СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2019, том 54, № 3, с. 566-574

Фитопатология

УДК 632.3.01/.08:577.15 doi: 10.15389/agrobiology.2019.3.566rus

ФЕРМЕНТЫ ДЕГРАДАЦИИ РАМНОГАЛАКТУРОНАНА I КАК ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ ФИТОПАТОГЕННОЙ БАКТЕРИИ *Pectobacterium atrosepticum*[*]

Е.А. КОВТУНОВ[1], В.Ю. ГОРШКОВ[2, 3], Н.Е. ГОГОЛЕВА[2, 3], О.Е. ПЕТРОВА[2], Е.В. ОСИПОВА[2], Ч.Б. НУРИАХМЕТОВА[3], С.В. ТАТАРКИН[2], Ю.В. ГОГОЛЕВ[2, 3]

Фитопатогенные пектобактерии (род *Pectobacterium*) известны как возбудители мягких (мокрых) гнилей. Симптомы мягких гнилей связаны с обширной мацерацией растительных тканей вследствие продукции микроорганизмами ферментов, разрушающих компоненты растительных клеточных стенок. Большинство ферментов, секретируемых пектобактериями, катализируют расщепление гомогалактуронана. Этот полисахарид, представляющий собой линейный гомополимер, состоит из остатков галактуроновой кислоты и является основным (по массе) пектиновым полисахаридом растительных клеточных стенок. Известно, что нокаут генов ферментов деградации гомогалактуронана приводит к снижению вирулентности пектобактерий. В то же время при инфекции, вызываемой пектобактериями, происходит модификация другого типа пектинов — рамногалактуронана I. Это разветвленный гетерополимер, остов которого построен из чередующихся остатков рамнозы и галактуроновой кислоты, а боковые цепи — из остатков галактозы или арабинозы. Однако роль пектобактериальных ферментов, разрушающих рамногалактуронан I, в развитии мягких гнилей не выявлена. Цель настоящей работы заключалась в проверке необходимости ферментов *P. atrosepticum* SCRI1043, разрушающих рамногалактуронан I, для полноценного развития мягких гнилей в растениях, инфицированных пектобактериями. С помощью направленного мутагенеза мы получили мутантные формы *P. atrosepticum* SCRI1043 по генам, кодирующим ферменты, расщепляющие рамногалактуронан I. В качестве целевых для нокаута были выбраны гены, кодирующие рамногалактуронил гидролазу (геномный локус *eca3749*), расщепляющую остов рамногалактуронана I, и галактаназу (геномный локус *eca0852*), отщепляющую боковые цепи этого полимера. Для нокаута целевых генов конструировали мутантные локусы с помощью ПЦР по методу перекрывающегося сплайсинг-расширения. Большую часть кодирующей области гена удаляли, а на ее место встраивали кассету устойчивости к канамицину. Полученную конструкцию лигировали в суицидный мобилизуемый вектор pKNG101, и сконструированную таким образом плазмиду переносили в клетки донорного штамма *Escherichia coli* CC118. Рекомбинантную плазмиду с мутантным локусом вводили в клетки *P. atrosepticum* SCRI1043, используя трехродительское скрещивание. Клоны *P. atrosepticum* SCRI1043, в которых проходила замена исходного локуса на мутантный и элиминация донорной плазмиды, отбирали на селективных средах. Мутантные по локусам ECA3749 и ECA0852 штаммы *P. atrosepticum* приводили к значительно менее интенсивному повреждению тканей растений пекинской капусты (*Brassica rapa* spp. *pekinensis*) сорта Cha Cha по сравнению с родительским штаммом дикого типа. При этом наименьшую вирулентность проявлял штамм, мутантный по локусу *eca0852*, кодирующему галактаназу — фермент, расщепляющий боковые цепи рамногалактуронана I. Снижение вирулентности при этом не было связано с подавлением активности ферментов, расщепляющих гомогалактуронан, или с меньшей подвижностью бактерий. Таким образом, ферменты деградации рамногалактуронана I могут быть отнесены к факторам вирулентности фитопатогенных пектобактерий, а гидролиз боковых цепей рамногалактуронана I вносит больший вклад в процесс мацерации тканей, чем разрушение остова полимера.

Ключевые слова: *Pectobacterium atrosepticum*, пектиновые полисахариды, рамногалактуронан I, гликозил-гидролазы.

Представители рода *Pectobacterium* — одни из наиболее вредоносных фитопатогенов в мире (1). Эти микроорганизмы вызывают у растений заболевания, названные мягкими, или мокрыми, гнилями (2, 3). Ключевыми детерминантами патогенности пектобактерий считаются экстраклеточные ферменты, расщепляющие полисахариды клеточной стенки, из которых наиболее разнообразны ферменты, разрушающие полигалактуроновую кислоту (гомогалактуронан). Этот полимер, содержащийся в основном в срединных пластинках, — самый представленный пектиновый полисаха-

[*] Работа частично поддержана грантом Российского научного фонда (№ 15-14-10022).

