



ЭКОБИОТЕХ

ISSN 2618-964X

<http://ecobiotech-journal.ru>



МОДИФИКАЦИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ПРИ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ФИТОПАТОГЕНОМ *PECTOBACTERIUM ATROSEPTICUM*

Исламов Б.Р.

Казанский институт биохимии и биофизики
ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, Россия
E-mail: bah-islam80@mail.ru

Растительная клеточная стенка – первый уровень обороны в защите растений от фитопатогенов. Однако, чтобы пройти этот барьер, фитопатогены продуцируют ферменты, разрушающие клеточную стенку растений. В связи с этим, целью настоящей работы является характеристика особенностей буфер-экстрагируемой фракции полисахаридов из клеточной стенки растений. В качестве объекта для исследования выбрали модельную патосистему, включающую фитопатогенную бактерию *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 и картофель в качестве растения-хозяина. Для характеристики модификаций полисахаридов были применены методы фракционирования углеводных полимеров и их анализа с помощью гель-фильтрации, а также определение моносахаридного состава с использованием анионообменной хроматографии. В инфицированных *P. atrosepticum* растениях картофеля увеличивалась содержание полисахаридов и фрагментов рамногалактуронана I в буфер-экстрагируемой фракции по сравнению с контрольными растениями.

Ключевые слова: *Pectobacterium atrosepticum*, *Solanum tuberosum*, полигалактуронан, рамногалактуронан, растительная клеточная стенка

MODIFICATION OF POLYSACCHARIDES OF THE PLANT CELL WALL DURING INFECTION CAUSED BY THE PATHOGEN *PECTOBACTERIUM ATROSEPTICUM*

Islamov B.R.

Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics,
FRC KazSC RAS, Kazan, Russia
E-mail: bah-islam80@mail.ru

Plant cell wall is the first level of defense in protecting plants from phytopathogens. However, to pass this barrier, phytopathogens produce enzymes that destroy the cell wall of plants. In this regard, the aim of this work is to characterize the features of the buffer-extractable polysaccharide fraction from the cell wall of plants. As an object for research, we chose a model pathosystem that included the phytopathogenic bacterium *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 and potato as a host plant. To characterize the polysaccharide modifications, the methods of fractionation of carbohydrate polymers and their analysis using gel filtration were used, as well as the determination of the monosaccharide composition using anion exchange chromatography. In *P. atrosepticum* infected potato plants, the content of polysaccharides and fragments of ramnogalacturonan I in the buffer-extractable fraction increased in comparison with control plants.

Keywords: *Pectobacterium atrosepticum*, *Solanum tuberosum*, polygalacturonan, ramnogalacturonan, plant cell wall

Поступила в редакцию: 28.04.2020

DOI: [10.31163/2618-964X-2020-3-2-213-219](https://doi.org/10.31163/2618-964X-2020-3-2-213-219)

ВВЕДЕНИЕ

Большинство фитопатогенных бактерий при колонизации растений-хозяев в первую очередь взаимодействуют со стенками растительных клеток, которые играют важную роль в предотвращении проникновения патогенов, а именно, действуют как пассивный барьер и [Nematy et al., 2009; Underwood, 2012; Miedes et al., 2014] являются резервуаром антимикробных соединений, которые выделяются во время деградации клеточной стенки [García-Olmedo et al., 2001; Schulze-Lefert, 2004; Vorwerk et al., 2004; Savoia et al., 2012]. Растительная клеточная стенка представляет собой динамичную структуру, которая

постоянно преобразуется в результате изменения абиотических и биотических факторов [Bellincampi et al., 2014]. Основную часть сухой массы растительной клеточной стенки составляют полисахариды, которые разделяют на три основных типа: целлюлоза, пектиновые вещества и связующие гликаны (гемицеллюлоза) [Cosgrove et al., 2005]. Пектиновые вещества (гомогалактуронан (ГГ), рамногалактуронан I (РГ I) и РГ II и ксилогалактуронан представляют собой структурно сложные полисахариды, которые богаты α -1,4-связанными остатками галактуроновой кислоты (ГалК) [Atmodjo et al., 2013].

