



## **Ekspresja genów *Erwinia chrysanthemi* kodujących pektynazy w zainfekowanej tkance roślinnej**

Sylvia Jafra, Ewa Łojkowska

Zakład Ochrony i Biotechnologii Roślin, Katedra Biotechnologii

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii

Uniwersytet Gdański i Akademia Medyczna, Gdańsk

### **Expression of *Erwinia chrysanthemi* genes coding pectate lyases in infected potato tissue**

#### Summary

*Erwinia chrysanthemi* mutants, containing transcriptional fusion of one of the pectate lyase genes (*pelA*, *pelB*, *pelC*, *pelD*, *pelE*, *pell*, *pell*, *pelZ*) with the reporter gene encoding  $\beta$ -glucuronidase activity, were studied for their ability to cause disease symptoms and to synthesise pectinases after inoculation of potato tubers. The strains affected in *pell* and *pell* genes displayed a reduced virulence on potato tubers demonstrating the important role of these isoenzymes in soft root disease. Analysis of the bacterial population showed an active multiplication of bacteria during the infection. Similar kinetics of growth were observed for all mutants and for the wild type strain. Comparison of the mutants and the wild type strain showed that the *pell*, *pell* and *pelZ* mutants synthesised reduced levels of Pels. The expression of *pelA*, *pelE* and *pelZ* is 5-fold higher *in planta* than *in vitro*. In contrast, both *pell* and *pell* are highly (10-fold factor) induced *in planta*, which is characteristic of the plant-inducible pectate lyases.

#### Key words:

*Erwinia chrysanthemi*, pectate lyase, potato,  $\beta$ -glucuronidase.

#### Adres do korespondencji

Ewa Łojkowska,  
Zakład Ochrony  
i Biotechnologii Roślin,  
Katedra Biotechnologii,  
Międzyuczelniany Wydział  
Biotechnologii,  
Uniwersytet Gdański  
i Akademia Medyczna,  
ul. Kładki 24,  
80-822 Gdańsk;  
e-mail:  
lojkowsk@biotech.univ.  
gda.pl

### **1. Wstęp**

Bakterie z gatunku *Erwinia chrysanthemi* wytwarzają szereg zewnątrzkomórkowych enzymów mających zdolność degrado-

wania składników roślinnych ścian komórkowych, są to: pektynazy, celulazy, hemi-celulazy i proteiny. W procesie maceracji tkanki roślinnej główną rolę odgrywają pektynazy (1-4). Bakterie z gatunku *E. chrysanthemi* wytwarzają metyloesterazy i acetyloesterazy pektyn, poligalakturonazy, liazy pektyn i co najmniej osiem izoenzymów liazy kwasu poligalakturonowego (PLa, PLb, PLc, PLd, PLe, PLi, PLl, PLz). Biosynteza każdego z nich jest kodowana przez niezależne geny: *pelA*, *pelB*, *pelC*, *pelD*, *pelE*, *pell*, *pell*, *pelZ* (5-9). Trzy ostatnie geny kodujące tzw. liazy drugorzędowe sklonowano i sekwencjonowano w drugiej połowie lat dziewięćdziesiątych (6-9).

W ostatnich latach odnotować należy znaczny postęp wiedzy na temat roli liazy kwasu poligalakturonowego w rozwoju procesu chorobowego wywołanego przez bakterie z rodzaju *Erwinia* na roślinach (10-13). Zastosowanie technik biologii molekularnej i inżynierii genetycznej pozwoliło na opisanie roli poszczególnych izoenzymów w patogenezie oraz na scharakteryzowanie szeregu białek regulatorowych uczestniczących w procesach indukcji lub hamowania ekspresji genów kodujących te enzymy (14-18). W badaniach nad rolą izoenzymów liazy kwasu poligalakturonowego w degradacji składników ścian komórkowych wykorzystano dwie strategie. Badania prowadzono wykorzystując mutanty bakterii z gatunków *Erwinia carotovora* i *Erwinia chrysanthemi* z delecją odpowiedniego (-nich) genu (-ów) (11,19) oraz mutanty zawierające fuzję genów odpowiedzialnych za syntezę poszczególnych pektynaz z genem reporterowym *uidA* kodującym biosyntezę  $\beta$ -glukuronidazy (12,13,20, 21). W wyniku wprowadzenia kasety z pozbawionym promotora genem *uidA* w miejsce za promotorem badanego genu *pel*, nie następuje ekspresja tego genu. Natomiast aktywność enzymu reporterowego –  $\beta$ -glukuronidazy odzwierciedla ekspresję genu poddanego fuzji (20).

Pierwsze badania nad rolą poszczególnych izoenzymów liazy kwasu poligalakturonowego w procesie maceracji tkanki roślinnej prowadzono z użyciem mutantów *E. chrysanthemi* z delecją pojedynczych genów kodujących tzw. główne izoenzymy PL. Stwierdzono, że delecja pojedynczych genów warunkujących biosyntezę poszczególnych izoenzymów liazy kwasu poligalakturonowego nie wpływa znacząco na obniżenie poziomu maceracji tkanki roślinnej. Natomiast delecja grupy genów: *pelA*, *pelD* i *pelE* wyraźnie obniża patogeniczność mutantów (10,11,19).