рид растительных клеточных стенок (4). Его деструкция при развитии инфекции приводит к мацерации тканей (2, 3, 5). В многочисленных исследованиях продемонстрировано, что мутантные формы пектобактерий, у которых секреция ферментов, разрушающих полигалактуронан, отсутствует или снижена, не способны вызывать симптомы мягких гнилей (6-8).

Наряду с генами, кодирующими ферменты деструкции гомогалактуронана, в геноме пектобактерий присутствуют гены ферментов деградации другого пектинового полисахарида — рамногалактуронана I (РГУ I). В отличие от гомогалактуронана (линейного гомополимера, состоящего из остатков галактуроновой кислоты), РГУ I — это разветвленный гетерополимер. Его остов представляет собой чередующиеся остатки рамнозы и галактуроновой кислоты, а боковые цепи, присоединенные к рамнозе, состоят из галактозы или арабинозы (4).

В наших предыдущих исследованиях было показано, что РГУ I играет важную роль в колонизации пектобактериями сосудов первичной ксилемы, где микроорганизмы формируют особые биопленкоподобные многоклеточные структуры, которые мы назвали бактериальными эмболами (9). В отличие от биопленок, в которых внеклеточный матрикс представлен в основном бактериальными экзополисахаридами (10-12), первичный матрикс бактериальных эмболов формируется из РГУ I (13). Этот полимер высвобождается из растительных клеточных стенок в результате восприимчивого ответа растений и формирует своеобразный микрокосм для сборки бактериальных эмболов. По мере созревания бактериального эмбола РГУ I в составе внеклеточного матрикса замещается экстраклеточными полисахаридами пектобактерий (14). Это свидетельствует о динамичном преобразовании РГУ I при развитии инфекции. Однако для пектобактерий роль ферментов деградации РГУ I в патогенезе ранее не была продемонстрирована.

Мы впервые установили, что разрушение РГУ I в процессе инфекции вносит значительный вклад в развитие симптомов мягких гнилей, вызываемых *Pectobacterium atrosepticum*.

Цель настоящего исследования — проверка необходимости присутствия ферментов, разрушающих РГУ I, для развития мягких гнилей в растениях, инфицированных пектобактериями.

Методика. Штамм *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (ранее *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* SCRI1043) (15) (коллекция Белорусского государственного университета; любезно предоставлен Е.А. Николайчиком), *Escherichia coli* и штаммы, мутантные по локусам *eca0852* (Δeca0852) и *eca3749* (Δeca3749), выращивали при 28 °C в среде Luria-Bertani (LB) (16), содержащей 10 г/л пептона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л NaCl, pH 7,5. При необходимости добавляли антибиотики канамицин (30 мкг/мл), стрептомицин (100 мкг/мл), тетрациклин (12,5 мкг/мл).

Поиск последовательностей целевых ферментов осуществляли с помощью алгоритма BLASTp в банках данных PDB (Protein Data Bank Europe, https://www.ebi.ac.uk/pdbe/) и UniProt (https://sparql.uniprot.org/). Филогенетическое древо строили методом ближайшего соседа; бутстрэп-поддержка указана у ветвей дерева. Молекулярно-филогенетический анализ выполняли в программе MEGA 6.0 (https://www.megasoftware.net/). Биохимическое описание ферментов заимствовали из базы данных CAZy (Carbohydrate-Active enZyme, http://www.cazy.org/).

Мутантный локус для нокаута генов *eca0852* и *eca3749* конструировали с помощью ПЦР по методу перекрывающегося сплайсинг-расширения. Большую часть кодирующей области гена удаляли, а на ее место в

качестве маркера для селекции мутантных клеток встраивали кассету устойчивости к канамицину. Полученную конструкцию лигировали в суицидный мобилизуемый вектор pKNG101 (любезно предоставлен профессором L.N. Moleleki, университет Претории, ЮАР), и сконструированную таким образом плазмиду переносили в клетки донорного штамма *E. coli* CC118 при помощи электропорации. Рекомбинантный мутантный локус в составе полученной плазмиды вводили в клетки *P. atrosepticum* SCRI1043, используя трехродительское скрещивание. Клетки, получившие рекомбинантную плазмиду, отбирали на среде со стрептомицином и канамицином. Затем клетки, в которых прошел второй акт рекомбинации, сопряженный с заменой целевого гена и элиминацией донорной плазмиды, селектировали на среде с сахарозой. После этого отбирали клоны, устойчивые к канамицину и чувствительные к стрептомицину. Мутацию верифицировали с помощью ПЦР и определяли нуклеотидную последовательность мутантного локуса, как описано ранее (8).

