

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Ким Дебора

**Структура гликополимеров клеточной стенки как
хемотаксономический признак актинобактерий рода *Clavibacter***

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель – *Тульская Елена Михайловна*, доктор биологических наук, старший научный сотрудник

Официальные оппоненты – *Степанов Алексей Львович*, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», факультет почвоведения, кафедра биологии почв, заведующий кафедрой

Коннова Светлана Анатольевна, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», биологический факультет, кафедра биохимии и биофизики, заведующая кафедрой

Мулюкин Андрей Львович, доктор биологических наук, ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского, руководитель ЦКП «Коллекция UNIQEM», ведущий научный сотрудник

Защита диссертации состоится «04» июня 2024 г. в 15 часов 30 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: nykostina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/2983>

Автореферат разослан «26» апреля 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. Гликополимеры клеточной стенки, ковалентно связанные с пептидогликаном и расположенные на поверхности клетки, играют важную роль в различных процессах жизнедеятельности микробной клетки (Brown et al., 2013). Они участвуют в создании отрицательного заряда на поверхности клетки; играют ключевую роль в процессах межклеточного узнавания; будучи небелковыми адгезинами, способствуют адгезии бактерий при их связывании с комплементарными углеводами на поверхности тканей организма-хозяина; определяют иммуноспецифичность микробных клеток; используются в качестве компонентов вакцин, адъювантов, противоопухолевых препаратов, неспецифических стимуляторов (Weidenmaier et al., 2008; Wang et al., 2014; Тоукач, 2019).

Гликополимеры клеточных стенок грамположительных бактерий, ассоциированных с высшими организмами, привлекают внимание исследователей в связи с их участием в колонизации и инфицировании организма-хозяина (Schade, Weidenmaier, 2016). Изучение особенностей строения и компонентного состава гликополимеров имеет важное значение для аннотации геномов, понимания их физиологических функций и биологических свойств, в том числе, молекулярных механизмов взаимодействия бактерий с клетками макроорганизма и разработки методов борьбы с патогенами (Peltier et al., 2008). Изучение структур гликополимеров представляет интерес для ряда областей фундаментальной и прикладной науки, в частности, таксономии микроорганизмов. На современном этапе совершенствования классификации микроорганизмов, и, в частности, актинобактерий, используют полифазный подход. Наряду с методами геносистематики по-прежнему необходимым остается изучение фенотипических признаков, в том числе, состав сахаров и гликополимеров клеточной стенки (Stackebrandt, 2006; Kämpfer, 2010; Ramasamy et al., 2014; Chun et al., 2018; Nouioui et al., 2018).

Имеющиеся в литературе сведения указывают на то, что состав, структуры и отдельные структурные компоненты гликополимеров могут быть специфичными для видов, родов и высших таксонов актинобактерий (Naumova et al., 2001; Schumann et al., 2009; Evtushenko, Ariskina, 2015; Nouioui et al., 2018; Shashkov et al., 2020; Potekhina et al., 2021).

Хемотаксономические признаки, такие как «дифференцирующие сахара целых клеток» и «состав сахаров клеточной стенки», отражающие, в том числе состав структурных компонентов гликополимеров клеточной стенки, используются в систематике различных групп актиномицетов с 60-х годов прошлого века (Cummins, 1962; Lechevalier, Lechevalier, 1970; Goodfellow, Jones, 2012). Для видов рода *Clavibacter* в качестве диагностических сахаров указывались, в частности, галактоза, манноза, рамноза и фукоза (Davis et al., 1984), в то время как гликополимеры клеточных стенок у представителей рода ранее **не были изучены**.

Таким образом, выявление и описание гликополимеров у не изученных в этом отношении актинобактерий представляют интерес в связи с оценкой их структурного разнообразия; распространения у различных микроорганизмов;

способствует пониманию механизмов взаимодействия бактерий внутри микробного сообщества и с внешней средой, включая высшие организмы (например, с организмом хозяина при патогенезе), а также в связи с возможностью их применения в хемотаксономии актинобактерий.

