

**ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЦИДОВ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННОГО
ШТАММА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧЕРНОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ
ПЯТНИСТОСТИ ТОМАТА**

А. МОТАМЕДИ ШАЛАМЗАРИ, Ф.С. ДЖАЛИЛОВ, Г.И. КАРЛОВ

**(Кафедра фитопатологии, лаборатория защиты растений,
центр молекулярной биотехнологии)**

Методом электропорации с использованием плазмиды рНС60, содержащей ген GFP, была проведена трансформация возбудителя черной бактериальной пятнистости томата. Генетически трансформированный штамм *X. vesicatoria* не отличался от исходного по скорости роста на искусственной питательной среде и патогенным свойствам. Показана принципиальная возможность экспресс-оценки активности бактерицидов путем измерения интенсивности флуоресценции зеленого флуоресцентного белка у трансформированного штамма фитопатогена.

Ключевые слова: зеленый флуоресцентный белок, GFP, черная бактериальная пятнистость томата.

Черная бактериальная пятнистость томата относится к числу наиболее вредоносных бактериальных болезней томата. В России и странах СНГ это заболевание широко встречается на томате и перце. В эпифитотийные годы распространенность болезни составляет от 40 до 70%. В России заболевание зарегистрировано на Северном Кавказе, Краснодарском и Алтайском краях, Воронежской, Читинской, Волгоградской и других областях [1]. В странах ЕС патоген является карантинным объектом (EPPO, список A2). Возбудителя заболевания длительное время относили к *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* [6]. В настоящее время вместо этого патовара предложены 4 вида: *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans*, *X. gardneri* [6].

К основным источникам инфекции относят семена и растительные остатки. Многие элементы биологии возбудителя и патогенеза, такие как способность к выживанию в эпифитном состоянии на поверхности растений, не являющихся хозяевами патогена, длительность выживания в почве остаются малоизученными. Требуется совершенствование методики скрининга веществ, способных ограничить размножение возбудителя. Проведение этих экспериментов возможно с использованием маркированных штаммов. Наиболее пригодным для этой цели является маркирование возбудителя геном зеленого флуоресцентного протеина (green fluorescence protein, GFP). GFP, выделенный из медузы *Aequorea victoria*, флуоресцирует в зеленом диапазоне при облу-

чении его синим светом. В настоящее время этот белок широко используется в качестве светящейся метки в клеточной и молекулярной биологии [5]. Эффективность такого подхода неоднократно была показана на ряде фитопатогенных и симбиотических бактерий [3, 9].

Целью работы было создание штаммов возбудителя черной бактериальной пятнистости томата, трансформированных геном GFP, для использования в модельных экспериментах по оценке антибактериальной активности различных препаратов.

Материал и методы

В работе использовали штамм *X. vesicatoria* 1111/B, полученный из Государственной коллекции фитопатогенных микроорганизмов (ВНИИ фитопатологии РАСХН). Для трансформации использовали плазмиду рНСбО [3], несущую ген GFP и ген устойчивости к тетрациклину.

Бактерии хранили при $\sim 70^{\circ}\text{C}$ в 15%-м глицерине. Для культивирования *X. vesicatoria* использовали среду YDC [8].

Для проведения трансформации методами теплового шока и электропорации готовили химически компетентные и электрокомпетентные клетки соответственно [7]. Применяли ранее описанные методики теплового шока и электропорации [7]. Электропорацию проводили в кюветках (BIO-RAD, Алмабион) с расстоянием 0,1 см между электродами с помощью электропоратора Gene Pulser (BIO-RAD) согласно рекомендациям производителя [4]. Селекцию трансформированных колоний, экспрессирующих GFP, проводили на среде с тетрациклином 20 мг/л с использованием бинокулярной лупы Lumag V.12 (Zeiss). Проверку видовой принадлежности трансформированных бактерий проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфич-

ными к патогену праймерами Xnth 804/1405 в термоциклере «Герцик» (ДНК-технология, Москва) при следующих температурно-временных параметрах: начальная денатурация (96°C , 7 мин), 30 циклов, включая денатурацию (94°C , 40 с), отжиг (62°C , 30 с), и элонгацию (72°C , 40 с) и дополнительную одиночную элонгацию (72°C , 7 мин). После окончания амплификации около 10 мкл амплифицированных продуктов разделяли в 1,5%-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, в буфере TBE 0,5x.

