

УДК 581.1:633.358:577.13

## ЗАВИСИМОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ цАМФ И АКТИВНОСТИ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *PISI* И *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUS* ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ N-ФЕНИЛ-2-НАФТИЛАМИНА

© 2017 г. Л. А. Ломоватская, Л. Е. Макарова, О. В. Кузакова,  
А. М. Гончарова, А. С. Романенко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Сибирский институт физиологии и биохимии растений»  
Сибирского отделения Российской академии наук  
(Иркутск, Россия)

В патогенах гороха *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*) и картофеля *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*), а также среде их роста изучали влияние N-фенил-2-нафтиламина (N-ФНА), одного из мажорных компонентов корневых экссудатов гороха (не выявлен в корневых экссудатах растений картофеля *in vitro*), на концентрацию цАМФ и активность пектиназы и целлюлазы – факторов вирулентности этих фитопатогенов. N-ФНА существенно подавлял рост планктонной культуры специфического для гороха фитопатогена *Psp* в концентрации 9 мкМ, а рост планктонной культуры *Cms* – только в концентрации 45 мкМ. Под действием ростингибирующих концентраций N-ФНА уровень цАМФ существенно снижался у *Psp* и возрастал у *Cms*. Такой эффект отмечался и в среде их роста. При этом активности пектиназы и целлюлазы снижались только в среде роста бактерий, но не в самих микроорганизмах. Сделан вывод о том, что N-ФНА специфически участвует в молекулярном диалоге «растение-хозяин: патоген» путем регуляции плотности и вирулентности бактерий через модуляцию активности их аденилатциклазной сигнальной системы.

**Ключевые слова:** фитопатогены, N-фенил-2-нафтиламин, цАМФ, пектиназа, целлюлаза

Микроорганизмы, обитающие в ризосфере, представлены как мутуалистами, так и фитопатогенами, различающимися по специализации. На ранних этапах взаимодействия специфичность взаимоотношений растений и бактерий во многом определяется составом и концентрацией корневых экссудатов растений, которые служат как сигнальными молекулами, так и аллелопатическими соединениями (Popović et al., 2010; Макарова и др., 2012; 2016). Такие компоненты способны не только инициировать более тесные взаимодействия растений с грибами и бактериями, но и регулировать метаболизм последних (Овцына, Тихонович, 2004; Hassan, Mathesius, 2012). Одним из мажорных фенольных компонентов корневых

экссудатов гороха является N-фенил-2-нафтиламин, который относительно недавно был выявлен в числе негативных аллелопатических регуляторов у бобовых растений (Макарова и др., 2012). Было показано, что он подавляет рост симбиотических бактерий в планктонной культуре, хотя молекулярные механизмы, обеспечивающие этот процесс, остаются неизученными.

Известно, что цАМФ, вторичный мессенджер аденилатциклазной сигнальной системы, считается индуктором, участвующим в регуляции метаболизма и механизмах патогенеза бактерий (Wolfgang et al., 2003; Smith et al., 2004).

Целью данного исследования было выявить специфичность влияния N-фенил-2-нафтиламина из корневых экссудатов гороха на динамику роста, концентрацию цАМФ, а также активность факторов вирулентности патогенов гороха *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*) и