В рамках изучения биологического разнообразия актинобактерий, а также структурного разнообразия природных биополимеров, выполнена работа по изучению углеводного состава клеточных стенок фитопатогенных видов, а также новых представителей рода – претендентов на новый вид, из рода *Clavibacter*, не изученных в этом отношении ранее.

Цель и задачи работы. Цель настоящего исследования – изучение моносахаридного состава и структур гликополимеров клеточных стенок некоторых представителей рода *Clavibacter* и оценка таксономической значимости признака «состав и структура гликополимеров клеточных стенок» для бактерий этого рода.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить клеточные стенки достаточной степени чистоты из клеток изучаемых актинобактерий рода *Clavibacter*.

2. Выявить в составе клеточных стенок набор моносахаридов, органических кислот, наличие/отсутствие фосфатсодержащих гликополимеров.

3. Получить препараты гликополимеров из клеточных стенок методами, обеспечивающими наиболее полное их извлечение.

4. Проанализировать полученные препараты гликополимеров клеточных стенок химическими методами (наличие/отсутствие фосфатсодержащих гликополимеров, моносахаридный состав, присутствие органических кислот, установление конфигурации моносахаридов).

5. Провести разделение гликополимеров методами гель-хроматографии.

6. Изучить структуры гликополимеров методами ЯМР-спектроскопии, проанализировать полученные данные, сравнив их с уже имеющимися в базах данных.

7. Провести сравнительный анализ структур гликополимеров у всех исследованных штаммов и сделать заключение о возможности их использования в таксономии бактерий рода *Clavibacter*.

Объектами исследования были 9 штаммов актинобактерий из рода *Clavibacter* (семейство *Microbacteriaceae*): пять типовых штаммов (патогены: *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T, *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T и *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T), и четыре штамма-претендента на новый вид (эндофиты: *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374).

Предметом исследования явилось сравнительное изучение химического состава и структур гликополимеров клеточных стенок 9 штаммов актинобактерий рода *Clavibacter*.

Научная новизна исследования

• **Впервые** изучены структуры гликополимеров пяти типовых штаммов (*C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. nebraskensis* ВКМ

Ac-1404^T, *C. tessellarius* ВКМ Ac-1406^T и *C. phaseoli* ВКМ Ac-2641^T), и четырех штаммов-претендентов на новый вид (*Clavibacter* sp. ВКМ Ac-2555, *Clavibacter* sp. ВКМ Ac-1371, *Clavibacter* sp ВКМ Ac-1372, *Clavibacter* sp. ВКМ Ac-1374 определен и **уточнён состав** моносахаридов их клеточных стенок.

- **Впервые** установлено, что в состав клеточных стенок всех изучаемых актинобактерий входят по два бесфосфатных гликополимера, один из которых – пируватсодержащий галактоманнан. Во всех изученных клеточных стенках выявлен нейтральный (1→6)-связанный галактофуранан. Структуры галактофурананов различаются по топологии и моносахаридному составу бокового олигосахаридного остатка.

Все установленные в работе структуры гликополимеров описаны **впервые** для прокариотов.

- **Впервые** проведен сравнительный анализ состава и структур гликополимеров клеточных стенок представителей различных видов рода *Clavibacter* (результаты настоящей работы) с литературными данными (Li et al., 2018) по средней идентичности нуклеотидов (ANI) и цифровой ДНК-ДНК гибридизации (dDDH). Показано, что данные наших исследований хорошо согласуются с генетическими данными и полученными ранее фенотипическими характеристиками этой группы фитопатогенных актинобактерий, что поддерживает реклассификацию каждого из подвидов *C. michiganensis* до видового статуса.

- **Впервые** установлено, что состав и структуры гликополимеров и их структурные компоненты (определяемые в кислотных гидролизатах клеточных стенок) могут служить хемотаксономическими маркерами рода и видов *Clavibacter*.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные имеют важное теоретическое значение, поскольку расширяют представления о структурном разнообразии поверхностных гликополимеров и биосинтетическом потенциале микроорганизмов, в частности, актинобактерий. Кроме того, полученные данные о химическом составе и особенностях строения полимеров клеточной стенки могут служить основой для дальнейших исследований молекулярных механизмов взаимодействия бактерий с клеткой растения-хозяина и разработки методов борьбы с фитопатогенами.