Skonstruowanie transkrypcyjnych fuzji genów *pel* z genem reporterowym kodującym  $\beta$ -glukuronidazę (*uidA*) pozwoliło nie tylko na zbadanie patogeniczności szczepów nie wytwarzających tych izoenzymów, ale także na prześledzenie ekspresji poszczególnych genów *pel* w zainfekowanej tkance roślinnej (12,13,21). Gen reporterowy *uidA* kodujący  $\beta$ -glukuronidazę nie występuje w tkance roślinnej, dlatego jest przydatny w badaniach ekspresji genów bakteryjnych *in planta*.

Celem podjętych badań było określenie roli drugorzędowych liaz kwasu poligalakturonowego w procesie chorobowym wywołanym przez bakterie z gatunku *Erwinia chrysanthemi* na ziemniakach.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Szczepy bakteryjne

Badania prowadzono wykonując inokulację bulw ziemniaka odmiany Mila szczepem dzikim *Erwinia chrysanthemi* 3937 oraz mutantami tego szczepu nie produkującymi pojedynczych izoenzymów liaz kwasu poligalakturonowego. Zastosowane do badań szczepy *E. chrysanthemi* opisano w tabeli 1. Bakterie hodowano na pożywkę płynną M63 (20) zawierającą jako źródło węgla 0,2% glicerol i 0,25% kwas poligalakturonowy (PGA). Po 24 godzinach hodowli na wytrząsarce mierzono gęstość optyczną hodowli przy długości fali 600 nm lub wykonywano rozcieńczenia seryjne i oznaczano liczbę bakterii w hodowli. Pozostałą część hodowli bakteryjnej traktowano kilkoma kroplami toluenu w celu doprowadzenia do lizy komórek i uwolnienia pektynaz i  $\beta$ -glukuronidazy do roztworu. Zawiesinę odwirowywano, a w uzyskanym ekstrakcie oznaczano aktywność PL i GUS.

Tabela 1

Szczepy *E. chrysanthemi* stosowane w badaniach

| Szczepy                     | Charakterystyka                              | Pochodzenie / odniesienie w literaturze  |
|-----------------------------|--|--|
| <i>E. chrysanthemi</i> 3937 | Szczep dziki                                 | Kotoujansky i in. 1982, (3)              |
| A1744<br>(delta pel)        | PMV4116<br>$\Delta pelADE$ , $\Delta pelBCZ$ | Beaulieu i in. 1993, (19)                |
| A1828                       | <i>pelE::uidA</i> , Km <sup>R</sup>          | Hugouvieux-Cotte-Pattat i in. 1992, (20) |
| A1888                       | <i>pelA::uidA</i> , Km <sup>R</sup>          | Hugouvieux-Cotte-Pattat i in. 1992, (20) |
| A1945                       | <i>pelZ::uidA</i> , Km <sup>R</sup>          | Pissavin i in. 1996, (8)                 |
| A1990                       | <i>pell::uidA</i> , Km <sup>R</sup>          | Łojkowska i in. 1995, (7)                |
| A3102                       | <i>pell::uidA</i> , Km <sup>R</sup>          | Jafra i in. 1999, (22)                   |

### 2.2. Przygotowanie zawiesiny komórek bakteryjnych i inokulacja bulw ziemniaka

Pojedynczą kolonię bakterii przenoszono z podłoża stałego M63 do pożywki płynnej i inkubowano z wytrząsaniem przez 24 godziny w temperaturze 30°C. Zawiesinę bakteryjną rozcieńczano buforem M63 do uzyskania gęstości optycznej 0,1 przy długości fali 600 nm ( $2 \times 10^9$  cfu/ml).

Bulwy ziemniaka myto i sterylizowano dwukrotnie przez 15 min w 10% roztworze podchlorynu sodowego (Clorox). Końcówki pipet automatycznych zawierające 50  $\mu$ l zawiesiny bakterii ( $2 \times 10^7$  cfu/ml) wkładano w bulwy ziemniaka na głąbo-

kość 10 mm. W zależności od wielkości bulwy w pojedynczą bulwę wbijano trzy lub cztery końcówki zawierające zawiesiny różnych szczepów. 10 bulw inokulowano zawiesinami hodowli każdego z badanych szczepów i inkubowano w temperaturze 30°C w komorach o wilgotności względnej około 95%.

Ocenę patogeniczności poszczególnych szczepów prowadzono po 24, 48 i 72 godzinach od inokulacji. Rozwój procesu chorobowego polegającego na maceracji tkanki określano mierząc średnicę plamy gnilnej po przekrojeniu bulwy prostopadle do miejsca wklucia końcówki pipety automatycznej (23).

### **2.3. Izolacja zmacerowanej tkanki bulw ziemniaka do oznaczeń enzymatycznych**

Z inokulowanych bulw pobierano zmacerowaną tkankę odpowiednio po 8, 12, 16, 20, 24, 48 lub 72 godzinach po inokulacji. Tkanekę pobraną z 10 bulw, z miejsc inokulowanych tym samym szczepem, łączono w jedną próbę homogenizowano i rozcieńczano 10-krotnie w buforze M63. Z tak przygotowanej zawiesiny wykonano seryjne rozcieńczenia w buforze M63. Zawiesinę z trzech końcowych rozcieńczeń ( $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ) wysiewano na płytki z podłożem stałym M63 (20). Po 48 godzinach inkubacji w temp. 30°C, liczono pojedyncze kolonie bakteryjne. Na tej podstawie wyliczano liczbę bakterii zasiedlających 1 gram tkanki oraz liczbę bakterii w miejscu inokulacji (liczba bakterii w 1 g tkanki  $\times$  waga zmacerowanej tkanki) (7).

