccharides in Biofilm Formation and Function // Microbiology Spectrum. 2015. V.3, № 3. P. 1–19.
13. Maes M., Orye K. Influence of amylovan production on virulence of *Erwinia amylovora* isolates from *Rubus* // Eur. J. Plant Pathology. 2001. V.107, № 8. P. 839–844.
14. Piqu N., Mi ana-Galbis D., Merino S. Virulence Factors of *Erwinia amylovora*: a Review // Int. J. Mol. Sci. 2015. V.16, № 6. P. 12836–12845.
15. Prithiviraj B., Bais H.P., Weir T. Down Regulation of Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* by Salicylic Acid Attenuates Its Virulence on *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans* // Infection and Immunity. 2005. V.73, № 9. P. 5319–5328.
16. Sk odowska M., Mikici ski A., Wielanek M. Phenolic profiles in apple leaves and the efficacy of selected phenols against fire blight (*Erwinia amylovora*) // Eur. J. Plant Pathology. 2018. V.151, № 1. P. 213–228.
17. Wang D., Korban S.S., Zhao Y. AmyR Is a Novel Negative Regulator of Amylovan Production in *Erwinia amylovora* // PLOS ONE. 2012. V.7, № 7. P. 1–11.

ОБ АВТОРАХ:

Песоцкая К.Ю., магистрант
Лагоненко А.Л., кандидат биологических наук, доцент
Евтушенков А.Н., доктор биологических наук, профессор

ABOUT THE AUTHORS:

Pesotskaya K.U., Master's Degree student
Lagonenko A.L., PhD in Biology, associate Professor
Evtushenkov A.N., Doctor of Sciences in Biology, Professor