Анализ мутантных форм пектобактерий на вирулентность проводили, оценивая массу пораженных (мацерированных) тканей листьев пекинской капусты (*Brassica rapa* spp. *Pekinensis*) сорта Cha Cha, инокулированных микроорганизмами. Клетки пектобактерий выращивали в среде LB до поздней логарифмической фазы роста, после чего собирали центрифугированием и ресуспендировали в 10 мМ растворе сульфата магния, менее стрессогенном для растений, чем хлорид натрия (17). Плотность инокулята доводили до 1×10^7-3×10^7 КОЕ/мл серийными разведениями. Поверхность листьев стерилизовали отбеливателем «Белизна» (содержание активного хлора 0,8 %) и 70 % раствором этанола. Затем листья промывали стерильной водой и делали небольшие надрезы, в которые вносили 10 мкл бактериальных суспензий (1×10^5-3×10^5 КОЕ/мл) или стерильного раствора сульфата магния. Инфицированные таким образом листья помещали в чашку Петри и инкубировали при 28 °C в течение 48 ч. Мацерированные ткани растения извлекали скальпелем и взвешивали. Результаты, полученные как минимум в 10 биологических повторностях, визуализировали в виде бокс-плотов, простроенных с помощью графического пакета ggplot2 (https://ggplot2.tidyverse.org/). Для измерения пектатлиазной активности бактериальные клетки выращивали в синтетической среде D5 следующего состава, содержащей пектин в качестве единственного источника углерода: 13,6 г/л KH_2PO_4, 1,0 г/л NH_4Cl, 0,3 г/л $MgSO_4$ (добавляли в виде 100× стокового раствора после стерилизации), 1,4 г/л NaOH, 2 г/л пектина, pH 7,5.

Пектатлиазную активность определяли по ранее описанной методике (18). Бесклеточный супернатант культур (50 мкл), выращенных в среде D5 в течение 24 ч при 28 °C в термостатируемом шейкере-инкубаторе (Orbi Safe, «Sanyo», Япония) при 160 об/мин смешивали с 450 мкл реакционной смеси (pH 8,5), содержащей 50 мМ Трис-HCl, 0,1 мМ $CaCl_2$ и 0,05 % полигалактуроновой кислоты, инкубировали при 37 °C в течение 5 мин и оценивали возрастание поглощения при λ = 235 нм на спектрофотометре Solar PB2201B (ЗАО «СОЛАР», Беларусь). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего превращение 1 мкМ субстрата за 1 мин. Удельную активность выражали в ед/мг белка.

Способность к роению оценивали при выращивании пектобактерий в полужидкой среде D5, содержащей 0,4 % микробиологического агара Pronadisa («Laboratorios CONDA, S.A.», Испания) и 2 г/л сахарозы или пектина. В полужидкий агар вносили 3 мкл культуры бактерий на ранней стационарной фазе роста, инкубировали при 28 °C и через 24 ч измеряли диаметр макроколоний.

Статистический анализ проводили с помощью стандартных математических методов (расчет средней *M* и среднеквадратического отклонения ±σ, сравнение средних по *t*-критерию Стьюдента) в программе Microsoft Excel 2000. Для визуализации значений массы мацерированных тканей использовали пакет ggplot2, уровень достоверности различий (p-значение) рассчитывали с помощью непараметрического теста Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Использованные штаммы бактерий, плазмиды и праймеры охарактеризованы в таблице 1.

1. Штаммы, плазмиды и праймеры, использованные для создания мутантных штаммов *Pectobacterium atrosepticum* (*Pba*), дефектных по генам, кодирующим рамногалактуронил гидролазу и галактаназу

Название	Описание
	Штаммы
Pectobacterium atrosepticum SCRI1043	Дикий тип (15)
SCRI1043Δ*3749*	Мутант штамма SCRI1043 со вставкой кассеты устойчивости к Km в хромосоме
SCRI1043Δ*0852*	Мутант штамма SCRI1043 со вставкой кассеты устойчивости к Km в хромосоме
Escherichia coli CC118	Хозяин для суицидного вектора pKNG101 (*ara*, *leu*) *araD lacX* 74 *galE galK PhoA20 thi*-1 *rpsE rpoB argE (am) recA1*, Sm^R (19)
HH26/pNJ5000	Мобилизующий штамм для конъюгативного переноса суицидного вектора pKNG101 в клетки *Pba*, Tet^R (20)
	Плазмиды
pKD4	Матрица для ПЦР-амплификации кассеты устойчивости к канамицину, Km^R (21)
pKNG101	Суицидный мобилизуемый вектор для инактивации целевых генов, *pir*-ori R6K mobRK2 *sacB* Sm^R (22)
pKNG101Δ*3749*	Km^R, Sm^R, *sacB*, содержит регион хромосомной ДНК *Pba* с делетированным геном *eca3749*
pKNG101Δ*0852*	Km^R, Sm^R, *sacB*, содержит регион хромосомной ДНК *Pba* с делетированным геном *eca0852*
	Праймеры
upECA3749_F	5′-GCATGTTGACCGAGCTGTCC-3′
upECA3749_KmR	5′-GCCTACACAATCCGACTTCCCAATCCCACTCTTC-3′
dnECA3749_KmF	5′-CCCATGTCAGCCGTTAAGCGATATTCCCAATGTTGCCG-3′
dnECA3749_R	5′-CATGTCCCATCATTTCGCAAC-3′
Km3749_F	5′-GATTGGGAAGTCGGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3′
Km3749_R	5′-GGAATATCGCTTAACGGCTGACATGGGAATTAGC-3′
chek 3749_F	5′-GTTGCGGTTGGCACGATGG-3′
chek 3749_R	5′-CGAACAGATGGCAATACGTCGG-3′
upECA0852_F	5′-CTAAAGTGTTCTTATTCGATGAGCCC-3′
upECA0852_KmR	5′-CATGTCAGCCGTTAAGTGCTTTACCCAACCAATATCCG-3′
dnECA0852_KmF	5′-CCTACACAATCGCAAATTCTCCAAATGTATAACACCG-3′
dnECA0852_R	5′-CGTCCACTTTCTTACGCCCTC-3′
Km0852_F	5′-GGGTAAAGCACTTAACGGCTGACATGGGAATTAGC-3′
Km0852_R	5′-CATTTGGAGAATTTGCGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3′
chek 0852_F	5′-GTGTTGCGATTGGGCGGG-3′
chek 0852_R	5′-GTCTGTCGGTAACCAAAGAAAAGCG-3′