### **2.4. Oznaczenia aktywności liazы kwasu poligalakturonowego (PL) i $\beta$ -glukuronidazy (GUS)**

Aktywność PL i GUS oznaczano w zmacerowanej tkance i w 24-godzinnych kulturach różnych szczepów *E. chrysanthemi* hodowanych w pożywce M63 z dodatkiem 0,25% kwasu poligalakturonowego, stosowanego jako induktor ekspresji genów kodujących liazы kwasu poligalakturonowego (24,25). Oznaczenia aktywności PL oraz GUS wykonywano w toluenizowanych zawiesinach komórek bakteryjnych lub w toluenizowanych homogenatach zmacerowanej tkanki. Pomiary wykonywano stosując spektrofotometr wyposażony w program Kinetic/Time pozwalający na automatyczny pomiar przyrostów absorbancji w trakcie trwania reakcji enzymatycznej.

Mieszanka reakcyjna do pomiaru aktywności PL zawierała 0,05% kwas poligalakturonowy i toluenizowany ekstrakt z zawiesiny bakterii. Aktywność PL oznaczano mierząc ilość nienasyconych produktów degradacji kwasu poligalakturonowego (20). Aktywność specyficzna PL w badanej zawieszynie bakteryjnej równa jest ilości  $\mu$ moli nienasyconych oligogalakturonidów wytworzonych w ciągu 1 minuty przez 1 mg suchej masy bakterii.

Aktywność GUS oznaczano stosując jako substrat *p*-nitrofenylo- $\beta$ -glukuronid (PNPU). Aktywność  $\beta$ -glukuronidazy oznaczano mierząc tempo degradacji PNPU do *p*-nitrofenolu (26). Aktywność specyficzną GUS wyrażano w nanomolach *p*-nitrofenolu uwolnionego w ciągu 1 minuty przez 1 mg suchej masy bakterii.

### 3. Wyniki

We wcześniejszych badaniach nad rolą głównych izoenzymów liazy kwasu poligalakturonowego w patogenezie wykazano, że żaden z nich nie jest niezbędny do rozwoju procesu chorobowego (10-13,19,22). Mutanty pozbawione genów warunkujących biosyntezę 5 głównych liaz w dalszym ciągu wykazywały zdolność do maceracji tkanki bulw ziemniaka i innych roślin. W latach 1995-1997 klonowano trzy geny kodujące drugorzędowe liazy kwasu poligalakturonowego *pelL*, *pelZ*, *pell*, a następnie wprowadzono do nich *in vitro* kasety zawierające pozbawiony promotora gen reporterowy *uidA* kodujący  $\beta$ -glukuronidazę. W wyniku rekombinacji homologicznej zmutowane geny wprowadzono do chromosomu bakteryjnego i w ten sposób uzyskano mutanty niezdolne do produkcji poszczególnych izoenzymów liazy kodowanych przez zmutowane geny (7-9,20).

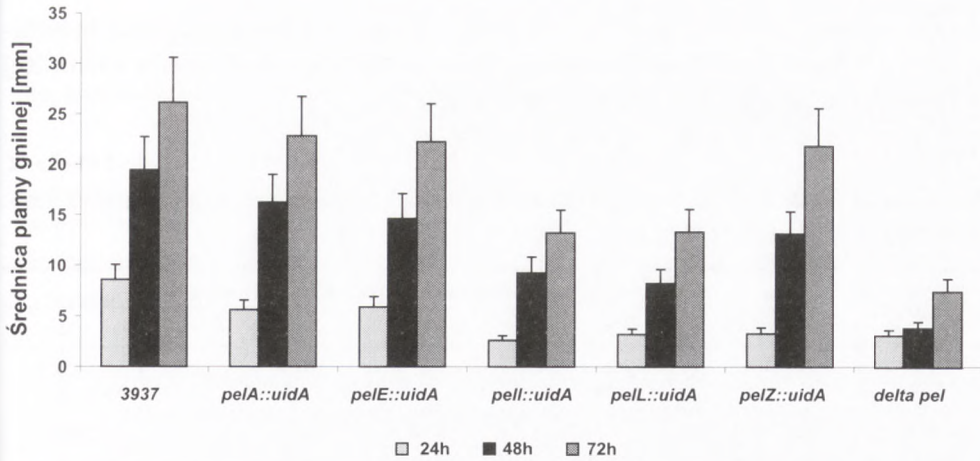
Uzyskanie opisanych mutantów umożliwiło badania nad rolą poszczególnych liaz drugorzędowych: PLi, PLI, PLz w patogenezie. W uzyskanych mutantach aktywność PL odzwierciedla sumę aktywności nie zmutowanych genów *pel*, natomiast aktywność GUS odzwierciedla ekspresję zmutowanego genu *pel*. W przedstawianej pracy dla celów porównawczych równolegle wykonano badania na dwóch szczepach *E. chrysanthemi* zawierających mutacje w genach kodujących liazy główne (*pelA* i *pelE*) oraz szczepie z delecją pięciu głównych izoenzymów *pel*, tzw. *delta pel*.