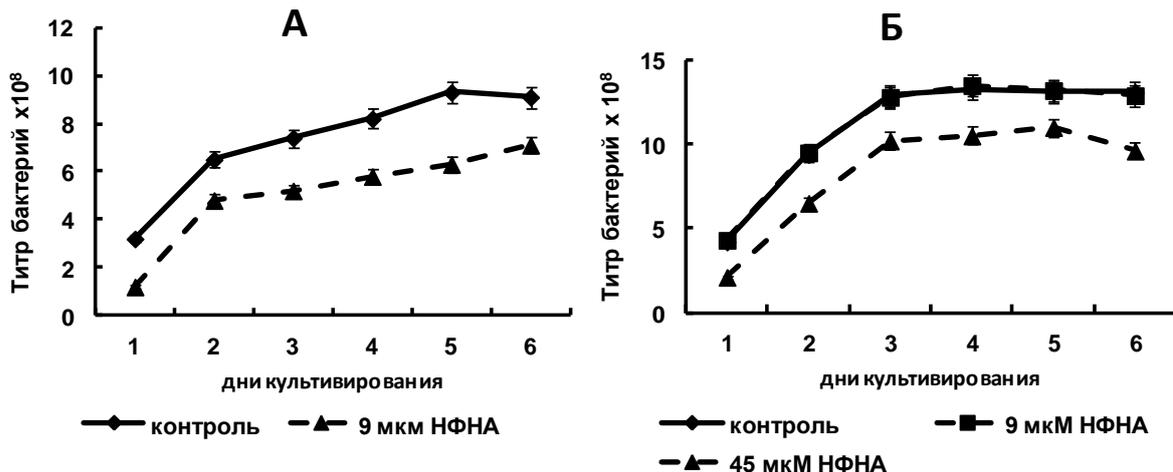


Рис. 1. Влияние различных концентраций N-ФНА на динамику роста бактерий *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (А) и *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus* (Б).

картофеля *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus* (*Cms*) в планктонной культуре.

#### МЕТОДИКА

В экспериментах использовали следующие виды бактерий: *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, штамм 1845, полученный из ВНИИФ (Большие Вяземы, Московская обл.) и *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus* (*Cms*), штамм 6889, полученный из Федеральной карантинной службы (г. Москва). В среду культивирования бактерий после автоклавирования добавляли раствор N-фенил-2-нафтиламина (Sigma, США) в метаноле: для *Psp* в конечной концентрации 9 мкМ, для *Cms* 9 или 45 мкМ. Контролем служили образцы без добавления N-ФНА. Предварительные эксперименты показали, что сам по себе метанол в применявшейся концентрации (30 мкл/30 мл среды) не оказывал влияния на метаболизм бактерий.

Растения картофеля *in vitro* сорта Луговской культивировали в течение 3-4 недель на жидкой среде Мурасиге-Скуга с добавлением витаминов и гормонов. По окончании инкубации жидкую среду роста анализировали на содержание N-фенил-2-нафтиламина методом ВЭЖХ в условиях, описанных ранее (Макарова и др., 2016).

Планктонную культуру бактерий выращивали в колбах на среде, содержащей про-светленный гороховый отвар, 7 г/л глюкозы, 5 г/л CaCO<sub>3</sub>, pH 7,0. Титр бактерий определяли на планшетном спектрофотометре «Immunochem-2100» (High Technology Inc., США) при длине волны 655 нм. Исследования проводили на стационарной фазе роста бактерий.

При определении содержания цАМФ в образцах бактерии осаждали при 3000 g, затем к осадку добавляли среду гомогенизации в соотношении 1:3, содержащую 50 мМ трис-НСl, pH 7,2, 0,5 мМ фенилметилсульфонилфторид, 0,05 мМ парахлормеркурибензоат, 1 мМ дитиотреитол, и разрушали бактерии на ультразвуковом соникаторе «Branson Ultrasonic corp» (США). Гомогенат центрифугировали при 105000 g 90 мин. цАМФ определяли в среде культивирования бактерий и в супернатанте, полученном после ультрацентрифугирования. Образцы кипятили и определяли уровень цАМФ методом ИФА (Lomovatskaya et al., 2011).

Определение активности целлюлазы и пектиназы проводили в разрушенных бактериях (эндо-ферменты) и среде их культивирования (экзо-ферменты) в соответствии с методом (Вешняков и др., 2008). Результаты активности ферментов выражали в мг/мл редуцирующих сахаров и при расчетах учитывали разбавление осадка бактерий.