Сравнение патогенности исходного и трансформированного штаммов проводили методом инфильтрации бактериальной суспензии плотностью 10^9 клеток/мл в листья томата сорта Белый Налив шприцем без иглы. Изоляцию патогена из листьев проводили на среде YDC с тетрациклином в концентрации 20 мг/л. Оптическую плотность бактериальной суспензии (OD 600) определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, США) при 600 нм. Концентрацию колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий определяли методом серийных разведений [8].

Для выбора искусственной питательной среды, обеспечивающей наилучший рост трансгенного штамма и лучшую экспрессию GFP, сравнивали среды LB, King B, модификация King B с содержанием глицерина 0,1% и пептона 0,2%, модификация King B — с содержанием глицерина 0,1%, YD (YDC без карбоната кальция). Среды засеивали суспензией бактерий до конечной концентрации 10^5 клеток/мл и инкубировали на шейкере 200 об/мин при 27°C . Через 4, 8, 12, 16, 20, 24 и 48 ч отбирали пробы, в которых измеряли уровень флуоресценции, оптическую плотность при 600 нм (OD 600) и концентрацию КОЕ.

Интенсивность флуоресценции GFP в бактериальных суспензиях из-

меряли в условных единицах с использованием флуориметра «Джин» (ДНК-технология).

Для оценки бактерицидного действия испытывали антибиотик фитобактериомицин (ООО «Фармбиомедсервис») с активностью 3750 ЕА/мг. Антибиотик добавляли в различных количествах в жидкую среду Кинг Б, инокулированную трансформированным штаммом. Через 4, 8, 12, 16, 20 и 24 ч отбирали пробы по 600 мкл и измеряли OD 600 и интенсивность флуоресценции.

Повторность опытов 3-кратная. Статистическую обработку полученных данных проводили методом сравнения средних по критерию Дункана с использованием программы SPSS15.

Результаты и их обсуждение

Для создания флуоресцентно меченого штамма возбудителя черной бактериальной пятнистости томата использовали плазмиду pНС60. При сравнении методов трансформации (тепловой шок и электропорация) выяснилось, что эффективным является метод электропорации, так как только при его использовании удалось получить трансформированные штаммы фитопатогенной бактерии с экспрессией GFP. Трансформированные бактерии дважды пересевали на среде LB с тетрациклином 20 мкг/л. Высокую интенсивность флуоресценции показали 11 изолированных колоний (рис. 1) и их принадлежность к *X. vesicatoria* была подтверждена ме-