#### 3.1. Porównanie patogeniczności szczepu dzikiego *E. chrysanthemi* 3937 oraz mutantów z fuzją w pojedynczych genach *pel*

Bulwy ziemniaka inokulowano zawiesiną bakterii następujących szczepów: *E. chrysanthemi* 3937, *pelA::uidA*, *pelE::uidA*, *pell::uidA*, *pellL::uidA*, *pelZ::uidA* i *delta pel*. Zdolność do maceracji tkanki bulw ziemniaka oznaczano mierząc średnicę plamy gnilnej uzyskanej w wyniku inokulacji 10 bulw zawiesinami bakterii każdego z badanych szczepów. Prezentowane wyniki stanowią średnią arytmetyczną z czterech niezależnych doświadczeń.

Rozwój procesu chorobowego, mierzony średnicą plamy gnilnej, postępuje liniowo dla szczepu dzikiego i mutantów z fuzją w pojedynczych genach *pel*. Obserwowano wolniejsze rozprzestrzenianie się infekcji w przypadkach genów *pell* i *pellL* (rys. 1).

Szczepy z fuzjami w genach kodujących główne liazy kwasu poligalakturonowego *pelA::uidA* i *pelE::uidA* powodują macerację tkanki bulw ziemniaka na poziomie



Rys. 1. Porównanie patogeniczności szczepu dzikiego *E. chrysanthemi* i mutantów nie wytwarzających pojedynczych izoenzymów liazy kwasu poligalakturonowego.

podobnym, jak szczep dziki. Mutanty z fuzją w genach warunkujących biosyntezę liaz drugorzędowych (*pell::uidA*, *pell::uidA*, *pelZ::uidA*) wykazują słabszą zdolność do maceracji tkanki w ciągu pierwszych 24 godzin po inokulacji, niż szczep dziki.

Pewne zróżnicowanie patogeniczności szczepów z mutacjami w genach *pel* warunkujących biosyntezę liaz drugorzędowych obserwowano w 48 godzinie po inokulacji. Mutant *pelZ::uidA* maceruje tkankę bulw ziemniaka w stopniu podobnym, jak mutanty *pelA::uidA* i *pelE::uidA*, natomiast patogeniczność szczepów *pell::uidA* i *pell::uidA* jest wyraźnie niższa (rys. 1). Po kolejnych 24 godzinach zdolność do maceracji tkanki bulw ziemniaka przez mutantą *pelZ::uidA* nie różni się istotnie od zdolności maceracji szczepu dzikiego i szczepów z fuzjami w genach *pelA* i *pelE*. W przypadku mutantów *pell::uidA* i *pell::uidA* stwierdzono około 50% redukcję zdolności do maceracji tkanki. Zdecydowanie najniższą patogeniczność wykazywał szczep *delta pel* nie produkujący szeregu izoenzymów liazy kwasu poligalakturonowego (PLa, PLb, PLc, PLd, PLe, PLz).

### 3.2. Aktywność liazy kwasu poligalakturonowego w inokulowanej tkance bulw ziemniaka

Aktywność PL w tkance bulw inokulowanych szczepem dzikim i mutantami *pel* roślinie w ciągu trzech dni po inokulacji. Porównując aktywności liazy kwasu poligalakturonowego w tkance inokulowanej różnymi szczepami wykazano, że mutanty z fuzją w genach *pell::uidA*, *pell::uidA* oraz *pelZ::uidA* mają znacznie obniżony poziom aktywności PL w stosunku do szczepu dzikiego. Szczepy z fuzją w genach *pelA* i *pelE* kodujących główne izoenzymy liazy kwasu poligalakturonowego nie wykazują ob-

niżenia aktywności PL w stosunku do szczepu dzikiego po 24 godzinach od inokulacji. W przypadku mutantu *pelA::uidA* obserwowano natomiast obniżenie całkowitej aktywności PL w dalszych etapach infekcji (tab. 2).

Tabela 2

Porównanie aktywności liazy kwasu poligalakturonowego w tkance infekowanej różnymi mutantami *E. chrysanthemi*

| Szczep:           | Aktywność PL w poszczególnych etapach infekcji [jedn./g tk.] |      |      |      |       |       |       |
|-------------------|--|------|------|------|-------|-------|-------|
|                   | 8 h  | 12 h | 16 h | 20 h | 24 h  | 48 h  | 72 h  |
| 3937              | 0,9  | 7,3  | 22,9 | 86,2 | 110,9 | 239,1 | 331,3 |
| <i>pelA::uidA</i> | 1,5  | 3,3  | 16,5 | 64,6 | 94,3  | 98,3  | 150,4 |
| <i>pelE::uidA</i> | 0,1  | 1,6  | 22,4 | 67,4 | 68,5  | 216,0 | 229,4 |
| <i>pelI::uidA</i> | 1,0  | 2,9  | 10,5 | 26,7 | 40,1  | 53,7  | 75,8  |
| <i>pelL::uidA</i> | 0,7  | 1,5  | 8,2  | 23,7 | 45,0  | 65,3  | 61,5  |
| <i>pelZ::uidA</i> | 1,3  | 4,5  | 23,2 | 43,4 | 72,0  | 76,4  | 75,8  |

Odchylenie standardowe < 10%

Mutacja w genach kodujących drugorzędowe izoenzymy liazy kwasu poligalakturonowego (PLi, PLl i PLz) znacząco wpływają na ekspresję genów warunkujących syntezę pozostałych izoenzymów, w efekcie obserwowano istotne obniżenie aktywności PL w przypadku inokulacji tkanki tymi szczepami. Świadczy to o istotnej roli liaz drugorzędowych w regulacji procesu syntezy głównych izoenzymów liazy kwasu poligalakturonowego.