Фитопатогенные бактерии при колонизации растений продуцируют ферменты, разрушающие клеточную стенку растений, для того чтобы использовать продукты распада полисахаридов в качестве источника питательных веществ [Nematu et al., 2009; Dou, 2012; Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2014]. Фитопатогенная бактерия *Pectobacterium atrosepticum* при колонизации сосудов ксилемы также продуцирует ферменты для разрушения клеточной стенки. Однако, в отличие от других патогенов, пектобактерии используют продукты распада полисахаридов не только в качестве питательного субстрата, но и «строительного материала» для образования специфических многоклеточных структур, которые были названы «бактериальными эмболами». Эти структуры полностью перекрывают сосуд ксилемы и обеспечивают условия для нисходящей миграции микроорганизмов. Отличительной чертой этих многоклеточных структур по сравнению с хорошо описанными бактериальными биопленками является способ формирования [Gorshkov et al., 2016; 2017]. При образовании типичных биопленок, микроорганизмы прикрепляются к поверхности субстрата (в том числе к клеточной стенке сосуда), и синтезируют собственные внеклеточные полисахариды в качестве внеклеточного матрикса, объединяющего отдельные клетки в единую систему [Романова, 2011; De la Fuente-Núñez et al., 2013; Jamal et al., 2018]. При формировании бактериальных эмболов такого прикрепления не происходит, а в качестве матрикса используются полисахариды растения-хозяина, а именно рамногалактуронан I (РГ I) [Gorshkov et al., 2016]. Однако такая последовательность событий была продемонстрирована на примере взаимодействия пектобактерий с неспецифичным хозяином (растения табака). При этом не известно, происходит ли обогащение буфер-экстрагируемой фракции полисахаридов фрагментами РГ I при взаимодействии пектобактерий со специфичным хозяином – картофелем, в том числе при развитии разных симптомов заболевания: мацерация тканей и увядание. Связи с этим, цель данного исследования состояла в том, чтобы проанализировать полисахариды буфер-экстрагируемой фракции у контрольных и инфицированных *P. atrosepticum* растений картофеля при развитии разных симптомов заболевания (мацерация тканей и увядание).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растения картофеля (*Solanum tuberosum* сорта Дезире) размножали черенкованием и культивировали на среде Мурасиге-Скуга (МС) [Murashige, Skoog, 1962]. Первые 10 суток растения картофеля выращивали в стерильных условиях на среде МС. Далее проростки пересаживали в стерильные банки с минералом группы гидрослюд – вермикулитом, гидратированным средой МС, не содержащей агар-агар и сахарозу. После укоренения черенков, растения высаживали в грунт и культивировали при 16-часовом световом дне при температуре 21°C. Для инфицирования клетками *P. atrosepticum* использовали растения возраста 3–4 недель. Растения картофеля были любезно предоставлены из НПО «Нива Татарстан» (г. Казань) к.б.н., с.н.с. С.Г. Вологиным.

Штамм *P. atrosepticum* SCRI1043 (*Pba*) [Bell et al., 2004] любезно предоставлен из коллекции микроорганизмов Белорусского государственного университета (г. Минск) доцентом Е.А. Николайчиком. Клетки бактерий выращивали в среде Luria-Bertani (LB). В качестве инокулята использовали культуры поздней логарифмической фазы в количестве, дающем начальную оптическую плотность клеточной суспензии 0,1 ОЕ [$\lambda = 600$ нм]. Культуры инкубировали в термостатируемом шейкере-инкубаторе IS-971R (JEIO TECH, Корея) при вращении платформы со скоростью 160 об/мин и температуре 28°C. Инфицирование растений проводили путем инъекции 25 мкл суспензии бактериальных клеток (титр $1-2 \times 10^7$) в среднюю часть стебля. К контрольным растениям таким же образом добавляли 25 мкл 0,4% раствора хлорида магния. Через 4–5 суток после инфицирования проводили выделение полисахаридов буфер-экстрагируемой фракции. При этом для инфицированных растений, проводили дифференциальный отбор в зависимости от симптомов заболевания: 1) некроз стебля или 2) увядание.