Полученные данные могут быть использованы для создания более полной системы идентификации патогенов растений. Признак “наличие и структура гликополимеров клеточной стенки”, а также таксономическая специфичность некоторых структурных элементов, могут быть успешно применены в повседневной микробиологической практике при идентификации и описании новых представителей рода *Clavibacter*.

Результаты проведенных исследований пополняют базу данных Carbohydrate Structure Database (CSDB, веб-портал <http://csdb.glycoscience.ru>) по углеводам прокариот, грибов и растений, что внесёт определённый вклад в гликологию, гликоинформатику и химическую микробиологию, и может быть использовано при анализе структур близких биополимеров другими исследователями.

Методология и методы исследования. Автором выполнен анализ современной литературы по исследуемой теме на русском и английском языках. На основании данных литературы было проведено планирование экспериментов. В работе использовали современные микробиологические и физико-химические методы. Полученные данные были собраны, проанализированы и изложены в тексте данной работы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Все исследованные штаммы рода *Clavibacter* содержат в клеточных стенках галактозу и маннозу. Штаммы *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T содержат также глюкозамин; штаммы *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T и *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T – фукозу и рамнозу; штаммы *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374 – рибозу.

2. Клеточные стенки всех изученных представителей рода *Clavibacter* содержат по два бесфосфатных гликополимера с новыми, не описанными ранее, структурами. Первый – идентичный для всех штаммов пирувилированный (частично ацетилированный у некоторых штаммов) галактоманнан, второй – (1→6)-связанный галактофуранан, различающийся у разных штаммов структурой ди-, три- или тетрасахаридных заместителей.

3. Пирувилированный галактоманнан и (1→6)-связанный β-D-галактофуранан могут рассматриваться как признак, характерный для представителей рода *Clavibacter*.

4. Признаком, дифференцирующим виды *Clavibacter* являются особенности строения боковых ди- три- и тетрасахаридных заместителей в структуре галактофуранана.

Степень достоверности и апробация результатов работы. При выполнении диссертационного исследования использованы современные и адекватные поставленным задачам микробиологические, физико-химические методы. Достоверность представленных данных подтверждается достаточным количеством повторностей при проведении экспериментов. При написании обзора литературы и обсуждении результатов использованы современные источники по теме исследования в рецензируемых журналах. Достоверность полученных результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и международных журналах. Результаты диссертации были представлены на следующих международных и российских конференциях: 1) «1-й Российский микробиологический конгресс» (Пушино, 2017); 2) «Микробиология: вопросы экологии, физиологии, биотехнологии» (Москва, 2019); 3) «Ломоносов» (Москва, 2020, 2021); 4) «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пушино, 2021); 5) «3-й Российский микробиологический конгресс» (Псков, 2021).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 5 статей в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.

Ломоносова. В статьях, опубликованных в соавторстве, существенный и принципиальный вклад принадлежит соискателю.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 126 страницах и состоит из введения, пяти глав, включающих: обзор литературы (главы I и II); краткой характеристики объектов и методов исследований (глава III); изложения результатов собственных исследований (глава IV) и их обсуждения (глава V), а также общего заключения и выводов. Работа содержит 16 таблиц, 50 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 143 ссылки (из них 129 на английском языке).

Личный вклад автора. Личное участие автора заключалось в сборе и анализе литературных источников по теме исследования, определении цели работы, выполнении экспериментальных исследований, включая получение клеточных стенок, анализ клеточных стенок, выделение препаратов гликополимеров из клеточных стенок, их очистка и анализ гликополимеров клеточных стенок, пробоподготовка к инструментальным анализам (ГЖХ, ЯМР-спектроскопия), обобщении результатов и сравнении полученных данных с опубликованными в литературе, написании статей и тезисов, представлении результатов работы на конференциях.