Niska całkowita aktywność PL mutantów *pelI::uidA* i *pelL::uidA* w inokulowanej tkance bulw ziemniaka jest przyczyną obniżonej zdolności tych mutantów do maceracji tkanki bulw (rys. 1 i tab. 2). Podobnej zależności nie obserwowano w przypadku szczepu z fuzją w genie *pelZ*. Znaczna redukcja aktywności PL, tylko w pierwszej fazie infekcji nie powoduje spadku zdolności tego mutantu do maceracji tkanki bulw ziemniaka (rys. 1 i tab. 2).

### 3.3. Ekspresja genów *pel* w inokulowanej tkance bulw ziemniaka

Ekspresję genów *pel* badano w mutantach zawierających fuzję transkrypcyjną tych genów z genem reporterowym *uidA* kodującym  $\beta$ -glukuronidazę. Oznaczenia aktywności  $\beta$ -glukuronidazy prowadzono w toluenizowanych ekstraktach tkankowych, izolowanych 8, 12, 16, 20, 24, 48 i 72 godziny po inokulacji bulw ziemniaka.

Obserwowano zróżnicowany poziom ekspresji genów poszczególnych izoenzymów pierwszo- i drugorzędowych w inokulowanej tkance bulw ziemniaka (tab. 3). W ciągu pierwszych 8 godzin po inokulacji ekspresja genów warunkujących biosyn-

też wszystkich izoenzymów jest bardzo słaba. Nieznaczne zróżnicowanie poziomu ekspresji badanych fuzji w pierwszych 20 godzinach po inokulacji, nie odzwierciedla podziału izoenzymów na główne i drugorzędowe.

Tabela 3

Porównanie ekspresji poszczególnych genów *pel* wyrażonej aktywnością  $\beta$ -glukuronidazy w zainfekowanych bulwach ziemniaka

| Szczep:           | Aktywność GUS w poszczególnych etapach infekcji [jedn./g tk.] |      |      |       |       |        |        |
|-------------------|---|------|------|-------|-------|--------|--------|
|                   | 8 h   | 12 h | 16 h | 20 h  | 24 h  | 48 h   | 72 h   |
| <i>pelA::uidA</i> | 8,7   | 2,2  | 14,7 | 35,1  | 18,2  | 68,8   | 57,7   |
| <i>pelE::uidA</i> | 20,4  | 10,2 | 69,3 | 356,8 | 86,2  | 269,8  | 1654,4 |
| <i>pell::uidA</i> | 12,4  | 1,8  | 27,1 | 223,5 | 56,4  | 254,4  | 2638,9 |
| <i>pelL::uidA</i> | 6,2   | 8,0  | 8,0  | 36,4  | 430,6 | 2734,4 | 189,9  |
| <i>pelZ::uidA</i> | 4,0   | 1,3  | 16,4 | 27,5  | 229,0 | 1241,1 | 162,2  |

Odchylenie standardowe < 15%

W tym czasie ekspresja genu *pelE* kodującego główną liazę zachodzi na poziomie podobnym, jak w przypadku ekspresji genu *pell* warunkującego syntezę liazy drugorzędowej. W przypadku genu *pelA* obserwowany poziom ekspresji był podobny do ekspresji genów kodujących liazy drugorzędowe *pell* i *pelZ* (tab. 3). Ponadto, porównanie ekspresji genów liaz głównych *pelA* i *pelE* wskazuje, że poziom ekspresji genu *pelA* jest około 2 razy niższy niż genu *pelE* w pierwszych 8 godzinach po inokulacji, różnica ta zwiększa się w dalszych etapach rozwoju infekcji (tab. 3). Podobnie zróżnicowany poziom aktywności  $\beta$ -glukuronidazy obserwowano w przypadku genów kodujących drugorzędowe liazy. Aktywność  $\beta$ -glukuronidazy w przypadku fuzji *pell::uidA* jest średnio około 2,5-raza wyższa, niż dla fuzji *pell::uidA* i *pelZ::uidA*. Poziom ekspresji genu *pelA* w pierwszych 16 godzinach po inokulacji, jest bardziej zbliżony do ekspresji genów kodujących drugorzędowe izoenzymy (tab. 3).

Poziom ekspresji genów *pel* w 24 godziny po inokulacji wskazuje na znaczące zróżnicowanie ekspresji genów poszczególnych izoenzymów. Ekspresja genów *pelA*, *pell* i *pelZ* jest około 10-krotnie niższa, niż ekspresja genów *pelE* i *pell* (tab. 3). W dalszych godzinach rozwoju infekcji poziom ekspresji genów *pelE*, *pell* i *pelZ* wzrasta osiągając maksimum po dwóch dobach od inokulacji. Ekspresja genu *pelA* jest znacznie słabsza i również osiąga maksimum 48 godzin po inokulacji. Natomiast ekspresja genu *pell* wzrasta przez cały czas trwania doświadczenia (tzn. do 72 godzin od momentu zakażenia) (tab. 3).

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że pod koniec doświadczenia, 72 godziny po inokulacji, ekspresja genów *pelE* i *pell* jest około 10-krotnie wyższa niż ekspresja genów *pelA*, *pell* i *pelZ*.