Эксперименты проводили в трех биологических и восьми аналитических повторностях. Полученные результаты обрабатывали статистически, с вычислением ошибки среднего значения.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наши исследования показали, что 9 мкМ N-ФНА существенно снижал динамику роста планктонной культуры *Psp* (рис.1, А), однако не оказывал влияния на рост планктонной культуры *Cms* (рис.1, Б). При этом у *Psp* уровень цАМФ в большей степени снижался в бактериях, чем в среде культивирования, тогда как

## ЗАВИСИМОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ цАМФ И АКТИВНОСТИ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ

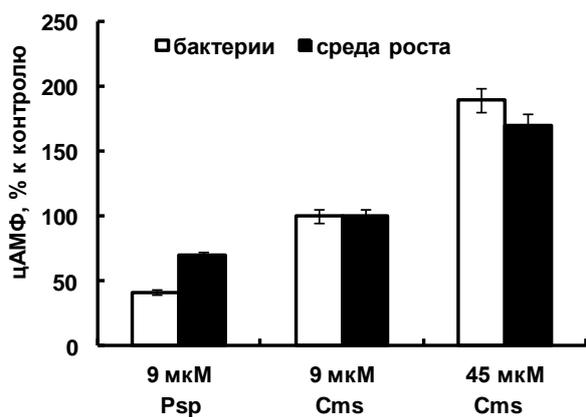


Рис. 2. Влияние N-ФНА в концентрациях 9 и 45 мкМ на содержание цАМФ в бактериях *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* (Psp) и *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus* (Cms), а также в среде их роста.

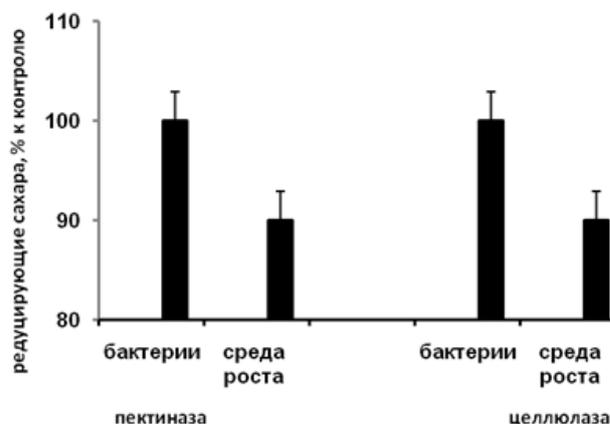


Рис. 3. Влияние 9мкМ N-ФНА на активность эндо- и экзо- пектиназы и целлюлазы у *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*.

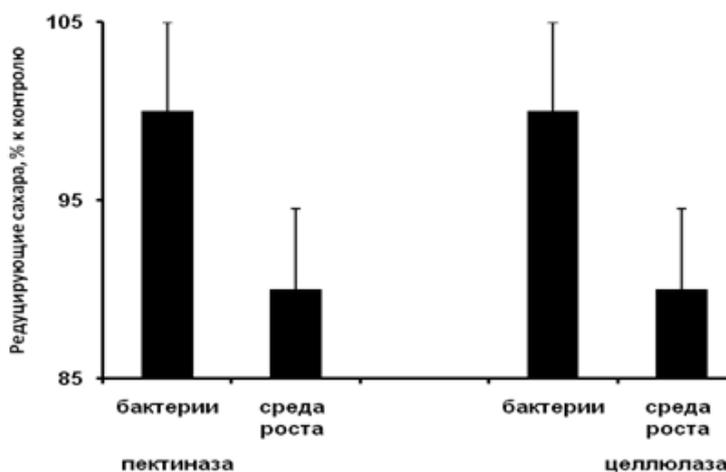


Рис. 4. Влияние 45 мкМ N-ФНА на активность эндо- и экзо- пектиназы и целлюлазы у *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus*.

в *Cms* и среде их культивирования этот показатель не отличался от контроля (рис. 2).