Благодарности. Автор выражает глубокую признательность всему профессорско-преподавательскому составу кафедры микробиологии за знания и навыки, которые удалось приобрести за время обучения.

Автор благодарит: сотрудников ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН, отдел «Всероссийская коллекция микроорганизмов» д.б.н. Евтушенко Людмилу Ивановну за ценные консультации и к.б.н. Дорофееву Любовь Владимировну за подбор штаммов и выращивание биомассы изучаемых актинобактерий и сотрудников Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН – д.х.н. Александра Степановича Шашкова, к.х.н. Андрея Сергеевича Дмитренко, к.х.н. Софию Николаевну Сенченкову и к.х.н. А.В. Перепелова за подготовку образцов к ЯМР-спектроскопическому исследованию, а также съемку и расшифровку ЯМР-спектров; сотрудников группы биохимиков кафедры микробиологии д.б.н. Наталию Викторовну Потехину и к.б.н. Галину Матвеевну Стрешинскую за доброжелательное отношение и готовность в любой момент оказать помощь.

Автор благодарит научного руководителя выполненной работы д.б.н. Елену Михайловну Тульскую за чуткое руководство, внимательное отношение, постоянный контроль за выполняемой работой.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. Обзор литературы состоит из двух глав. Глава I посвящена характеристике известных в настоящее время гликополимеров клеточных стенок грамположительных бактерий, в частности актинобактерий. Освещена биологическая роль гликополимеров в микробной клетке.

Глава II посвящена представителям рода *Clavibacter*, их морфологии, физиологии и экологии, образе жизни, факторах патогенности и мерах борьбы с фитопатогенами, а также современной классификации, основанной на генетических методах исследования.

В Главе III, Объекты и методы исследования. Информация о 9 изученных штаммах, источниках их выделения и патогенности содержится в Таблице 1. Штаммы получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина в Пушкино-на-Оке.

Культуры актиномицетов поддерживали в пробирках на агаризированных средах либо в лиофильно высушенном состоянии. В качестве посевной и основной использовали пептонно-дрожжевую среду (Potekhina et al., 2011) следующего состава (г/л): пептон – 5; глюкоза – 5; дрожжевой автолизат – 10 мл; . K_2HPO_4 – 0,2; вода водопроводная 1 л; pH = 7,0 – 7,2.

Биомассу, собранную в конце логарифмической фазы роста (~22 – 24 часа), отделяли от питательной среды центрифугированием, промывали 0,95%-ным водным NaCl, замораживали, хранили при – 20 °С и использовали для получения клеточных стенок.

Получение клеточных стенок. Сырую биомассу клеток суспендировали в холодной дистиллированной воде до кремообразного состояния, проводили обработку на ультразвуковом дезинтеграторе UP 100H («Hielscher», Германия), 30 кГц, 3–5 раз по 10 мин в ледяной воде с добавлением Ds-Na (2% по объему) с последующим нагревом суспензии при 100 °С в течение 10 мин для удаления возможных компонентов мембраны. Затем клеточную стенку многократно (5-7 раз) промывали дистиллированной водой на центрифуге при 10000-12000 об/мин, каждый раз собирая рыхлый верхний слой (модифицированный метод, Potekhina et al., 2011). Полученную фракцию высушивали лиофильно. О чистоте клеточной стенки судили по количеству фосфора нуклеиновых кислот (не более 0,2% от массы сухой клеточной стенки) и хроматографически по отсутствию рибозы.