### 3.4. Porównanie aktywności PL i ekspresji genów *pel* w inokulowanej tkance bulw ziemniaka i w zawieszynie bakteryjnej

Aktywność PL i ekspresję genów *pel* w inokulowanej tkance bulwie ziemniaka porównano z aktywnością i ekspresją w zawieszynie bakterii hodowanych w pożywce M63 zawierającej glicerol i kwas poligalakturonowy, uważany za induktor ekspresji genów kodujących liazy kwasu poligalakturonowego (20). Zarówno całkowita aktywność liazy kwasu poligalakturonowego, jak i ekspresja poszczególnych fuzji *pel::uidA*, były znacznie wyższe w tkance bulw ziemniaka. Całkowita aktywność PL (określana dla szczepu dzikiego 3937) w inokulowanej bulwie ziemniaka jest ponad 5-krotnie wyższa, niż w pożywce syntetycznej zawierającej PGA (tab. 4). Dla szczepu z fuzją w genie *pelA* obserwowano aż 57-krotną indukcję aktywności PL w tkance bulw. Podobną, jak w przypadku szczepu dzikiego, indukcję aktywności PL w tkance obserwowano dla szczepów z fuzjami w genach *pelE* i *pelL*, natomiast w przypadku szczepów z fuzjami w genach *pell* i *pelZ* nie obserwowano indukcji aktywności PL w tkance bulw w porównaniu z aktywnością PL w pożywce syntetycznej z dodatkiem PGA (tab. 4).

Porównanie poziomu ekspresji poszczególnych genów *pel* w hodowli bakterii na pożywce mineralnej zawierającej glicerol i PGA i w inokulowanej tkance roślinnej pozwoliło na wykazanie, że indukcja ekspresji fuzji *pelA::uidA*, *pelE::uidA* oraz *pelZ::uidA in planta* jest kilkukrotnie wyższa (tab. 4). Znacznie większe różnice stwierdzono gdy porównano ekspresję genów *pell* i *pelL* w hodowli bakteryjnej i w inokulowanej tkance. W tym przypadku średni poziom ekspresji był około 10 razy wyższy w tkance bulw ziemniaka (tab. 4).

Tabela 4

Współczynnik indukcji aktywności specyficznej pl i gus szczepu dzikiego *E. chrysanthemi* i mutantów z fuzją *uidA* w genach *pelA*, *pelE*, *pell*, *pelL*, *pelZ*

| Szczep            | Indukcja aktywności PL |             |      | Indukcji ekspresji poszczególnych fuzji |             |      |
|-------------------|------------------------|-------------|------|---|-------------|------|
|                   | AS PL [jedn./g s.m.b]  |             | WI   | AS GUS [jedn./g s.m.b]                  |             | WI   |
|                   | M63 + PGA              | tkanka bulw |      | M63 + PGA                               | tkanka bulw |      |
| 3937              | 1,1                    | 5,6         | 5,6  | –                                       | –           | –    |
| <i>pelA::uidA</i> | 0,2                    | 8,9         | 57,0 | 9,8                                     | 60,0        | 6,0  |
| <i>pelE::uidA</i> | 1,0                    | 5,1         | 4,8  | 319,7                                   | 1742,0      | 5,4  |
| <i>pelL::uidA</i> | 1,4                    | 2,4         | 1,7  | 221,0                                   | 2114,0      | 10,0 |
| <i>pell::uidA</i> | 0,6                    | 2,2         | 3,6  | 50,3                                    | 431,0       | 8,6  |
| <i>pelZ::uidA</i> | 3,3                    | 2,4         | 0,7  | 50,2                                    | 224,0       | 4,5  |

AS – aktywność specyficzna PL lub GUS, WI – współczynnik indukcji aktywności PL lub GUS.  
Odchylenie standardowe < 10%

#### 4. Dyskusja

Mimo że badania nad ekspresją poszczególnych genów *pel* w tkance roślinnej prowadzone w warunkach laboratoryjnych, są zawsze pewnym uproszczeniem, a zachodzące w tych warunkach oddziaływanie między tkanką roślinną a patogenem nie odzwierciedlają w pełni sytuacji w warunkach naturalnych, badania te mogą dostarczyć informacji, których uzyskanie w naturalnym środowisku byłoby niemożliwe. W prezentowanych badaniach posłużono się dokładnie zdefiniowanym i stworzonym w określonym celu układem modelowym. Model ten miał pozwolić na badanie roli drugorzędowych izoenzymów liazy kwasu poligalakturonowego w patogenezie. Dlatego też inokulację bulw prowadzono stosując dobrze namnażające się populacje szczepu dzikiego i mutantów, a warunki inkubacji inokulowanych bulw sprzyjały rozwojowi infekcji.

Patogeniczność bakterii z gatunku *E. chrysanthemi* związana jest z wytwarzaniem, przez te bakterie, szeregu enzymów degradujących pektynowe składniki roślinnych ścian komórkowych (1-4, 27,28). We wcześniejszych badaniach koncentrowano się na regulacji ekspresji i roli głównych izoenzymów liazy kwasu poligalakturonowego (PLa, PLb, PLc, PLd i Ple) w patogenezie (11,12,20). Zdolność do maceracji tkanki roślinnej przez mutanty *E. chrysanthemi*, które nie wytwarzały poszczególnych liaz kwasu poligalakturonowego, badano na wielu roślinach (11,12,19,21) spośród których tkanka bulw ziemniaka, jak się okazało, była szczególnie przydatna do tego rodzaju badań (10,13).