Примечание. В индексах праймеров символы ECA3749 и ECA0852 обозначают локусы генов соответственно рамногалактуронил-гидролазы и галактоназа; F и R — соответственно прямой и обратный праймеры. Символ up соответствует амплификации участка выше предполагаемой делеции, dn — участка, следующего после удаляемого фрагмента. Символом Km обозначено добавление начального (F) или конечного (R) фрагмента кассеты канамициновой устойчивости плазмиды pKD4, расположенного с 5′-конца праймера (в начале индекса) или в 3′-конце праймера (в конце индекса). Праймеры chek инициируют амплификацию с проксимального и дистального участков интересующего локуса для определения его размера и секвенирования. Подробная схема эксперимента описана ранее K.A. Datsenko с соавт. (21).

Согласно аннотации, представленной в базах данных CAZy и UniProt, в геноме *P. atrosepticum* SCRI1043 присутствует 8 генов, кодирующих ферменты, которые разрушают РГУ I. Экспрессия этих генов повышается при колонизации пектобактериями растений-хозяев (23). Для нокаута генов, кодирующих ферменты деградации РГУ I, были выбраны геномные локусы *eca3749* и *eca0852 P. atrosepticum*, один из которых кодирует фермент, расщепляющий остов РГУ I, а второй — боковые цепи. Последовательность первого локуса аннотирована как кодирующая рамногалактуро-

нил-гидролазу — фермент, разрушающий остов РГУ I. Согласно аннотации, *eca0852* кодирует галактаназу, расщепляющую боковые цепи РГУ I. С помощью филогенетического анализа подтверждено, что целевые ферменты ECA3749 и ECA0852 были близки к группам белков соответственно с рамногалактуронил-гидролазной и галактаназной активностью (рис. 1).

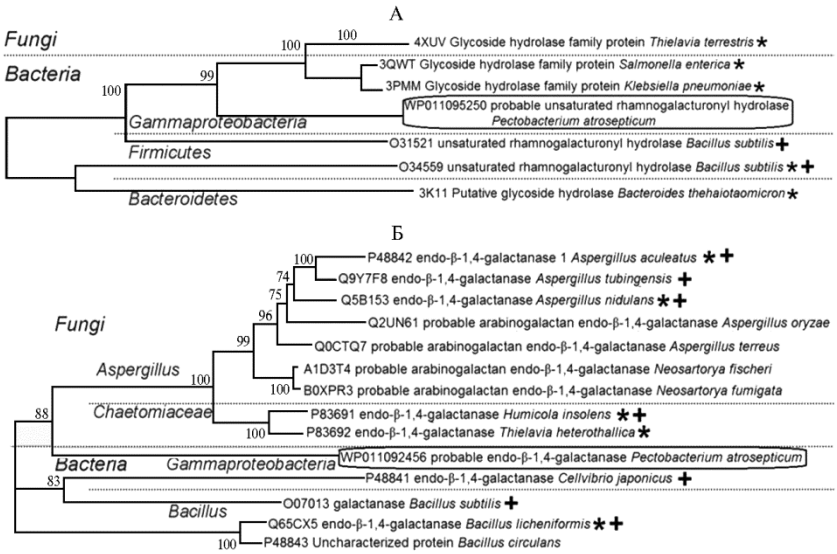

Рис. 1. Кладограммы аминокислотных последовательностей, наиболее схожих с рамногалактуронил-гидролазой *Pectobacterium atrosepticum* (ECA3749, WP011095250) (А) **и β-1,4-эндогалактаназой *P. atrosepticum* (ECA0852, WP011092456)** (Б): «+» — белки с известными биохимическими характеристиками, «*» — белки, для которых в литературе имеются данные рентгеноструктурного анализа.