Таблица 1. Исследуемые штаммы рода *Clavibacter*

Название организма	Источник выделения	Патоген / эндофит
Типовые штаммы валидно опубликованных видов [https://lpsn.dsmz.de/genus/clavibacter , 2023]		
<i>C.insidiosus</i> ВКМ Ас-1402 ^T	Люцерна (<i>Medicago sativa</i> L)	патоген
<i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1403 ^T	Томат (<i>Solanum lycopersicum</i>)	патоген
<i>C. nebraskensis</i> ВКМ Ас-1404 ^T	Кукуруза-лист (<i>Zea mays</i>)	патоген
<i>C. tessellarius</i> ВКМ Ас-1406 ^T	Пшеница (<i>Triticum aestivum</i>)	патоген
<i>C. phaseoli</i> ВКМ Ас-2641 ^T	Фасоль-семена (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	патоген
Штаммы-претенденты на новый вид		
<i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-2555*	Осока (<i>Carex</i> .sp.)	эндофит
<i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1371**	Солянка (<i>Salsola</i> sp.)	эндофит
<i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1372**	Акация (<i>Ammodendron</i> sp.)	эндофит
<i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1374**	Джужгун (<i>Calligonum</i> sp.)	эндофит

* выделен из лесостепной зоны заповедника Белогорье Белгородской области с семиаридным климатом, ** выделены из пустыни Кызыл-Кум с пустынным континентальным аридным климатом.

Выделение гликополимеров из клеточных стенок. К сухому препарату клеточной стенки (~500 мг) добавляли 10%-ную ТХУ (1 : 10, вес/об). Проводили три последовательных экстракции (3×24 ч при 4 °С), каждый раз отделяя супернатант центрифугированием (12000 об/мин, 15 мин, 4 °С). Супернатанты объединяли, диализовали против дистиллированной воды в течение 2-3 суток, меняя воду каждые 12 часов, и лиофилизировали. Получали препарат гликополимеров, «холодной экстракции». Оставшиеся от «холодной экстракции» клетки обрабатывали 5%-ной ТХУ 20 минут на водяной бане при температуре 90 °С. Далее поступали как описано выше. Получали препарат гликополимеров – «горячая экстракция».

Очистка и разделение гликополимеров. Препараты «холодной и горячей экстракции» гликополимеров подвергали разделению с помощью ионообменной хроматографии на колонке (80 × 1.5 см) с DEAE-целлюлозой (Тоуорpearl, Japan). Нейтральный полимер был элюирован 0,005 М, а кислый – 0,5 М фосфатным буфером (рН 6,3), при контроле элюции с помощью дифференциального рефрактометра («Knauer», Германия). Полученные фракции индивидуальных гликополимеров были обессолены на колонке (90 × 1.5 см), загруженной TSK HW-40S- гелем (Тоуорpearl, Japan). Элюцию проводили 1%-ной уксусной кислотой, контролируя её, как описано выше. Фракции гликополимеров собирали, объединяли, диализовали против дистиллированной воды, лиофильно высушивали и исследовали методами ЯМР-спектроскопии.

Кислотный гидролиз клеточной стенки и препаратов гликополимеров. Для изучения моносакхаридного состава и других продуктов деградации клеточных стенок и препаратов гликополимеров, применяли гидролиз 2М HCl при 100 °С в течение 3 часов. HCl после гидролиза отгоняли выпариванием (после многократного добавления к образцу дистиллированной воды) при 40-60°С.

Нисходящая хроматография и электрофорез на бумаге. Разделение продуктов гидролиза клеточной стенки и гликополимеров, а также их фрагментов проводили с помощью нисходящей хроматографии и электрофореза на бумаге Filtrak FN-3 (Германия) в следующих системах растворителей: 1) пиридин–бензол–бутан-1-ол–вода (для разделения моносакхаридов, полиолов, гликозидов); 2) пиридин–этилацетат–CH₃COOH–вода (для разделения аминсахаров); 3) пропан-1-ол–NH₄OH и 4) амиловый спирт–5М муравьиная кислота (для разделения органических кислот). Электрофорез проводили на приборе марки ФЭЗ (СССР) в ацетатно-пиридиновом буфере (А), рН 5,5–5,6 (пиридин – 11,8 мл, CH₃COOH_{лед} – 3,5 мл, вода дистиллированная – до 1000 мл) – для разделения фосфорных эфиров, анионных углеводсодержащих полимеров при градиенте потенциала 20 В/см в течение 4-х часов.