Для выделения буфер-экстрагируемой фракции полисахаридов растительные ткани растирали в жидком азоте. К гомогенату добавляли четыре объема Na/K-фосфатного буфера (50 мМ, рН 7,0), и полученную суспензию перемешивали в течение 3–5 минут. Супернатант, содержащий буфер-экстрагируемые полисахариды, отделяли центрифугированием в течение 10 минут при 8000 g при 4°C, и термостатировали при 100°C в течение 10 мин, после чего центрифугировали при тех же условиях. Из полученного супернатанта осаждали полисахариды добавлением четырех объемов 96% этилового спирта. Затем полисахариды буфер-экстрагируемой фракции трижды промывали 80% этанолом и растворяли в деионизированной воде перед нанесением на колонку.

Полученные фракции буфер-экстрагируемых полисахаридов хроматографировали на колонке с сефарозой CL-4B (Pharmacia, Швеция) (12×400 мм) при скорости 0,25 мл/мин; объем собираемых фракций составлял 1 мл. В качестве маркеров молекулярной массы использованы пуллуланы (P) массой 400, 200, 100 и 50 кДа. Количество углеводов в каждой фракции определяли фенольным методом по Дюбуа [Dubois et al., 1956].

Для определения моносахаридного состава отбирали фракции буфер-экстрагируемых полисахаридов, полученные после разделения на колонке с сефарозой CL-4B. После высушивания аликвот (соответствовавших 40 мкг углеводов) этих фракций, полученные осадки растворяли в 400 мкл 2 М трифторуксусной кислоты (ТФУ) и термостатировали при 120°C в течение 1 часа. После гидролиза образцы высушивали в токе воздуха при 60°C и растворяли в деионизированной воде. Разделение и определение моносахаридов проводили при помощи высокоэффективной анионообменной хроматографии (система DX-500, Dionex, США) на колонке CarboPac PA-1 (4×250 мм, Dionex, США) с использованием электрохимического детектора в режиме пульс-амперометрии (ED 40, Dionex, США). В качестве элюентов использовали: А – 0,015 М NaOH; В – 1 М NaOAc в 0,1 М NaOH. Хроматографию осуществляли при температуре колонки 30°C и скорости элюирования 1 мл/мин. Градиентное элюирование проводили следующим образом: 0–20 мин – 100% А; 21–31 мин – до соотношения элюентов А:В = 70:30%, после этого промывка и уравнивание колонки в режиме 100% В – 10 мин, 100% А – 30 мин. Количественную оценку содержания углеводов проводили с помощью калибровочных кривых для каждого из анализируемых соединений и программного обеспечения PeakNet. Анализ каждого образца проводили в двух повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для сравнения полисахаридов буфер-экстрагируемой фракции у контрольных и инфицированных *P. atrosepticum* растений картофеля (*S. tuberosum*) при развитии разных симптомов заболевания (мацерация тканей и увядание) проводили эксклюзионную хроматографию. Содержание полисахаридов в буфер-экстрагируемой фракции было больше в инфицированных растениях, чем в контрольных растениях (некроз 700 мкг, увядание 400 мкг и контроль 20 мкг на один грамм сырой массы растений). Для анализа моносахаридного состава фракцию буфер-экстрагируемых полисахаридов разделяли на 5 суб-фракций в зависимости от молекулярной массы (времени удерживания на колонке). Выбранные суб-фракции соответствовали объемам элюции 5–11 мл (фракция 1), 12–17 мл (фракция 2), 18–21 мл (фракция 3), 22–24 мл (фракция 4) и 25–35 (фракция 5) (рисунок).