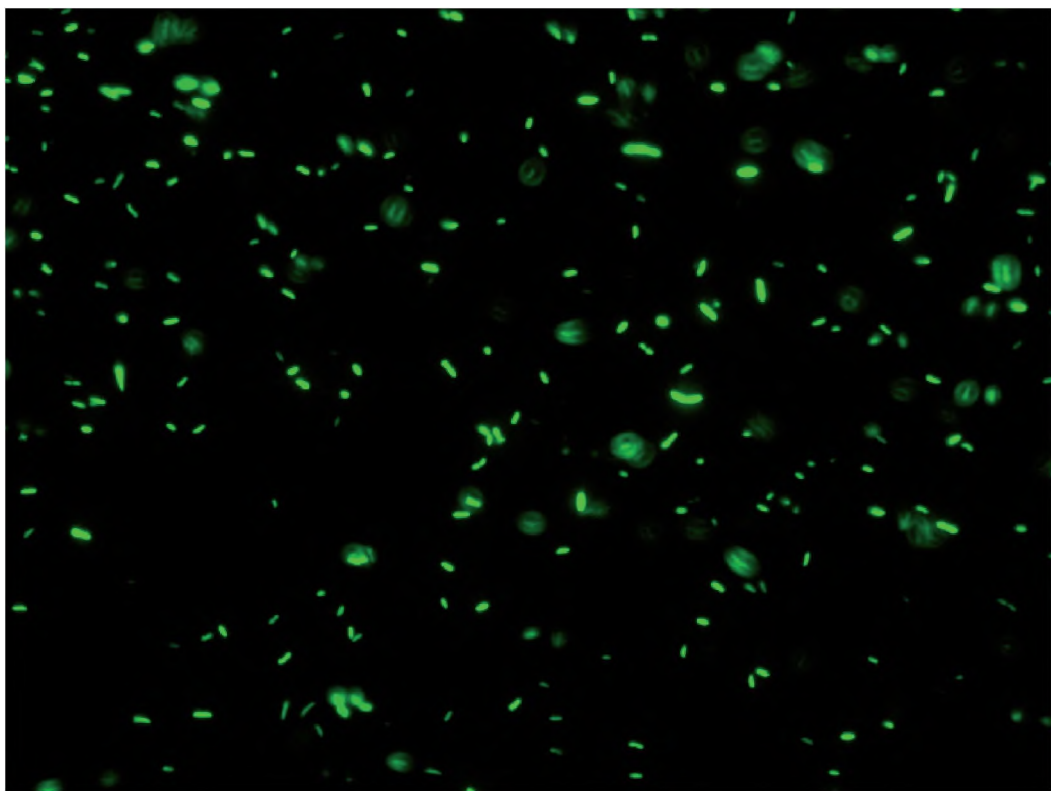


Рис. 1. Флуоресценция зеленого флуоресцентного белка у клеток трансформированного штамма *X.vesicatoria* 1111/BGFP

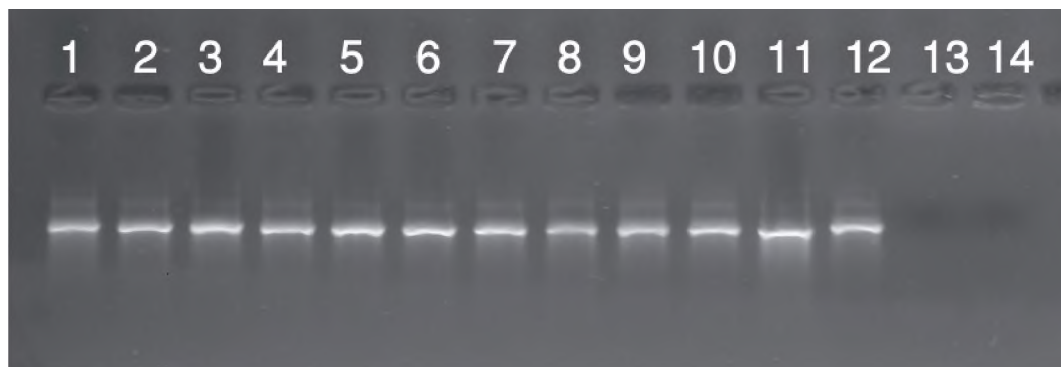


Рис. 2. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР с праймерами Xnth 804/1405. ДНК: 11 трансформированных колоний *X. vesicatoria* 1111/В (дорожки 1 — 11), *Xv* 1111/В (дорожка 12, положительный контроль), *E. coli* DH10В (дорожка 13, отрицательный контроль), контроль — вода (дорожка 14, отрицательный контроль)

тодом ПЦР со специфичными праймерами (рис. 2).

Следующим этапом работы был выбор искусственной питательной среды, обеспечивающей быстрый рост культуры штамма *X. vesicatoria* 1111 /BGFP и наивысший уровень флуоресценции. Результаты показали, что из 8 испытанных питательных сред среда Кинг Б в классической прописи обеспечивала наивысшую скорость роста культуры трансформированного штамма *X. vesicatoria* 1111/BGFP и наибольшие значения интенсивности флуоресценции

(табл. 1). Различия были статистически достоверны.

Также было проведено сравнение характеристик исходного и трансформированного штамма. Через 24 ч культивирования на шейкере на жидкой среде LB у исходного штамма OD 600 было 0,147, у трансформированного штамма *X. vesicatoria* 1111/BGFP — 0,140. Между этими показателями не было статистически значимых различий, что указывало на то, что присутствие плазмиды pHC60 не оказывало влияния на скорость размножения бактерий на питательной

Т а б л и ц а 1

Рост и флуоресценция штамма *X. vesicatoria* 1111/BGFP на различных жидких питательных средах

Питательная среда	OD 600	Интенсивность флуоресценции, у.е.
Минеральная основа + 1% глюкозы	0,017 а	1,00 а
Минеральная основа + 1% глицерин	0,018 а	1,23 а
Минеральная основа + 1% сахарозы	0,019 а	1,25 а
King В (0,1% глицерин)	0,280 б	26,22 б
King В (0,1% глицерин + 0,2% пептон)	0,450 в	30,53 в
LB	0,520 г	32,97 г
YD	0,750 д	36,72 д
King В	0,800 е	43,16 е

П р и м е ч а н и е . В таблицах 1, 2 и 3 между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, нет статистически достоверных различий при 95%-м уровне вероятности.