Определение фосфора нуклеиновых кислот. Фосфор нуклеиновых кислот определяли по методике, описанной в работе (Potekhina et al., 2011).

Определение абсолютной конфигурации моносакхаридов. Абсолютную конфигурацию сахаров определяли по методике, описанной в работе Gerwig et al. (1979).

Условия проведения ЯМР-эксперимента. Спектры ЯМР снимали на спектрометре Bruker Avance 600 для растворов препаратов в D₂O (99,96%) при 30°С. TSP (δ_H 0,0) и ацетон (δ_C 31,45) использовали в качестве внутреннего

эталона для калибровки спектров ^1H - и ^{13}C -ЯМР соответственно. Для съемки и обработки двумерных спектров использовали стандартные методики и математическое обеспечение фирмы «Bruker» (Германия). Время смешивания в экспериментах TOCSY составляло 100 мс, длительность импульса для спин-лока в эксперименте ROESY – 150 мс, эксперимент НМВС был оптимизирован для константы $J_{\text{H,C}} = 8$ Гц (Potekhina et al., 2011).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Глава IV. Моносахаридный состав и структуры гликополимеров клеточных стенок изучаемых актинобактерий

В настоящей главе приведены результаты исследования моносахаридного состава и структур гликополимеров клеточных стенок девяти штаммов рода *Clavibacter* (Таблица 2).

4.1. Изучение моносахаридного состава и наличия пировиноградной кислоты в клеточных стенках исследуемых актинобактерий

Для того, чтобы избавиться от примеси мембраны, цитоплазмы, капсул, экзополисахаридов и иметь чёткие представления о **моносахаридах клеточной стенки**, необходимо было получить из биомассы клеток клеточную стенку достаточной степени чистоты, что явилось первым этапом наших исследований.

Фосфор нуклеиновых кислот ($P_{\text{нк}}$) в полученных клеточных стенках для всех девяти штаммов не превышал 0,2% от массы взятой для опыта навески клеточной стенки (Таблица 2), что свидетельствовало о достаточной степени их чистоты от примесей неразрушенных клеток и цитоплазматической мембраны.

Таблица 2. Результаты исследования клеточных стенок

Изучаемые штаммы рода <i>Clavibacter</i>	Фосфор нуклеи- новых кислот, % P	Кислотный гидролиз (2 М HCl, 100 °С, 3 ч) Хроматография на бумаге	
		Наличие пировиноградной к-ты	Сахара клеточных стенок (следы Glc - все штаммы)
<i>C. insidiosus</i> Ac-1402 ^T	0,065	+	Gal, Man, Fuc, (Rib), Rha, GlcN
<i>C. michiganensis</i> Ac-1403 ^T	0,110	+	Gal, Man, Fuc, Rha, GlcN
<i>C. nebraskensis</i> Ac-1404 ^T	0,082	+	Gal, Man, Fuc, Rha, GlcN
<i>C. tessellarius</i> Ac-1406 ^T	0,079	+	Gal, Man, Fuc, Rha
<i>C. phaseoli</i> Ac-2641 ^T	0,102	+	Gal, Man, Rib
<i>Clavibacter</i> sp. Ac-2555	0,069	+	Gal, Man, Rib
<i>Clavibacter</i> sp. Ac-1371	0,075	+	Gal, Man, Rib
<i>Clavibacter</i> sp. Ac-1372	0,066	+	Gal, Man, Rib
<i>Clavibacter</i> sp. Ac-1374	0,078	+	Gal, Man, Rib