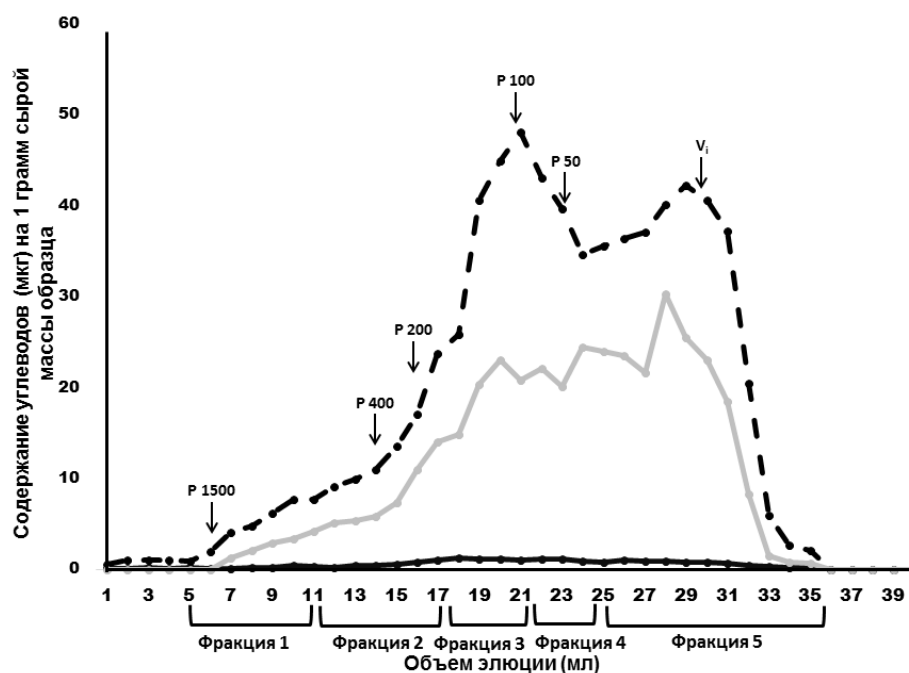


Рисунок. Профили элюции полисахаридов буфер-экстрагируемой фракции контрольных и инфицированных *Pectobacterium atrosepticum*. Черная сплошная линия контроль, серая линия- увядание, черная штрихованная линия – некроз. Образцы контрольных и инфицированных растений выровнены по сырой массе исходного материала. V_i – полный объем всех гранул колонки.

Во фракции 1 буфер-экстрагируемых полисахаридов, полученных из инфицированных растений с симптомами мацерации и увядания, которая включает полимеры, характеризующиеся временем выхода с колонки 5–11 мл, содержались нейтральные моносахариды (рамноза, арабиноза, галактоза, глюкоза); у инфицированных растений наиболее представленным моносахаридом при этом была глюкоза (17 моль%) (таблица). Фракция, полученная аналогичным образом из контрольных растений, не содержала детектируемого количества углеводов. Во фракциях 2–4 (таблица) присутствие рамнозы и галактуроновой кислоты в сходном количестве свидетельствует о том, что в составе указанных субфракций, как и в случае с инфицированными растениями табака, содержались фрагменты рамногалактуронана I. Кроме того, во фракции буфер-экстрагируемых полисахаридов клеточной стенки инфицированных растений наблюдалось

практически полное отсутствие ксилозы в отличие от контрольных растений, где она составляла 14 ± 2 моль%.

Во фракции 5 присутствие галактуроновой кислоты в большом количестве: некроз (53 моль%), увядание (62 моль%) и контроль (41 моль%) указывает на содержание в образцах полигалактуроновой кислоты – гомополимер, состоящий из остатков галактуроновой кислоты, соединенных α -1,4 типом связи [Горшкова, 2007].

С помощью проведенных анализов было показано, что не все пектиновые вещества растения-хозяина разрушаются *P. atrosepticum* до низкомолекулярных соединений. У растений картофеля при инфекции, вызванной *P. atrosepticum*, увеличивается содержание полисахаридов в буфер-экстрагируемой фракции по сравнению с контрольными растениями и часть пектиновых полисахаридов растительной клеточной стенки разрушается до высокомолекулярных продуктов и легко экстрагируется из гомогенатов тканей фосфатным буфером это означает, что, не имеют прочной связи с клеточной стенкой; доминирующая часть этих фрагментов представляет собой пектиновые вещества, а именно рамногалактуронан I и полигалактуронан.

Таблица. Доля моносахаридов (%) в различных субфракциях фракций клеточной стенки, экстрагируемых из буфера контрольных и инфицированных *P. atrosepticum* растений картофеля

Субфракция, объем элюции (мл)	Образец	Рам	Ара	Гал	Глю	Кси	ГалК	ГлюК
5–11	Некроз	18	15	33	17	1	15	3
	Увядание	22	24	36	1	0	15	1
	Контроль	13	26	16	0	9	37	0
12–17	Некроз	25	26	43	0	0	2	3
	Увядание	23	25	33	0	0	16	3
	Контроль	9	31	51	1	1	4	5
18–21	Некроз	24	25	31	0	0	17	3
	Увядание	26	25	31	0	0	16	2
	Контроль	10	22	40	6	16	7	0
22–24	Некроз	29	24	21	0	0	23	2
	Увядание	24	21	16	0	0	37	2
	Контроль	9	22	42	6	15	7	0
25–35	Некроз	15	16	12	1	1	53	1
	Увядание	12	12	11	1	1	62	2
	Контроль	2	11	20	6	15	41	5