среде. Сравнение патогенных свойств при инокуляции листьев томата также не выявило каких-либо различий между исходным и трансформированным штаммами. Эти факты показывают, что полученный нами штамм фитопатогена с флуоресцентной меткой может быть использован в качестве адекватной модели для изучения различных аспектов патогенеза при бактериозах растений.

На отобранной среде Кинг Б было проведено изучение кинетики роста трансформированного штамма *X. vesicatoria* 1111 /BGFP с измерением оптической плотности (OD 600), концентрации КОЕ и интенсивности флуоресценции.

Оптическая плотность бактериальной суспензии достоверно повышалась начиная с 12 ч культивирования и непрерывно возрастала в течение всего периода отбора проб (табл. 2). Концентрация КОЕ достигала максимума через 24 ч культивирования и не возрастала в течение вторых суток культивирования. Интен-

сивность флуоресценции достоверно возростала через 8 ч культивирования, наблюдался также рост в период 24-48 ч, несмотря на выход концентрации КОЕ на «плато». Это указывало на стабильность флуоресцентного белка, т.е., вероятно, на участие в общей флуоресценции GFP мертвых клеток.

Сравнение скорости роста штамма *X. vesicatoria* 1111/BGFP в присутствии и отсутствии селективирующего фактора — тетрациклина — показало, что на среде без тетрациклина размножение бактерий проходило быстрее, в то же время между интенсивностью флуоресценции в этих двух вариантах не было достоверных различий (табл. 3). Это позволяет предположить, что в процессе размножения бактерий на среде без селективирующего фактора (тетрациклина) часть бактериальных клеток способна терять плазмиду pHСБО.

Отсутствие различий между исходным и трансформированным штаммом позволило нам использовать пос-

Т а б л и ц а 2

Динамика роста и интенсивности флуоресценции штамма *X. vesicatoria* 1111/BGFP на жидкой среде Кинг Б

Длительность культивирования, ч	OD 600	Ln КОЕ/мл	Интенсивность флуоресценции, у.е.
0	0,018 а	14,78 а	6,29 а
4	0,020 а	15,41 аб	8,47 а
8	0,120 а	17,99 бв	13,80 б
12	0,217 б	19,25 в	34,01 в
16	0,300 в	20,28 г	35,64 в
24	0,480 г	22,59 г	39,58 г
48	0,750 д	20,39 г	64,08 е

Т а б л и ц а 3

Оптическая плотность и интенсивность флуоресценции бактериальной суспензии штамма *X. vesicatoria* 1111/BGFP через 24 ч культивирования в жидкой среде Кинг Б

Среда	OD 600	Интенсивность флуоресценции, у.е.
Кинг Б	0,420 а	19,36 а
Кинг Б + тетрациклин 20 мг/л	0,380 б	21,38 а

ледний в качестве модели для оценки эффективности бактерицидов. В эксперименте нами был использован фитобактериомицин — антибиотик, способный подавлять большинство фитопатогенных бактерий [2]. Добавление этого антибиотика в жидкую среду Кинг Б для культивирования трансформированного штамма показало, что размножение тест-объекта и флуоресценция существенно подавлялись при концентрации 1 мг/л и

полностью подавлялись при концентрациях антибиотика свыше 5 мг/л (рис. 3). Различия опытных вариантов с контролем (без антибиотика) по уровню флуоресценции были статистически достоверны уже через 4 ч культивирования.

Таким образом, нами показана принципиальная возможность экспресс-оценки активности бактерицидов путем измерения интенсивности флуоресценции зеленого флуо-