Снижение динамики роста *Cms* наблюдалось только под действием 45 мкМ N-ФНА (рис. 1). Это сопровождалось значительным увеличением концентрации цАМФ как в самих бактериях, так и в среде их культивирования. Активность пектиназы и целлюлазы *Psp* незначительно снижалась только в среде роста, но не в самих бактериях (рис. 3), а для *Cms* изменения в активности данных ферментов не были отмечены (данные не приведены). У *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus* под влиянием N-ФНА активность пектиназы и целлюлазы весьма незначительно снижалась, преимуществен-

но, в среде роста (рис.4). Следует заметить, что в корневых экссудатах растений картофеля *in vitro* N-ФНА нами не был обнаружен (данные не приведены).

Ранее нами было показано, что N-ФНА в концентрации 9 мкМ, физиологической для гороха, существенно ингибировал рост и снижал концентрацию цАМФ в планктонной культуре симбиотической бактерии *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Rlv) (Ломоватская и др., 2016). Для *Psp*, так же как и для *Rlv*, несмотря на их различную специализацию (патоген и мутуалист, соответственно), горох является растением-хозяином. Вероятно, поэтому N-ФНА в данном случае выполняет функции

специфического регулятора, сдерживающего размножение этих видов бактерий в ризосфере. В то же время отсутствие N-ФНА в корневых экссудатах растений картофеля свидетельствует о том, что в процессе эволюции такой защитный механизм не сформировался, поэтому *Cms* оказался чувствителен только к неспецифической, высокой концентрации N-ФНА – 45 мкМ. Более того, такое резкое повышение уровня цАМФ, вероятно, свидетельствует о стрессовой реакции бактерий.

Известно, что цАМФ, как одна из сигнальных молекул, участвует в регуляции метаболизма бактерий. Под контролем этого вторичного мессенджера находится чувство кворума (QS), что отражается на динамике роста микроорганизмов, а также активности некоторых факторов вирулентности – экзопектиназы и целлюлазы (Reverchon et al., 1997; Liu et al., 1999).

Несмотря на то, что динамика роста *Psp* и *Cms* под действием N-ФНА снижалась, концентрация цАМФ у данных видов бактерий менялась прямо противоположным образом: снижалась у *Psp* и возрастала у *Cms*. По литературным данным, изменения в концентрации этого вторичного мессенджера сопряжены с активностью транскрипционных факторов из семейства CRP (цАМФ-рецепторных белков), найденных как у патогенов животных, так и у фитопатогенов (Casey et al., 2014; Green et al., 2014). В свою очередь, CRP участвует в регуляции синтеза некоторых аутоиндукторов (Liang et al., 2008). Вероятно, этим можно объяснить наблюдаемые зависимости динамики роста бактерий от уровня цАМФ. Активность пектиназы и целлюлазы бактерий также связана с уровнем внутриклеточного цАМФ. Ранее нами было показано, что внутриклеточная активность этих ферментов контролируется трансмембранной аденилатциклазой бактерий (Ломоватская и др., 2015), однако в данных экспериментах падение активности этих ферментов наблюдалось только в среде роста. Хотя, возможно, что в этом случае цАМФ также является молекулой-модулятором, поскольку в литературе есть сведения о глобальной регулирующей роли цАМФ-зависимых белков CRP компонентов T2SS (от type II secretion system) бактерий различной специализации. Известно, что пектиназы и целлюлазы секретируются через второй тип секреции (T2SS) в несколько этапов с участием сигнальных пептидов и белков-шаперонов. На примере *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* было показано, что экспрессия

гена *xps*, поддерживающего энергетический потенциал для T2SS, связана с активностью цАМФ-зависимого рецепторного белка (Ge, He, 2008).