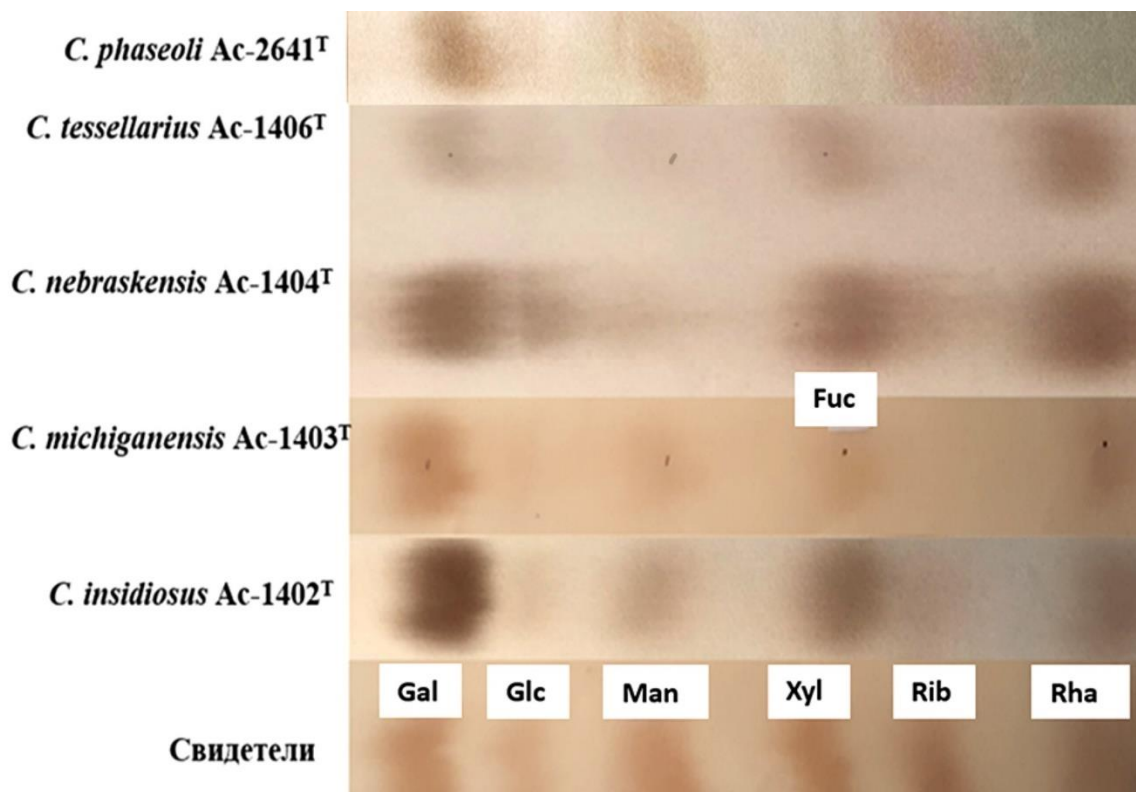


Рисунок 1. Хроматограммы кислотных гидролизатов клеточных стенок (проявлено: 1-азотнокислое серебро в аммиаке; 2-анилинфталат): *C. insidiosus* ВКМ Ac-1402^T (1); *C. michiganensis* ВКМ Ac-1403^T (2); *C. nebraskensis* ВКМ Ac-1404^T (1); *C. tessellarius* ВКМ Ac-1406^T (1); *C. phaseoli* ВКМ Ac-2641^T (2). Свидетели – (2).