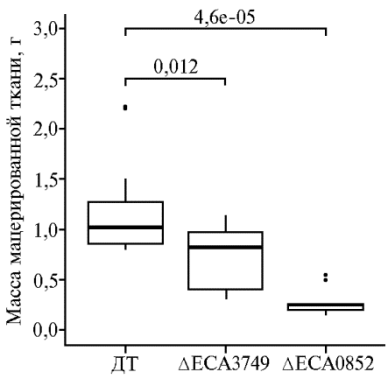

Рис. 2. Бокс-плоты, отображающие распределение значений массы мацерированных тканей в листьях пекинской капусты (*Brassica rapa* spp. *Pekinensis*) сорта Cha Cha, инокулированных диким штаммом *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 (ДТ) **и его формами, мутантными по геномным локусам *eca3749* и *eca0852*, которые кодируют соответственно рамногалактуронил-гидролазу и галактаназу.** Темной горизонтальной линией внутри бокс-плота обозначено медианное значение массы мацерированной ткани, верхняя и нижняя граница отображают 1-й и 3-й квартили распределения проанализированных значений варианта, вертикальные линии — крайние значения, лежащие в пределах полутора межквартильных размахов; черные точки — значения, которые выходят за пределы полутора межквартильных размахов. Над скобками, объединяющими бокс-плоты, приведены достоверности различий, рассчитанные с помощью непараметрического теста Вилкоксона.

Хромосомные мутанты *P. atrosepticum*, дефектные по генам *eca0852* и *eca3749*, были сконструированы посредством аллельного обмена с использованием суицидного вектора pKNG101 по ранее описанному протоколу (8). Чтобы оценить влияние целевых мутаций на способность *P. atrosepticum* вызывать мацерацию растительных тканей, листья пекинской капусты инокулировали дикой и мутантными формами пектобактерий. Масса мягкой гнили, производимой этими штаммами в течение 48 ч, различалась (рис. 2). Оба мутанта мацерировали растительную ткань значительно менее интенсивно, чем бактерии дикого типа. При этом мутация в гене, кодирующем галактаназу ECA0852, оказывала значительно больший эффект (см.

рис. 2). По всей вероятности, причина в том, что гидролиз боковых цепей РГУ I вносит больший вклад в процесс мацерации тканей, чем разрушение остова полимера. На листьях, инокулированных стерильным 10 мМ раствором хлорида магния, симптомов мацерации тканей не отмечали.

Возможное влияние мутаций в локусах *eca3749* и *eca0852* на активность ключевых факторов вирулентности — пектатлиаз (24), а также подвижность микроорганизмов, служащую критерием их вирулентности (25-28), было проанализировано с применением соответствующих тестовых систем. В культурах in vitro при использовании пектина в качестве единственного источника углерода экстраклеточная пектатлиазная активность у обеих мутантных форм не отличалась от таковой у дикого типа (рис. 3). При анализе роения микроорганизмов, которое обеспечивает системное распространение пектобактерий по растительным тканям, способствуя расширению зоны мягкой гнили (25), мы также не обнаружили различий между дикой и мутантными формами *P. atrosepticum*. В полужидких синтетических средах, содержащих либо сахарозу, либо полигалактуроновую кислоту, оба мутантных штамма и дикая форма распространялись с одинаковой скоростью (табл. 2). Все это означает, что снижение вирулентности штаммов, мутантных по геномным локусам *eca3749* и *eca0852*, не связано со снижением подвижности микроорганизмов и способности к разрушению гомогалактуронана.

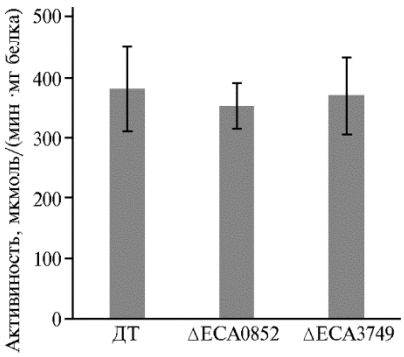

Рис. 3. Пектатлиазная активность в супернатантах культур *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 дикого типа (ДТ) **и мутантных форм с инактивированными геномными локусами *eca0852*** (инактивирован фермент ECA0852) **и *eca3749*** (инактивирован фермент ECA3749)**, которые кодируют соответственно галактаназу и рамногалактуронил-гидролазу.**

Хотя РГУ I — менее представленный полимер во фракции пектинов по сравнению с полигалактуроновой кислотой (4), наши эксперименты указывают на важность его разрушения для развития мягких гнилей, вызываемых *P. atrosepticum*. Во-первых, это может быть связано с тем, что благодаря преобразованию РГУ I обеспечивается формирование своеобразного экстраклеточного матрикса для пектобактерий (13). Во-вторых, несмотря на то, что инактивация целевых локусов не приводила in vitro к снижению способности микроорганизмов разрушать гомогалактуронан (рис. 2), в системе in planta, где разные типы пектиновых веществ могут представлять собой домены одной молекулы (29), неспособность разрушать РГУ I может сделать определенные участки гомогалактуронана недоступными для пектобактериальных ферментов.