Таким образом, на основании представленных результатов можно заключить, что N-ФНА специфически ингибирует рост бактерий (*Pseudomonas syringae* pv. *psis*), для которых горох является растением-хозяином, тогда как для *Clavibacter michiganensis* sp. *sepedonicus*, не являющимся патогеном для данного вида растения, ингибирование высокой концентрацией N-ФНА носит неспецифический характер. Для каждого вида бактерий необходим строго определенный уровень цАМФ: существенное понижение концентрации данной сигнальной молекулы, также как и ее повышение, приводит к ингибированию роста бактерий и снижению активности их факторов вирулентности.

## ЛИТЕРАТУРА

- Вешняков В.А., Хабаро Ю.Г., Камакина Н.Д. Сравнение методов определения редуцирующих веществ: метод Бертрана, эбулиостатический и фотометрический методы // Химия растительного сырья. – 2008. – № 4. – С. 47-50.
- Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Кузакова О.В. Трансмембранная аденилатциклаза контролирует факторы вирулентности фитопатогена *Pseudomonas syringae* и мутуалиста *Rhizobium leguminosarum* // Микробиология. – 2015. – № 4. – С. 404-410.
- Ломоватская Л.А., Макарова Л. Е., Кузакова О.В., Романенко А.С., Гончарова А.М. Влияние N-фенил-2-нафтиламина на активность компонентов аденилатциклазной сигнальной системы и на вирулентность бактериальных фитопатогенов и мутуалистов растений // Прикл. биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52, № 3. – С. 300-311.
- Макарова Л.Е., Смирнов В.И., Клыба Л.В., Петрова И.Г., Дударева Л.В. Роль аллелопатических соединений в регуляции и формировании бобово-ризобияльного симбиоза // Прикл. биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48, № 4. С. 394-402.
- Макарова Л.Е., Дударева Л.В., Петрова И.Г., Васильева Г.Г. Выделение фенольных соединений в экссудаты корней проростков гороха при инокуляции *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* и *Pseudomonas syringae* pv. *psis* // Прикл. биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52, № 2. – С. 306-311.
- Ge C., He C. Regulation of the Type II Secretion Structural Gene *xpsE* in *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* by the global transcription regulator *Clp* // Curr. Microbiol. – 2008. – V. 56. – P. 122-127.

## ЗАВИСИМОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ цАМФ И АКТИВНОСТИ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ

- Hassan S., Mathesius U. The role of flavonoids in root–rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant–microbe interactions // J. Exp. Bot. – 2012. – V. 63. – P. 3429-3444.
- Lianga W., Syed Zafar Sultana S.Z., Anisia J. Silva A., Jorge A. Benitez J. Cyclic AMP posttranscriptionally regulates the biosynthesis of a major bacterial autoinducer to modulate the cell density required to activate quorum sensing // FEBS Lett. – 2008. – V. 582. – P. 3744-3750.
- Lomovatskaya L.A., Romanenko A.S., Filinova N.V., Dudareva L.V. Determination of cAMP in plant cells by a modified enzyme immunoassay method // Plant Cell Reports. – 2011. – V. 30. – P. 125-132.
- Popovici J., Comte G., Bagnarol É., Alloisio N., Fournier P., Bellvert F., Bertrand C., Fernandez M.P. Differential effects of rare specific flavonoids on compatible and incompatible strains in the myrica gale-frankia actinorhizal symbiosis // Apl. Env. Microb. – 2010. – V.76. – P. 2451-2460.
- Sikora A.E. Proteins secreted via the type II secretion system: smart strategies of vibrio cholerae to maintain fitness in different ecological niches // PLOS Pathogens. – 2013 – V. 9 (2): e1003126. doi:10.1371/journal.ppat.1003126
- Smith R.S., Wolfgang M.C., Lory S. An adenylatecyclase-controlled signaling network regulates Pseudomonas aeruginosa virulence in a mouse model of acute pneumonia // Infect. Immunol. – 2004. – V. 72. – P. 1677-1684.

