

Дослідження деяких біологічних властивостей фітопатогенних штамів *Pseudomonas sp.*, що спричинюють нове бактеріальне захворювання липи (*Tilia sp.*)

І. Г. Бух, О. С. Бреус, Г. Г. Панасюк, С. С. Малюта

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

*Відомо, що такі властивості, як наявність плазмід та синтез бактеріоциногенних речовин, у багатьох випадках мають опосередковане або пряме відношення до механізмів патогенезу, тому їхнє вивчення часто дає можливість зробити певні припущення щодо останніх та спрямувати наступні дослідження. Виявлено, що дані патогенні ізоляти з липи (*Tilia sp.*) мають плазмиду однакової електрофоретичної рухливості, стійкі до високих концентрацій ряду антибіотиків різних типів та мають бактеріоциногенні властивості.*

Вступ. На території України виявлено нове захворювання липи (*Tilia sp.*). Основні симптоми захворювання — пожовтіння і опадання листя з дорослих дерев, всихання і загибель молодих. До цього часу для цієї рослини не було відомо жодної бактеріальної хвороби [1]. Але при аналізі тканин уражених дерев виявилось, що в даному випадку збудником є бактерія. Ізольовані з природних джерел (листових пластинок, черешків та гілок хворих лип) штами збудника за рядом біохімічних, морфологічних та культуральних властивостей віднесені до роду *Pseudomonas* [1]. Видову належність збудника не встановлено. В результаті порівняння біологічних особливостей ізольованих штамів з ознаками типового виду *P. aeruginosa* та інших близькоспоріднених флуоресціюючих фітопатогенів ідентичного організму виявлено не було. Від кожного з них патоген відрізнявся за принциповими систематичними ознаками. Згідно з результатами досліджень симптоматики, вірулентності, біохімії та морфології, збудник хвороби липи, ймовірно, є унікальним і з'явився в останні роки з невідомих причин [1].

Вивчення ряду біологічних особливостей збуд-

ника, таких як наявність або відсутність плазмід, здатність до токсиноутворення, відношення до антибіотиків склало мету нашого дослідження.

Матеріали та методи. Бактеріальні штами. Варіанти фітопатогенних штамів ізольовано з природних джерел (тканин уражених дерев), визначено як *Pseudomonas* і люб'язно надано нам для досліджень О. П. Коробко (Ін-т мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ) [1].

Бактеріальні середовища та умови культивування. Культури *Pseudomonas sp.* культивували на агаризованому або рідкому амінопептидному середовищі при температурі 27 °С.

Для ізоляції плазмідної ДНК із патогенних штамів *Pseudomonas sp.* бактерії вирощували в рідкому LB середовищі протягом 17—18 год при температурі 27 °С [2].

Для визначення реакції на антибіотики штами *Pseudomonas sp.* попередньо культивували протягом 17—18 год в амінопептидному середовищі, розведеному в 10 разів фізіологічним розчином при 27 °С, після чого переносили на 10-разово розведене агаризоване амінопептидне середовище, доповнене антибіотиками, і культивували ще впродовж 16 год при 27 °С. Всі експерименти повторювали

тричі. Як контроль використовували штами *Escherichia coli* C300 (Am^r, Tc^r), C600 (не має стійкості до антибіотиків), HB101 (Sm^r). Сублетальні концентрації антибіотиків або найвищі з тих, що були нами перевірені (для тих антибіотиків, для яких сублетальних концентрацій встановлено не було), наведено нижче:

Антибіотик	Концентрація, мкг/мл
Ампіцилін	14400
Стрептоміцин	2700
Хлорамфенікол	300
Канаміцин	450
Тетрациклін	2

Плазмідну ДНК із штамів *Pseudomonas sp.* ізолювали за методом Бірнбойма і Долі [3].