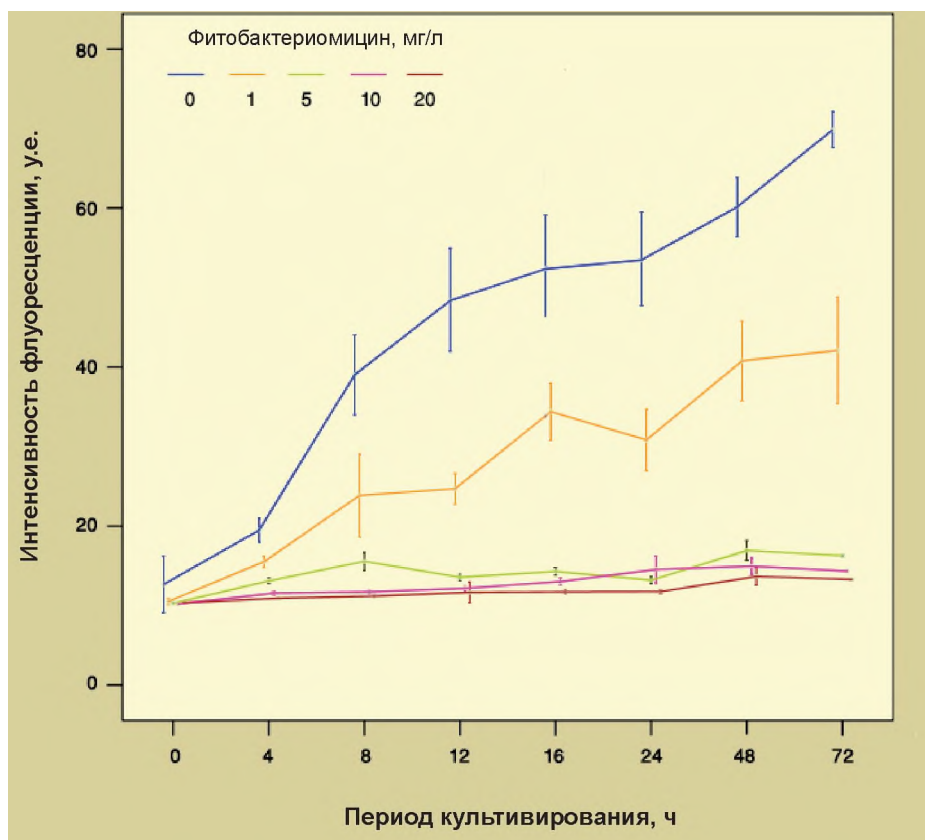


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции зеленого флуоресцентного белка при культивировании штамма *X. vesicatoria* 1111/BGFP на среде Кинг Б при различных концентрациях фитобактериомицина

ресцентного белка у трансформированного штамма фитопатогена. Метод может быть использован при лабораторном скрининге средств защиты растений от бактериальных болезней растений.

Библиографический список

1. *Матвеева Е.В.* Черная бактериальная пятнистость томата (Возбудитель *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) // Агро XXI, 2006. № 10—12. С. 30-32.
2. *Петрухина М.Т., Буянова Н.Д., Буцевич Л.А.* Фитобактериомицин — отечественный антибиотик для защиты растений. Обзор. М.: ОНТИТЭИмикробиопром, 1973.
3. *Cheng H.P., Walker G.C.* Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti* // J. Bacteriol, 1998. V. 180. P. 5183-5191.
4. *Eppendorf A.G.* Basic Applications Manual Electroporation, 2006. Hamburg.
5. Green fluorescent protein : properties, applications, and protocols / edited by M. Chalfie and S.R. Kain. 2nd ed. p. John Wiley & Sons, Inc., 2006.
6. *Jones J.B., Lacy G.H., Bouzar H., Stall R.E., Schaad N.W.* Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper // Syst. Appl. Microbiol, 2004. V. 27. P. 755-762.
7. Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Third Edition. Mexico, CIMMYT, 2005.
8. *Schaad N.W., Jones J.B., Lacy G.H.* Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edition. St. Paul, Minnesota // American Phytopathological Society, 2001.
9. *So J.S., Lira H.T., Oh E., Heo T.R., Koh S.C., Leung K.T., Lee H., Trevors J.T.* Visualizing the infection process of *Xanthomonas campestris* in cabbage using green fluorescent protein // World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2002. V. 18. P. 17-21.

Рецензент — к. б. н. А.А. Ванькова

SUMMARY

According to the electroporation method, using pHС60 plasmid with GFP gene, causative agent of black bacterial speck in tomato plants has been transformed. Genetically transformed strain *X. vesicatoria* does not differ from the initial one in both growth rate, in artificial nutrient medium, and its pathogenic characteristics. Principle possibility of bactericides' activity rapid analysis by means of fluorescence intensity measuring, green fluorescent protein in a transformed phytopathogen strain, has been proven in the article.

Key words: green fluorescent protein, GFP, black bacterial speck in tomato plants.

Мотамеди Шаламзари Абдоррахман — асп. каф. фитопатологии РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. 976-12-79. Эл. почта: motamedy_a@yahoo.com

Джалилов Февзи Сеид-Умерович — д. б. н., РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. 976-12-79. Эл. почта: [labzara\(ci\)mail.ru](mailto:labzara(ci)mail.ru)

Карлов Геннадий Ильич — к. б. н., РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. 977-70-01. Эл. почта: [karlov\(ci\)timacad.ru](mailto:karlov(ci)timacad.ru)