2. Подвижность дикого штамма *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 и штаммов, мутантных по геномным локусам *eca3749* и *eca0852* (0,4 % агар)

Штамм	Диаметр колоний на средах, мм ($M \pm \sigma$)	
	сахароза	полигалактуроновая кислота
SCRI1043	22±0,5	22±0,2
Δ*eca3749*	22±0,5	24±0,6
Δ*eca0852*	23±0,3	23±0,4

Таким образом, мы продемонстрировали, что инактивация генов ферментов катаболизма рамногалактуронана I (РГУ I) снижает способность пектобактерий вызывать симптомы мягких гнилей у растений. При этом разрушение боковых цепей этого полимера, по всей видимости, вносит больший вклад в процесс мацерации тканей хозяина, чем гидролиз

остова, поскольку мутант по гену галактаназы характеризовался меньшей вирулентностью не только по сравнению с родительским штаммом дикого типа, но и с мутантом по гену рамногалактуронил-гидролазы. Полученные нами результаты позволяют отнести ферменты деградации РГУ I к факторам вирулентности фитопатогенных пектобактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S.V.,. Machado M.A., Toth I., Salmond G., Foster G.D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.*, 2012, 13(6): 614-629 (doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x).
2. Perombelon M.C.M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. *Plant Pathol.*, 2002, 51(1): 1-12 (doi: 10.1046/j.0032-0862.2001.Short%20title.doc.x).
3. Charkowski A., Blanco C., Condemine G., Expert D., Franza T., Hayes C., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Solanilla E.L., Low D., Moleleki L., Pirhonen M., Pitman A., Perna N., Reverchon S., Rodríguez Palenzuela P., Francisco M.S., Toth I., Tsuyumu S., van der Waals J., Van der Wolf J., Gijsegem F.V., Yang C.-H., Yedidia I. The role of secretion systems and small molecules in soft-rot *Enterobacteriaceae* pathogenicity. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2012, 50: 21.1-21.25 (doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-173013).
4. Горшкова Т.А. *Растительная клеточная стенка как динамичная система.* М., 2007 (ISBN 978-5-02-035598-9).
5. Tarasova N., Gorshkov V., Petrova O., Gogolev Y. Potato signal molecules that activate pectate lyase synthesis in *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043. *World J. Microbl. Biot.*, 2013, 29(7): 1189-1196 (doi: 10.1007/s11274-013-1281-9).
6. Walker D.S., Reeves P.J., Salmond G.P.C. The major secreted cellulase, CelV, of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* is an important soft rot virulence factor. *Mol. Plant Microbe In.*, 1994, 7(3): 425-431 (doi: 10.1094/MPMI-7-0425).
7. Mäe A., Heikinheimo R., Tapio Palva E. Structure and regulation of the *Erwinia carotovora* subspecies *carotovora* SCC3193 cellulase gene *celV1* and the role of cellulase in phytophatogenicity. *Mol. Gen. Genet.*, 1995, 247(1): 17-26 (doi: 10.1007/BF00425817).
8. Moleleki L.N., Pretorius R.G., Tanui C.K., Mosina G., Theron J. A quorum sensing-defective mutant of *Pectobacterium atrosepticum* ssp. *brasiliense* 1692 is attenuated in virulence and unable to occlude xylem tissue of susceptible potato plant stems. *Mol. Plant Pathol.*, 2017, 18(1): 32-44 (doi: 10.1111/mpp.12372).
9. Gorshkov V., Daminova A., Ageeva M., Petrova O., Gogoleva N., Tarasova N., Gogolev Y. Dissociation of a population of *Pectobacterium atrosepticum* SCRI1043 in tobacco plants: formation of bacterial emboli and dormant cells. *Protoplasma*, 2014, 251(3): 499-510 (doi: 10.1007/s00709-013-0546-3).
10. Donlan R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.*, 2002, 8(9): 881-890 (doi: 10.3201/eid0809.020063).
11. Izano E.A., Amarante M.A., Kher W.B., Kaplan J.B. Differential roles of poly-N-glucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl. Environ. Microb.*, 2008, 74(2): 470-476 (doi: 10.1128/AEM.02073-07).
12. Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010, 8: 623-633 (doi: 10.1038/nrmicro2415).
13. Gorshkov V.Y., Daminova A.G., Mikshina P.V., Petrova O.E., Ageeva M.V., Salnikov V.V., Gorshkova T.A., Gogolev Y. V. Pathogen-induced conditioning of the primary xylem vessels — a prerequisite for the formation of bacterial emboli by *Pectobacterium atrosepticum*. *Plant Biology*, 2016, 18(4): 609-617 (doi: 10.1111/plb.12448).
14. Gorshkov V., Islamov B., Mikshina P., Petrova O., Burygin G., Sigida E., Shashkov A., Daminova A., Ageeva M., Idiyatullin B., Salnikov V., Zuev Y., Gorshkova T., Gogolev Y. *Pectobacterium atrosepticum* exopolysaccharides: identification, molecular structure, formation under stress and *in planta* conditions. *Glycobiology*, 2017, 27(11): 1016-1026 (doi: 10.1093/glycob/cwx069).
15. Bell K.S., Sebaihia M., Pritchard L., Holden M.T.G., Hyman L.J., Holeva M.C., Thomson N.R., Bentley S.D., Churcher L.J., Mungall K., Atkin R., Bason N., Brooks K., Chillingworth T., Clark K., Doggett J., Fraser A., Hance Z., Hauser H., Jagels K., Moule S., Norbertczak H., Ormond D., Price C., Quail M.A., Sanders M., Walker D., Whitehead S., Salmond G.P.C., Birch P.R.J., Parkhill J., Toth I.K. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors. *PNAS USA*, 2004, 101(30): 11105-11110 (doi: 10.1073/pnas.0402424101).
16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed.* Cold Spring Harbor, NY, 1989.