Prezentowane w przedstawianej pracy wyniki dotyczą przede wszystkim regulacji ekspresji i roli liaz drugorzędowych: PLi, PLl i PLz w patogenezie. Określenie wymienionych izoenzymów liazy kwasu poligalakturonowego mianem drugorzędowych, związane jest z ich niską aktywnością w zawiesinie bakterii rosnących w pożywce syntetycznej (19). Sklonowanie genów kodujących liazy drugorzędowe i wprowadzenie do kodującej je sekwencji genu reporterowego *uidA* pozwoliło na wykazanie roli tych izoenzymów w rozwoju procesu chorobowego wywołanego przez bakterie z rodzaju *E. chrysanthemi*.

Wcześniejsze badania zdolności do maceracji tkanki bulw ziemniaka dotyczyły mutantów pozbawionych aktywności jednego lub kilku głównych izoenzymów liazy kwasu poligalakturonowego. Dezaktywacja pojedynczego genu kodującego jeden z głównych izoenzymów (*pelA*, *pelB*, *pelC*, *pelD*, *pelE*) nie wpływała znacząco na zdolność mutantu *E. chrysanthemi* do maceracji tkanki bulw ziemniaka (12). Szczep *E. chrysanthemi* z wyciętymi pięcioma genami kodującymi główne izoenzymy, nadal jest zdolny do maceracji tkanki (19,29). Fakt ten sugerował istotną rolę liaz drugorzędowych w procesie maceracji tkanki bulw ziemniaka. W przeprowadzonych badaniach potwierdzono znaczenie liaz PLi i PLl w patogenezie. Mutanty, z fuzjami w pojedynczych genach kodujących liazy drugorzędowe: *pell::uidA*, *pell::uidA*, wykazywały znacznie obniżoną zdolność maceracji tkanki bulw ziemniaka w porównaniu do szczepu dzikiego (rys. 1). Już we wcześniejszych badaniach wstępnych wykaza-

no, że wyłączenie genu *pell*, powoduje znaczne obniżenie zdolności do wywołania objawów chorobowych na sępolii (7). Sprzeczne wyniki uzyskiwano dla pozostałych genów; fuzje w genach *pell* i *pelZ* nie obniżały patogeniczności mutantów na sępolii natomiast wywoływały znacznie słabsze objawy chorobowe na cykorii (8,9).

Porównując całkowitą aktywność liazy kwasu poligalakturonowego w zainfekowanej przez szczepy z mutacją w genach *pell*, *pell* i *pelZ* tkance bulw ziemniaka wykazano, że dezaktywacja tych genów powoduje około 70% redukcję aktywności PL w stosunku do szczepu dzikiego. W przypadku szczepów z mutacją w genach kodujących liazy główne obserwowano znacznie mniejsze obniżenie aktywności PL (12). Uzyskane wyniki skłaniają do wniosku, że brak aktywności drugorzędowych liaz kwasu poligalakturonowego PLi i PLl wpływa na ekspresję pozostałych izoenzymów, zarówno głównych, jak i drugorzędowych. Drugorzędowe liazy PL uczestniczą prawdopodobnie w pierwszych etapach degradacji pektyn zawartych w roślinnych ścianach komórkowych i uwalniają z nich induktory pozwalające na syntezę lub efektywne działanie innych enzymów pektynolitycznych. Z wcześniejszych prac wynika, że synteza pektynaz jest indukowana przez obecność w pożywce produktów degradacji pektyn lub kwasu poligalakturonowego (14,15,25).

Warunki w jakich działają poszczególne izoenzymy mogą oddziaływać na specyficzne właściwości liaz. Jednym z powodów istotnej roli liazy PLi w patogenezie jest zapewne efektywne działanie tego enzymu w środowisku zawierającym wysokie stężenie jonów wapnia (0,6 mM). Liaza PLi może w efekcie uczestniczyć pośrednio w przerywaniu mostków wapniowych w łańcuchach kwasu poligalakturonowego czyniąc je dostępnymi dla innych liaz (9). Istotna rola liazy PLl w pierwszych etapach infekcji może wynikać stąd, że izoenzym ten działa na zmetylowany w wysokim procencie kwas poligalakturonowy (degraduje PGA zmetylowane w 68%), (7). Natomiast liazy główne, jak i liazy PLi i PLz, zdecydowanie preferują jako substrat kwas poligalakturonowy o niskim poziomie metylacji (7,30,31).

Analiza ekspresji poszczególnych genów *pel* w zainfekowanej tkance roślinnej pozwoliła na wyróżnienie dwóch grup genów *pel*: wykazujących wysoką (*pelE* i *pell*) i niską (*pelA*, *pell* i *pelZ*) ekspresję w zainfekowanej tkance. Poziom ekspresji poszczególnych genów *pel* w tkance bulw ziemniaka nie odpowiada proponowanemu wcześniej podziałowi na główne *pelA*, *pelB*, *pelC*, *pelD* i *pelE* i drugorzędowe (*pell*, *pell* i *pelZ*) (4,20,28,29).

W pożywce syntetycznej zawierającej PGA następuje indukcja ekspresji wszystkich badanych genów *pel*, z wyjątkiem *pelA*, a wskaźnik indukcji wynosi średnio około 2,5. Porównując ekspresję genów *pel* w hodowli bakteryjnej zawierającej PGA i zainfekowanej tkance roślinnej wykazano, że ekspresja wszystkich genów jest wyższa w zainfekowanej tkance (tab. 4). Współczynnik indukcji ekspresji genów *pell* i *pell* w inokulowanej tkance bulw ziemniaka osiąga wartość 10, natomiast ekspresja genów *pelA*, *pelE* i *pelZ* wzrasta średnio około 5-krotnie (tab. 4) w porównaniu do pożywki mineralnej uzupełnionej PGA. W dodatkowych, nie prezentowanych wyni-

kach wykazano, że także dodatek do pożywki mineralnej ekstraktu z bulw ziemniaka powoduje tylko około 2,5-krotny wzrostu ekspresji genów *pel*.