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 19-34-90124. Культивирование бактерий *P. atrosepticum* проводилось при финансовой поддержке государственного задания Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горшкова Т.А. Растительная клеточная стенка как динамичная система: монография. Наука, 2007. 429 с.
2. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011. № 3. С. 99–109.
3. Atmodjo M.A., Hao Z., Mohnen D. Evolving views of pectin biosynthesis // Annual Review of Plant Biology. 2013. V. 64. P. 747–779. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105534>
4. Bell K.S., Sebaihia M., Pritchard L., et al. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors // Microbiology. 2004. V. 101. P. 11105–11110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402424101>
5. Bellincampi D., Cervone F., Lionetti V. Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant–pathogen interactions // Frontiers in Plant Science. 2014. V. 5 (228). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00228>
6. Cosgrove D.J. Growth of the plant cell wall // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2005. V. 6 (11). P. 850–861. <https://doi.org/10.1038/nrm1746>
7. Dou D., Zhou J.M. Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground // Cell Host & Microbe. 2012. V. 12 (4). P. 484–495. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.09.003>
8. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Analytical Chemistry. 1956. V. 28. P. 350–356.
9. De la Fuente-Núñez C., Reffuveille F., Fernández L., et al. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies // Current Opinion in Microbiology. 2013. V. 16 (5). P. 580–589. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.013>
10. García-Olmedo F., Rodríguez-Palenzuela P., Molina A., et al. Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxyxynitrite in plant defence // FEBS Lett. 2001. V. 498. P. 219–222. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02456-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02456-5)
11. Gorshkov V., Daminova A., Ageeva M., et al. Dissociation of a population of *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 in tobacco plants: formation of bacterial emboli and dormant cells // Protoplasma. 2014. V. 251 (3). P. 499–510. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0546-3>
12. Gorshkov V.Y., Daminova A.G., Mikshina P.V., et al. Pathogen-induced conditioning of the primary xylem vessels – a prerequisite for the formation of bacterial emboli by *Pectobacterium atrosepticum* // Plant Biology. 2016. V. 18 (4). P. 609–617. <https://doi.org/10.1111/plb.12448>
13. Gorshkov V., Islamov B., Mikshina P., et al. *Pectobacterium atrosepticum* exopolysaccharides: identification, molecular structure, formation under stress and in planta conditions // Glycobiology. 2017. V. 27 (11). P. 1016–1026. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwx069>
14. Hematy K., Cherk C., Somerville S. Host–pathogen warfare at the plant cell wall // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. P. 406–413. doi: 10.1016/j.pbi.2009.06.007
15. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Shevchik V. Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity // Environmental Microbiology Reports. 2014. V. 6 (5). P. 427–440. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12166>

16. Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., et al. Bacterial biofilm and associated infections // Journal of the Chinese Medical Association. 2018. V. 81 (1). P. 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
17. Kämper J., Kahmann R., Bölker M., et al. Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis* // Nature. 2006. V. 444 (7115). P. 97–101. <https://doi.org/10.1038/nature05248>
18. Miedes E., Vanholme R., Boerjan, W., et al. The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens // Frontiers in Plant Science. 2014. V. 5. 358. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00358>
19. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. P. 473–497.
20. Savoia D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics // Future Microbiology. 2012. V. 7 (8). P. 979–990. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.68>
21. Schulze-Lefert P. Knocking on the heaven’s wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall // Curr. Opin. Plant Biol. 2004. V. 7 (4). P. 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.05.004>
22. Toth I.K., Birch P.R. Rotting softly and stealthily // Current Opinion in Plant Biology. 2005. V. 8 (4). P. 424–429. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.04.001>
23. Underwood W. The plant cell wall: a dynamic barrier against pathogen invasion // Frontiers in Plant Science. 2012. V 3. 85. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00085>
24. Vorwerk S., Somerville S., Somerville C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in plant disease resistance // Trends Plant Sci. V. 2004. V. 9 (4). P. 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.02.005>