

## Література

1. Файт В.І. Морозостійкість і урожайність окремих сортів озимої м'якої пшениці // Вісник аграрної науки. – 2005. – №11. – С. 25-29.
2. Стельмах А.Ф., Литвиненко В.І., Файт В.І. Яровизаційна потреба та фоточутливість сучасних генотипів озимої м'якої пшениці // Зб. наук. праць СГІ-НАЦ НАІС. – Одеса, 2004. – Вип.5 (45). – С. 118-127.
3. Файт В.І., Федорова В.Р. Ідентифікація сортів озимої м'якої пшениці за генами фотоперіодичної чутливості // Зб. наук. праць СГІ – НАЦ НАІС. – Одеса. – 2007. – Вип. 9(49). – С. 9-21.
4. Гончаров Н.П. Генетический контроль фотопериодической реакции у мягкой пшеницы // С.-х. біологія. – 1986. - № 11. – С. 84-90.
5. Стельмах А.Ф., Мартынюк В.Р. Эффекты доминантных генов *Ppd* по особенностям органогенеза у озимой мягкой пшеницы // Цитология и генетика. - 1998. – Т. 32, №6. – С. 27-34.
6. Worland A.J., Borner A., Korzun V. et al. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheat // Euphytica. – 1998. – V. 100. - P. 385-394.
7. Файт В.І., Федорова В.Р. Влияние различий генов *Ppd* на агрономические признаки озимой мягкой пшеницы // Цитология и генетика. – 2007. – Т. 37, №5. - С. 69-76.
8. Файт В.І., Стельмах А.Ф., Мартынюк В.Р., Воронин А.Н. Создание изогенных по локусам *Ppd1-3* линий мягкой пшеницы // Науч.-тех. бюл. СГИ. – 1997. – №1(87). – С. 18-21.
9. Дьяченко Л.Ф., Топтіков В.А., Міресь С.Л., Бабаянц Л.Т., Тоцький В.М. Множинні молекулярні форми деяких оксидоредуктаз і резистентність м'якої пшениці до фузаріозу // Вісник ОНУ. – 2001. – Т. 6, №1. – С. 59-66.

## Резюме

Досліджували електрофоретичні спектри пероксидази, супероксиддисмутази, фенолоксидази, цитохромоксидази і естераз в листках пшениці сорту Миронівська 808 та її майже ізогенних по генах *Ppd* ліній. При загартуванні рослин в польових умовах домінуючі гени *Ppd-A1a* та *Ppd-B1a* неоднаково впливали на зміни експресивності окремих ізоформ ферментів.

Исследовали электрофоретические спектры пероксидазы, супероксиддисмутазы, фенолоксидазы, цитохромоксидазы и эстераз в листках линий пшеницы сорта Мироновская 808 и ее почти изогенных по генам *Ppd* линий. При закаливании растений в полевых условиях доминантные гены *Ppd-A1a* и *Ppd-B1a* по-разному влияли на изменения экспрессивности отдельных изоформ ферментов.

The electrophoretic spectra of multiple molecular forms of peroxidase, superoxide desmutase, phenoloxidase, cytochromoxidase and esterase in winter *Ppd* nearisogenic lines of v. Mironovskaya 808 have been studied. During autumn vernalization in the field some isoforms of enzyme expression in nearisogenic lines differentiated from recurrent genotype.

## ЕВТУШЕНКОВ А.Н., АГАБОЗОРГИ С.

Белорусский государственный университет.

Беларусь, 220030, Минск, проспект Независимости, 4 e-mail: evtushenkov@bsu.by

## ВИРУЛЕНТНЫЕ СВОЙСТВА МУТАНТОВ БАКТЕРИЙ *ERWINIA ATROSEPTICA* ПО ГЕНАМ СИСТЕМЫ СЕКРЕЦИИ III ТИПА

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<sub>Еа</sub>, 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 и корнеплодов моркови.

#### Материалы и методы

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

Для определения пектатлиазной 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -10,5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - 4,5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - 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).

Пектатлиазную активность определяли по образованию ненасыщенной дигалактуроновой кислоты путем спектрофотометрического измерения увеличения УФ-абсорбции реакционной смеси при длине волны 235нм [10].

Таблица 1

#### Штаммы бактерий, использованные в данной работе

Штаммы	Характеристика	Происхождение, ссылка
1	2	3
<i>E.carotovora subsp. atroseptica</i> JN42	Rif <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> (Tn9) r <sup>-</sup>	Коллекция кафедры молекулярной биологии

JN504	hrpN::pJP5603, hrpW:: $\Omega^{sp/sm}$ rif <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> (Tn9)	То же
VKW	hrpW::pJP5603 Km <sup>r</sup>	То же
HW1	JN42 hrpW:: $\Omega^{sp/sm}$	То же [8]
JN502	JN42 hrpN::pJP5603; Km <sup>r</sup>	То же
TA85	JN42 hrpJ::pJP5603	То же [6]
VKE	JN42 dspE:: pJP5603	То же [7]
TA5	JN42 hrpJ:: $\Omega^{sp/sm}$ rif <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> (Tn9)	То же

Мацерирующую активность определяли путем заражения стерильных ломтиков картофеля и моркови 18 часовой культурой бактерий. На срезы толщиной 1 см и площадью 2-3 см<sup>2</sup> наносили 5 мкл культуры и ломтики инкубировали в чашках Петри при 28<sup>0</sup> 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 корнеплодов моркови и пектатлиазную активность бактерий. Полученные результаты приведены в таблице 2.