Natomiast, w przypadku genów *pell* i *pell*, stwierdzono wysoki poziom indukcji ekspresji tych genów w zainfekowanej tkance roślinnej, co jest charakterystyczne dla genów liaz kwasu poligalakturonowego indukowanych w wyniku interakcji z rośliną – tzw. *plant-inducable pectate lyase gene* (29). Mutacje w genach *pell* i *pell* powodują znaczne obniżenie zdolności wywoływania procesu maceracji tkanki, co wyraźnie wskazuje na istotną rolę tych dwóch izoenzymów drugorzędowych w patogenie mokrej zgnilizny powodowanej przez *E. chrysanthemi* na bulwach ziemniaka.

W przeprowadzonych badaniach zwrócono uwagę na ograniczony efekt działania kwasu poligalakturonowego i ekstraktu roślinnego na indukcję ekspresji genów *pel*, w porównaniu do warunków istniejących w zainfekowanej tkance roślinnej. Prawdopodobnie, czynniki środowiskowe lub specyficzny składnik(i) tkanki roślinnej tracony w trakcie ekstrakcji odgrywają istotną rolę w procesie indukcji genów *pel*. Na podstawie uzyskanych wyników wysunięto wnioski, że geny *pell* i *pell*, których indukcja ekspresji jest znacznie wyższa w zainfekowanej tkance roślinnej niż w hodowli bakteryjnej, należą do genów indukowanych w wyniku interakcji roślina-patogen czyli tzw. *plant inducable pectate lyases*.

## Literatura

1. Basham H. G., Bateman D. F., (1975), *Physiol. Plant Pathol.*, 5, 249-262.
2. Collmer A., Keen N. T., (1986), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 24, 383-409.
3. Kotoujansky A., (1987), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 25, 405-430.
4. Barras F., Gijsegem F., Chatterjee A. K., (1994), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32, 201-234.
5. Reverchon S., van Gijsegem F., Rouve M., Kotoujansky A., Robert-Baudouy J., (1986), *Gene*, 49, 215-224.
6. Alfano J. R., Ham H. H., Collmer A., (1995), *J. Bacteriol.*, 177, 4553-4556.
7. Łojkowska E., Masclaux C., Boccara M., Robert-Baudouy J., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., (1995), *Mol. Microbiol.*, 16, 1183-1195.
8. Pissavin C., Baudouy J., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., (1996), *J. Bacteriol.*, 178, 7187-7196.
9. Shevchik V. E., Baudouy J., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., (1997), *J. Bacteriol.*, 179, 7321-7330.
10. Beaulieu, C., van Gijsegem, F., (1992). *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5, 340-346.
11. Boccara M., Dioloz A., Rouve M., Kotoujansky A., (1988), *Physiol. Mol. Plant. Pathol.*, 33, 95-104.
12. Łojkowska E., Dorel C., Reignaul P., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Robert-Baudouy J., (1993), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6, 488-494.
13. Dorel C., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Robert-Baudouy J., Łojkowska E., (1996), *Eur. J. Plant Pathol.*, 102, 511-517.
14. Reverchon S., Robert-Baudouy J., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 2417-2423.
15. Reverchon S., Nasser W., Robert-Baudouy J., (1991), *Mol. Microbiol.*, 5, 2203-2216.
16. Reverchon S., Nasser W., Robert-Baudouy J., (1994), *Mol. Microbiol.*, 11, 1127-1139.
17. Reverchon S., Bouillant M. L., Salmond G. P.C., Nasser W., (1998), *Mol. Microbiol.*, 29, 1407-1418.
18. Nasser W., Reverchon S., Condemine G., Baudouy J., (1994), *J. Mol. Biol.*, 236, 427-440.
19. Beaulieu C., Boccara M., van Gijsegem F., (1993), *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 6, 197-202.
20. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Dominguez H., Baudouy J., (1992), *J. Bacteriol.*, 174, 7807-7818.

21. Masclaux C., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Expert D., (1996), *Mol. Plant-Microb. Interact.*, 9, 198-205.
22. Jafra S., Figura I., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Łojkowska E., (1999) *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 12, 845-851.
23. Maher E. A., Kelman A., (1983), *Phytopathology*, 73, 536-539.
24. Moran F., Nasuno S., Starr M. P., (1968), *Arch. Biochem. Biophys.*, 123, 293-306.
25. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Robert-Baudouy J., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 1223-1231.
26. Bardonnat N., Blanco C., (1992), *FEMS Microbiol. Lett.*, 93, 243-248.
27. Łojkowska E., (1992), *Post. Mikrobiol.*, 31, 227-238.
28. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Condemine G., Nasser W., Reverchon S., (1996), *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 213-257.
29. Kelemu S., Collmer A., (1993), *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1756-1761.
30. Pissavin C., Robert-Baudouy J., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., (1998), *Bioch. Biophys. Acta*, 1383, 188-196.
31. Tardy F., Nasser W., Robert-Baudouy J., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., (1997), *J. Bacteriol.*, 8, 2503-2511.