17. Lee M.K., van Iersel M. W. Sodium chloride effects on growth, morphology, and physiology of *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium*). *HortScience*, 2008, 43(6): 1888-1891.
18. Shevchik V.E., Robert-Baudoy J., Hugouvieux-Cotte-Pattat N. Pectat lyase PelI of *Erwinia chrysanthemi* belongs to a new family. *J. Bacteriol.*, 1997, 179(23): 7321-7330 (doi: 10.1128/jb.179.23.7321-7330.1997).
19. Herrero M., de Lorenzo V., Timmis K.N. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.*, 1990, 172(11): 6557-6567 (doi: 10.1128/jb.172.11.6557-6567.1990).
20. Grinter N.J. A broad-host-range cloning vector transposable to various replicons. *Gene*, 1983, 21(1-2): 133-143 (doi: 10.1016/0378-1119(83)90155-5).
21. Datsenko K.A., Wanner B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS USA*, 2000, 97(12): 6640-6645 (doi: 10.1073/pnas.120163297).
22. Kaniga K., Delor I., Cornelis G.R. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene*, 1991, 109(1): 137-141 (doi: 10.1016/0378-1119(91)90599-7).
23. Gorshkov V., Gubaev R., Petrova O., Daminova A., Gogoleva N., Ageeva M., Parfirova O., Prokchorchik M., Nikolaichik Y., Gogolev Y. Transcriptome profiling helps to identify potential and true molecular switches of stealth to brute force behavior in *Pectobacterium atrosepticum* during systemic colonization of tobacco plants. *European Journal of Plant Pathology*, 2018, 152(4): 957-976 (doi: 10.1007/s10658-018-1496-6).
24. Robert-Baudouy J., Nasser W., Condemine G., Reverchon S., Shevchik V.E., Hugouvieux-Cotte-Pattat N. *Pectic enzymes of Erwinia chrysanthemi, regulation and role in pathogenesis.* The American Phytopathological Society, St. Paul, 2000.
25. Matsumoto H., Umehara M., Muroi H., Yoshitake Y., Tsuyumu S. Homolog of FlhDC, a master regulator for flagellum synthesis: required for pathogenicity in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Gen. Plant Pathol.*, 2003, 69: 189-193 (doi: 10.1007/s10327-002-0029-4).
26. Hossain M.M., Shibata S., Aizawa S.I., Tsuyumu S. Motility is an important determinant for pathogenesis of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Physiol. Mol. Plant P.*, 2005, 66(4): 134-143 (doi: 10.1016/j.pmpp.2005.06.001).
27. Duan Q., Zhou M., Zhu L., Zhu G. Flagella and bacterial pathogenicity. *J. Basic Microb.*, 2013, 53(1): 1-8 (doi: 10.1002/jobm.201100335).
28. Pfeilmeier S., Saur I. M, Rathjen J. P., Zipfel C., Malone J. G. High levels of cyclic-di-GMP in plant-associated *Pseudomonas* correlate with evasion of plant immunity. *Mol. Plant Pathol.*, 2016, 17(4): 521-531 (doi: 10.1111/mpp.12297).
29. Harholt J., Suttangkakul A., Vibe Scheller H. Biosynthesis of pectin. *Plant Physiol.*, 2010, 153: 384-395 (doi: 10.1104/pp.110.156588).

[1]ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики,
Лаборатория SCAMT (Solution Chemistry of Advanced Materials and Technologies),
191002 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9,
e-mail: kovtunovea@mail.ru;
[2]ФГБУН Казанский институт биохимии и биофизики — подразделение ФИЦ Казанский научный центр РАН,
420111 Россия, Республика Татарстан, г. Казань, 111, а/я 30,
e-mail: gogolev.yuri@gmail.com ✉, gvy84@mail.ru, negogoleva@gmail.com, poe60@mail.ru, eva-0@mail.ru, tatarkins@gmail.com;
[3]ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет,
420008 Россия, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Кремлевская, 18,
e-mail: ch_nuriakhmetova@mail.ru

Поступила в редакцию 6 ноября 2017 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2019, V. 54, № 3, pp. 566-574

ENZYMES FOR THE DEGRADATION OF RHAMNOGALACTURONAN I AS VIRULENCE FACTORS OF PHYTOPATHOGENIC BACTERIUM *Pectobacterium atrosepticum*

E.A. Kovtunov[1], V.Yu. Gorshkov[2, 3], N.E. Gogoleva[2, 3], O.E. Petrova[2], E.V. Osipova[2], Ch.B. Nuriakhmetova[3], S.V. Tatarkin[2], Yu.V. Gogolev[2, 3]