Все изученные штаммы эффективно разрушали ткани клубней картофеля и корнеплодов моркови в течение суток с момента заражения. Но масса мацерированной ткани (мацерирующая активность) существенно различалась у бактерий «дикого» типа и мутантов.

У мутантов *E.carotovora subsp.atroseptica* по генам системы секреции III типа (штаммы JN504, TA5, JN502, TA85, VKE) достоверно наблюдалось значительное увеличение мацерирующей активности тканей клубней картофеля (до 80%) 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 нарушен синтез белка харпина HrpN, а штамм JN504 дефектный по синтезу белков харпинов HrpN и HrpW. 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.

Таблица 2

### Мацерирующая активность бактерий *E.carotovora subsp.atroseptica*

Штаммы	Мацеразная активность бактерий (в мг мацерированной ткани на один ломтик картофеля)	Мацеразная активность бактерий (в мг мацерированной ткани на один ломтик моркови)	Пектатлиазная активность бактерий (Е/мл)
TA85	445±15,5	307,5±37,7	3,3
VKE*	512,5±34,4	285±40,9	3,4
JN504	665±39,2	532,5±17,5	3,8

JN42	357,5±14,9	455±39,6	4,0
TA5-	597,5±51,0	485±88,3	3,6
HW1	335±29,0	445±45,1	3,7
VKW	477,5±35,6	450±18,7	3,4
JN502*-	657,5±54,2	450±10,8	3,6

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).

Другая картина наблюдалась при мацерации мутантными бактериями тканей корнеплодов моркови (Табл.2). отличалась от мацерации клубней картофеля. Все изученные мутантные штаммы по мацерирующей активности на тканях моркови достоверно не отличались от бактерий дикого типа (JN42).

Таким образом, мутации по генам *hrpN*, *dspE*, *hrpJ* усилили способность мутантных бактерий мацерировать ткани клубней картофеля, но не корнеплодов моркови. Если предположить, что этот эффект связан с белками HrpN и DspE, то в случае с растениями картофеля они выступают как факторы авирулентности, но не влияют на взаимодействие с растениями другого семейства (морковь), то есть эти белки определяют специфичность взаимодействия патогенна с растением.

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 пектатлиазная активность не изменилась ни у одного из изученных мутантных штаммов.

### **Выводы**

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

### **Литература**

1. *Barras F.* Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*// *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 //Prokaryotes* .- 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*// *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//Molecular Plant Pathology.-2007.-Vol. 8, № 1.-P. 55–67
6. Лагоненко А.Л., Т.В.Овчинникова, Николайчик Е.А., Евтушенков А.Н. «Характеристика локализации белка HrpJ, компонента системы секреции III типа бактерий *Erwinia carotovora* subsp.atroseptica // Доклады НАН Б.- 2004.- Т. 48, №5.- С.65-69
7. Николайчик Е.А., Овчинникова Т.В., Валентович Л.Н., Губич О.И., Шолух М.В., Евтушенков А.Н. Транслокация белка DspE фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* в клетки *Nicotiana Tabacum* и его необходимость для индукции реакции гиперчувствительности как необходимое условие // Доклады НАНБ.- 2005.- Т.49.- Стр.81-85.
8. Лагоненко А. Л., Николайчик Е. А., Евтушенков А. Н. Характеристика харпина HrpW бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*/ // 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., Евтушенков А.Н., Фомичев Ю.К. Мацерация тканей клубней картофеля пектолитическими бактериями рода *Erwinia* // 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// Trends Microbiol.-2002.-Vol. 10.-P. 462–46.

### Резюме

Изучали влияние мутаций по генам системы секреции III типа на вирулентность бактерий *Erwinia atroseptica*. Выявлено, что мутации по генам hrpN, hrpJ, dspE усиливали способность бактерий мацерировать ткани клубней картофеля, но не моркови.

We have investigated the effect of some gene mutations in type III secretion system on virulence activity of bacteria *Erwinia atroseptica*. It was established that, hrpN, hrpJ, dspE gene mutations increase bacterial ability in maceration of potato tuber tissue, while carrot root-crop was not affected by the same experience.

**КИРИКОВИЧ С.С., ДЕНИСОВА Ф.Ш., ЛЕВИТЕС Е.В.**

*Институт цитологии и генетики СО РАН,*

*Россия, 630090, Новосибирск, пр-т Лаврентьева, 10, e-mail: svetak@bionet.nsc.ru*

### ИМПРИНТИНГ В АГАМОСПЕРМНЫХ ПОТОМСТВАХ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ

Настоящее время характеризуется огромным вниманием исследователей к широкому классу явлений наследования и изменчивости, классифицируемым как менделевские.

Наряду с цитоплазматическим наследованием к менделевским относится также и наследование эпигенетических изменений, под которыми понимают изменения активности и экспрессии генов, возникающие в процессе индивидуального развития организма, не связанные с нарушением нуклеотидной последовательности ДНК и