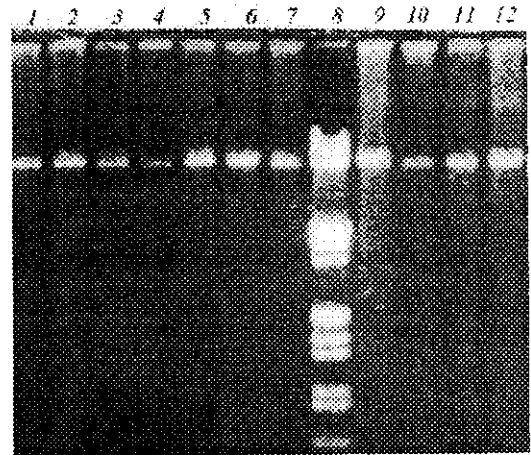
Електрофорез плазмідної ДНК здійснювали в 0,8 %-му агарозному гелі, трис-боратному буфері, при напрузі 5 В/см протягом 4—5 год, як маркер використовували ДНК фага лямбда, розщеплену рестриктазою *HindIII*.

Індикаторну техніку, використану з незначними модифікаціями для виявлення продукції антиметаболічних токсинів фітопатогенними штамми *Pseudomonas sp.*, описано в роботі [4]. Індикаторні культури *Agrobacterium tumefaciens* та *E. coli* K12 нарощували протягом ночі в рідкому LB середовищі при температурах 27 та 37 °С відповідно, промивали фізіологічним розчином та ресуспендували в рідкому мінімальному середовищі M9 [2]. Бактеріальну суспензію індикаторної культури розтирали по поверхні агаризованого M9 середовища або змішували з розплавленим агаризованим середовищем M9, яке заливали в чашки Петрі. Нарощені на твердому LB середовищі протягом ночі штами *Pseudomonas sp.* наносили на ці чашки уколами. Інкубували у випадку *A. tumefaciens* при 27 °С протягом 72 год; у випадку *E. coli* K12 — при 27 °С протягом перших 24 год та при 37 °С протягом наступних 48 год.

Експерименти з комплементатії бактеріоциногенних властивостей амінокислотами проводили аналогічно, але до агаризованого M9 середовища додавали одну з 20 амінокислот.

Результати і обговорення. Характерною рисою досліджених бактеріальних ізолятів виявилася стійкість до антибіотиків різних типів у досить високих концентраціях (див. вище).

Десять проаналізованих штамів показали однотипову картину реакції на антибіотики. Сублетальні концентрації встановлено для хлорамфеніколу і тетрацикліну, вони становлять 295 і 2 мкг/мл відповідно. Щодо ампіциліну, стрепто-



Електрофореграма плазмідної ДНК фітопатогенних штамів *Pseudomonas sp.*: 1—7, 9—12 — плазмідна ДНК, ізолювана з патогенних штамів *Pseudomonas sp.*; 8 — ДНК фага лямбда, розщеплена рестриктазою *HindIII*

міцину та канаміцину, то ріст культур спостерігався при всіх концентраціях даних антибіотиків, найвищі з них становили 14400, 2700 і 450 мкг/мл відповідно.

У літературі широко поширена інформація стосовно зв'язку між стійкістю до антибіотиків і присутністю в клітинах плазмід. Крім того, відомо, що генетичні детермінанти деяких бактеріальних фітотоксинів, наприклад коронатину, а іноді й детермінанти патогенності (кластер *hrp* генів) локалізовані на плазмідах і, вірогідно, здатні переноситися між патоварами або навіть різними видами бактерій, обумовлюючи набуття ними токсикогенних чи патогенних властивостей [5, 6]. Цікаво, що всі перевірені нами бактеріальні штами містили плазмідну ДНК однакової електрофоретичної рухливості. Електрофоретична рухливість нативної плазмідної ДНК приблизно відповідала такій фрагмента розміром 23130 п. н. ДНК фага лямбда, розщепленої рестриктазою *HindIII* (рисунок).