Поступила в редакцию  
16.01.2017 г.

## EFFECT OF N-PHENYL-2-NAPHTHYLAMINE ON cAMP LEVEL AND VIRULENCE FACTORS OF *PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *PISI* AND *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SSP. *SEPEDONICUS*

L. A. Lomovatskaya, L. E. Makarova, O. V. Kuzakova, A. M. Goncharova, A. S. Romanenko

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry  
of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences  
(Irkutsk, Russia)  
E-mail: LidaL@sifibr.irk.ru*

Effect of N-phenyl-2-naphthylamine (N-PNA), one of the major components of pea root exudates, on the concentration of cAMP in pea *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*) and potato *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*) pathogens, as well as in their growth medium, was studied. In addition, changes in the activity of pectinase and cellulase, virulence factors of these pathogens, were investigated. It was shown that in the root exudates of the potato plants *in vitro* N-PNA was not detected. N-PNA in physiological for peas concentration 9  $\mu$ M significantly inhibited the growth of plankton culture of pea-specific phytopathogen *Psp*, while the growth of *Cms* plankton culture was inhibited only by 45  $\mu$ M N-PNA. Under the influence of 9 and 45  $\mu$ M N-PNA respectively cAMP levels significantly decreased in *Psp* and increased in *Cms*. This was true for their growth medium too. Herewith pectinase and cellulase activity declined only in the bacterial growth medium, but not in microorganisms themselves. It is concluded that N-PNA specifically involved in the molecular dialogue «host plant: pathogen» by regulating the density and the virulence of the bacteria through the modulation of the activity of adenyl cyclase signaling system.

**Key words:** *phytopathogens, pea, N-phenyl-2-naphthylamine, cAMP, pectinase, cellulase*

**ЗАЛЕЖНІСТЬ ВМІСТУ ЦАМФ І АКТИВНОСТІ ФАКТОРІВ ВІРУЛЕНТНОСТІ  
*PSEUDOMONAS SYRINGAE* PV. *PISI* ТА *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS*  
*SSP. SEPEDONICUS* ВІД КОНЦЕНТРАЦІЇ N-ФЕНІЛ-2-НАФТИЛАМІНУ**

Л. А. Ломоватська, Л. Є. Макарова, О. В. Кузакова, А. М. Гончарова, А. С. Романенко

*Федеральне державне бюджетна установа науки  
«Сибірський інститут фізіології та біохімії рослин  
Сибірського відділення Російської академії наук»  
(Іркутськ, Росія)  
E-mail: LidaL@sifibr.irk.ru*

У патогенах гороху *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (*Psp*) і картоплі *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (*Cms*), а також у середовищі їх росту, вивчали вплив N-феніл-2-нафтиламіну (N-ФНА), одного з мажорних компонентів корневих ексудатів гороху (не виявлений у корневих ексудатах рослин картоплі *in vitro*), на концентрацію цАМФ і активність пектинази і целюлази – факторів вірулентності цих фітопатогенів. N-ФНА істотно пригнічував ріст планктонної культури специфічного для гороху фітопатогена *Psp* в концентрації 9 мкМ, а ріст планктонної культури *Cms* – тільки в концентрації 45 мкМ. Під дією ростигібуючих концентрацій N-ФНА вміст цАМФ істотно знижувався у *Psp* і підвищувався *Cms*. Такий же ефект спостерігався і у середовищі їх росту. При цьому активності пектинази і целюлази знижувалися тільки в середовищі росту бактерій, але не в самих мікроорганізмах. Зроблено висновок, що N-ФНА специфічно бере участь в молекулярному діалозі «рослина-господар: патоген» шляхом регуляції щільності і вірулентності бактерій через модуляцію активності їх аденілатциклазної сигнальної системи.

**Ключові слова:** *фітопатогени, горох, N-феніл-2-нафтиламін, цАМФ, пектиназа, целюлаза*