[1]ITMO University, SCAMT laboratory, 9, ul. Lomonosova, St. Petersburg, 191002 Russia, e-mail kovtunovea@mail.ru;

[2]*Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, Federal Research Center Kazan Scientific Center RAS,* PO box 30, Kazan, Republic of Tatarstan, 420111 Russia, e-mail gogolev.yuri@gmail.com (✉ corresponding author), gvy84@mail.ru, negogoleva@gmail.com, poe60@mail.ru, eva-0@mail.ru, tatarkins@gmail.com;
[3]*Kazan (Volga region) Federal University,* 18, ul. Kremlyovskaya, Kazan, Republic of Tatarstan, 420008 Russia, e-mail ch_nuriakhmetova@mail.ru
ORCID:
Kovtunov E.A. orcid.org/0000-0002-3506-080X
Gorshkov V.Yu. orcid.org/0000-0002-9577-2032
Gogoleva N.E. orcid.org/0000-0003-2404-1539
Petrova O.E. orcid.org/0000-0003-1618-5479
Osipova E.V. orcid.org/0000-0002-8203-9798
Nuriakhmetova Ch.B. orcid.org/0000-0002-8626-0780
Tatarkin S.V. orcid.org/0000-0002-2422-0476
Gogolev Yu.V. orcid.org/0000-0002-2391-2980
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
Supported financially in part by Russian Science Foundation (project No. 15-14-10022)
Received November 6, 2017 doi: 10.15389/agrobiology.2019.3.566eng

Abstract

Plant pathogenic pectobacteria (*Pectobacterium* genus) are well-known all over the world as the causal agents of the cultural plant diseases called soft rots. Rot symptoms are related to the extensive plant tissue maceration due to the production by microorganisms of the plant cell wall degrading enzymes. Most of the pectobacteria-secreted enzymes catalyze the cleavage of homogalacturonan. This polysaccharide, that is a linear homopolymer, consists of galacturonic acid residues and is the most abundant (by mass) pectic polysaccharide of plant cell walls. The knockout of genes of homogalacturonan-degrading enzymes is known to lead to reduced virulence of pectobacteria. In addition, the modification of another pectic compound — rhamnogalacturonan I also occurs in the course of infection process caused by pectobacteria. This compound is a ramified heteropolymer, the backbone of which consists of alternate rhamnose and galacturonic acid residues, and side chains are represented by galactose or arabinose residues. However, the role of pectobacterial enzymes for rhamnogalacturonan I degradation in the development of soft rots has not been previously ascertained. The present study is dedicated to the investigation of the necessity of *P. atrosepticum* SCRI1043 enzymes degrading rhamnogalacturonan I for a full development of soft rots in the plants infected by pectobacteria. By directed mutagenesis, we have obtained mutant forms of *P. atrosepticum* SCRI1043 deficient in genes encoding rhamnogalacturonyl hydrolase (genome locus *eca3749*) that cleaves the backbone of rhamnogalacturonan I, and galactanase (genome locus *eca0852*) that breaks side chains of this polymer. For the target gene knockout, mutant loci were constructed by overlap-extension PCR. Most of the original gene was replaced by kanamicin-resistance cassette. The obtained construction was ligated into a mobilized suicide vector and the resulting plasmid was transferred into donor *E. coli* CC118 strain cells. The recombinant plasmid with the mutant locus was introduced into *P. atrosepticum* SCRI1043 cells by three-parental mating. The *P. atrosepticum* SCRI1043 clones, in which the original locus was replaced by the mutant one, and the donor plasmid was eliminated, were selected on the selective media. The mutant strains *P. atrosepticum* SCRI1043 3749 and *P. atrosepticum* SCRI1043 0852 caused significantly less damage to the plant tissues of *Brassica rapa* spp. *pekinensis* Cha Cha cv. compared to parental wild-type strain. Herewith, the strain mutant in *eca0852* locus encoding galactanase, the enzyme that cleaves side chains of rhamnogalacturonan I, was least virulent. The reduction in virulence, in this case, was not related to the suppression of homogalacturonan-degrading enzyme activity or less motility of bacteria. Thus, we have demonstrated that, first, rhamnogalacturonan I-degrading enzymes may be attributed to virulence factors of phytopathogenic pectobacteria, and second, the hydrolysis of the sides chains of rhamnogalacturonan I contributes more to the process of tissue maceration than the decay of the polymer backbone.

Keywords: *Pectobacterium atrosepticum*, pectic polysaccharides, rhamnogalacturonan I, glycosyl hydrolases.

Научные собрания

МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА И КОНФЕРЕНЦИЯ «БИОИНДУСТРИЯ 2019»

(22-24 октября 2019 года, г. Санкт-Петербург)

Выставка-конференция — это единая площадка для укрепления международных связей в развитии биотехнологических разработок в странах Балтийского региона.

Тематические разделы выставки:

- Разработки и готовая продукция в области биотехнологий
- Аналитическое оборудование, реагенты и материалы
- Медицинская биотехнология
- Пищевая биотехнология, сельскохозяйственная биотехнология
- Природоохранная биотехнология

Контакты и информация: https://medin.expoforum.ru/