Відомо, що для фітопатогенів роду *Pseudomonas* характерне токсиноутворення як одне з явищ, що супроводжує колонізацію рослини-господаря. Функціональна роль токсиноутворення фітопатогенами до цього часу залишається в більшості невизначеною або суперечливою. Існує широке коло токсинів, які продукуються фітопатогенними псевдомонадами [5, 7]. Як правило, фітотоксини мають бактеріоциногенні властивості, що пов'язано з гомологічністю мішеней цих токсинів у прокариотів та рослин. У деяких випадках такими мішенями є ферменти шляхів біосинтезу амінокис-

лот [4, 5]. Для перевірки припущення, чи продукують дані патогенні штами бактеріоциногенні речовини і якщо це так, то чи зумовлена їхня дія пригніченням шляхів біосинтезу амінокислот і яких саме амінокислот, було застосовано стандартну індикаторну техніку, що полягає в спільному культивуванні на мінімальному середовищі бактерії, чия бактеріоциногенна дія тестується з бактерією-індикатором, ріст якої вона повинна пригнічувати в разі синтезу антиметаболічних речовин [4].

Ряд патогенних штамів культивували на мінімальному середовищі спільно з прототрофними культурами-індикаторами *A. tumefaciens* та *E. coli* K12. На газонах з *E. coli* K12 навколо уколів культурою *Pseudomonas sp.* спостерігалися не типові зони лізису, а ділянки темного кольору, природу яких важко інтерпретувати без додаткових досліджень. На газонах з *A. tumefaciens* внаслідок уколів культурою псевдомонад чітко виявлялися зони лізису. Отже, культура *Pseudomonas sp.* виявилася бактеріоциногенною щодо *A. tumefaciens*. Ступінь бактеріоциногенності (визначений як ефективність впливу та відносний розмір зон лізису) варіював у різних штамів. Результати експерименту відображено в таблиці.

Щоб визначити, чи пов'язана дія даного бактеріоциногену з пригніченням синтезу амінокислот, штами, які показали найвищий ступінь бактеріоциногенності (50-7, 1e-1), культивували на мінімальних середовищах, доповнених однією з 20 амінокислот у присутності індикаторної культури *A. tumefaciens*. На середовищах, доповнених цистеїном або триптофаном, зони лізису були відсутні. Вірогідно, синтез саме цих амінокислот пригнічує токсин, що синтезують ізоляти. Ймовірно, даний бактеріоциноген є токсичним для рослини-господаря. Але можливо також, що синтез псевдомонадами бактеріоциногенної щодо агробактерії сполуки є наслідком того, що обидві бактерії є фітопатогенами і, отже, конкурують за нішу існування, чим і може обумовлюватися синтез та виділення бактеріоциногенної щодо конкурента речовини. Слід зазначити, що обидві ці можливості не є взаємовиключними. На жаль, використання як індикаторної культури *E. coli*, що практично б усунуло можливість конкурентних стосунків, не дало однозначної відповіді. Застосування даної техніки є попереднім етапом і потребує подальших експериментів із залученням рослин для остаточної відповіді на питання про наявність продукування токсину даними ізолятами, з'ясування хімічної природи токсину та правомірності екстраполяції отриманих нами результатів на систему патоген—рослина.

Бактеріоциногенна дія патогенних штамів *Pseudomonas sp.* на культури *A. tumefaciens* та *E. coli* K12

Патогенні ізоляти <i>Pseudomonas sp.</i>	Ефективність впливу*	Відносний розмір зон лізису**
--	----------------------	-------------------------------

Індикаторна культура *A. tumefaciens*

1e-1	1	3
1a-3	0,7	1
1в-4	0,6	1
1e-1	1	4
50-7	1	4
50a-9	0,5	1
50b-10	1	2
58-12	0,75	2

Патогенні штами <i>Pseudomonas sp.</i>	Ефективність впливу*	Відносний розмір зон затемнення**
--	----------------------	-----------------------------------

Індикаторна культура *E. coli* K12

1e-1	1	4
1e-2	1	3
50-7	1	4
50a-9	0,2	1
50b-10	0,2	1
58-12	1	2

*Ефективність впливу — відношення кількості уколів, навколо яких з'явилися зони лізису чи зони затемнення внаслідок уколів культурою псевдомонад, до загальної кількості уколів культурою псевдомонад; **відносний розмір зон лізису або затемнення, оцінений за чотирьохбальною шкалою «розмір зон лізису або затемнення внаслідок впливу різних штамів *Pseudomonas sp.*».

Цікаво, що, за літературними даними, фіто-токсин, який пригнічує біосинтез триптофану рослинами невідомий, тоді як біосинтез цистеїну рослинними клітинами інгібується ризобітоксином, що продукується патогенними штамми *P. andropogonis*. Токсична дія даного токсину зумовлена пригніченням β -цистатіонази, важливого ферменту транс-сульфурального шляху біосинтезу гомоцистеїну. Крім цього, показано, що цей токсин є сильним інгібітором утворення етилену в тканинах рослин [7].

Отже, збудник нової бактеріальної хвороби липи (*Tilia sp.*), крім морфобіологічних ознак, що дають підставу припустити належність патогенних ізолятів до досі невідомого виду роду *Pseudomonas* [1], має таку сукупність біологічних властивостей,

як стійкість до великих доз антибіотиків різних типів, наявність плазмиди та бактериоциногенність.

I. G. Bukch, O. S. Breus, G. G. Panasyuk, S. S. Maliuta

Investigation of some biological properties of phytopathogenic strains of *Pseudomonas* sp., that cause new bacterial disease of the linden (*Tilia* sp.)

Summary

Some biological properties of phytopathogenic strains of *Pseudomonas* sp., that cause new bacterial disease of the linden (*Tilia* sp.) were studied. It is known that such properties as plasmid availability and production of bacteriocinogenic substances in many cases relate directly or indirectly to the pathogenesis mechanisms. Therefore, the study on these properties often gives a possibility to make certain suggestions about the latter and further investigation. All pathogenic isolates tested were revealed to have plasmid DNA with the same electrophoretic mobility, being resistant to a high dose of antibiotics of different types, and to produce bacteriocinogenic substance(s).

И. Г. Бух, О. С. Бреус, Г. Г. Панасюк, С. С. Малюта

Исследование некоторых биологических свойств фитопатогенных штаммов *Pseudomonas* sp., приводящих к новому бактериальному заболеванию липы (*Tilia* sp.)

Резюме

Известно, что такие свойства, как наличие плазмид и синтез бактериоциногенных веществ, во многих случаях имеют опосредованное или прямое отношение к механизмам патогенеза,

поэтому их изучение часто дает возможность сделать определенные предположения относительно последних и планировать дальнейшие эксперименты. Выявлено, что данные патогенные изоляты из липы (*Tilia* sp.) имеют плазмиду одинаковой электрофоретической подвижности, устойчивы к высоким концентрациям ряда антибиотиков разных типов и имеют бактериоциногенные свойства.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Коробко О. П. Передчасне пожовтіння листя та усихання дерев липи — нова бактеріальна хвороба // Доп. НАН України.—1998.—8.—Р. 177—181.
2. Манниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—480 с.
3. Birnboim H. S., Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA // Nucl. Acids Res.—1979.—7.—Р. 1513—1523.
4. Gasson M. J. Indicator technique for antimetabolic toxin production by phytopathogenic species of *Pseudomonas* // Appl. and Environ. Microbiol.—1980.—39.—Р. 25—29.
5. Bender C. L., Malvick D. K., Mitchell R. E. Plasmid-mediated production of the phytotoxin coronatine in *Pseudomonas syringae* pv. tomato // J. Bacteriol.—1989.—171.—Р. 807—812.
6. Boucher C. A., Van Gijsegem F., Barberis P. A., Arlat M., Zischec C. *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity on tomato and hypersensitivity on tobacco clustered // J. Bacteriol.—1987.—169.—Р. 5626—5632.
7. Durbin R. D. Toxins and pathogenesis.—New York: Acad. press, 1982.—Р. 423—441.

УДК 579.841.1.581.2
Надійшла до редакції 08.02.2000