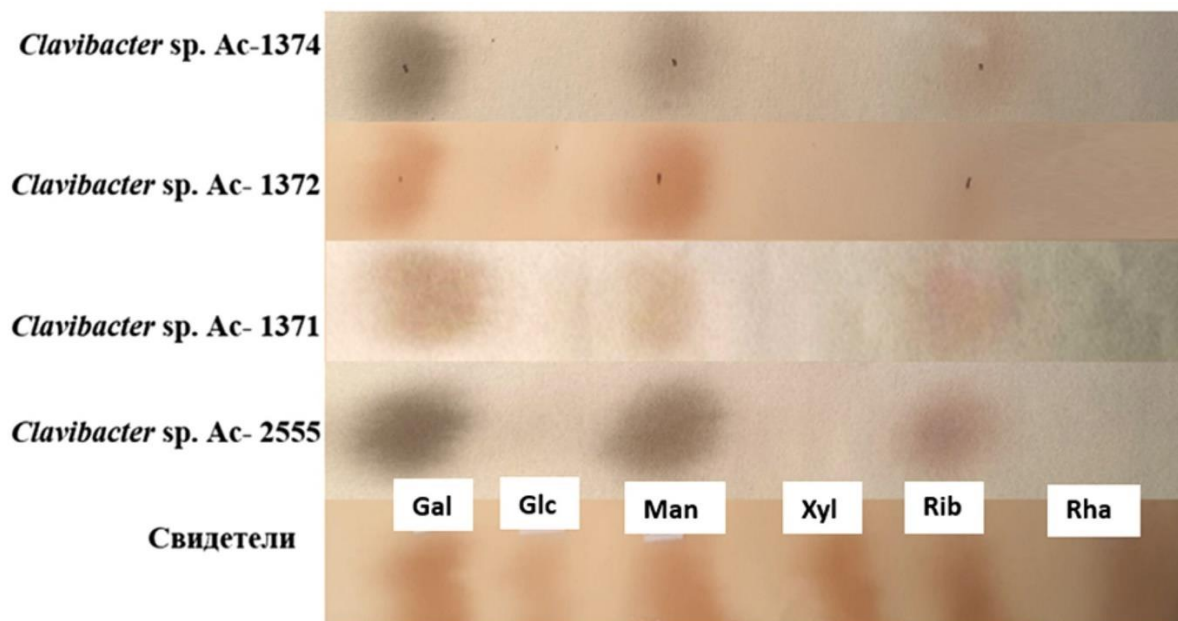


Рисунок 2. Хроматограммы кислотных гидролизатов клеточных стенок (проявлено: 1-азотнокислое серебро в аммиаке; 2-анилинфталат): *Clavibacter* sp. ВКМ Ac-2555 (1); *Clavibacter* sp. ВКМ Ac-1371 (2); *Clavibacter* sp. ВКМ Ac-1372 (2); *Clavibacter* sp. ВКМ Ac-1374 (1). Свидетели – (2).

В кислотных гидролизатах клеточных стенок методом электрофореза был обнаружен только минеральный фосфат, таким образом, **присутствие фосфорных эфиров выявлено не было**. Эти данные свидетельствуют об отсутствии фосфатсодержащих гликополимеров в клеточных стенках исследованных клавобактерий.

Клеточные стенки всех исследованных в этой работе штаммов содержали галактозу, маннозу, глюкозу (следовые количества); у некоторых штаммов дополнительно обнаружены фукоза, рамноза, глюкозамин и рибоза (Таблица 2, Рисунки 1, 2).

Гидролизаты клеточных стенок исследуемых актинобактерий были проверены на присутствие пировиноградной кислоты, поскольку по данным авторов (Philip et al., 1980) актинобактерии рода *Clavibacter* синтезируют содержащие пировиноградную кислоту экзополисахариды. Методом хроматографии на бумаге в двух системах растворителей: щелочной (система 3) и кислой (система 4) (см. главу III, раздел 3.6.) показано **наличие в клеточных стенках пировиноградной кислоты** для всех девяти штаммов (Таблица 2).

4.2. Гликополимеры клеточной стенки *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T

C. michiganensis ВКМ Ас-1403^T – карантинный вид, поражающий томаты, широко распространён в различных странах мира (<https://gd.eppo.int> 2024).

Препараты гликополимеров I («холодная экстракция», выход 21,8%) и II («горячая экстракция», выход 9,3%) были исследованы химическими и ЯМР-спектроскопическими методами.

В гидролизатах препаратов I и II (2М HCl, 100 °С, 2ч) были выявлены различные наборы моносахаридов. Так, гидролизат препарата I содержал галактозу, глюкозамин, фукозу и рамнозу, тогда как моносахаридный состав гидролизатов клеточной стенки (Таблица 2) и препарата II были качественно идентичны и включали галактозу и маннозу, а также фукозу, рамнозу, глюкозамин и следовые количества глюкозы (последняя только в гидролизате клеточной стенки). Следовало предположить присутствие как минимум двух гликополимеров в изучаемой клеточной стенке.

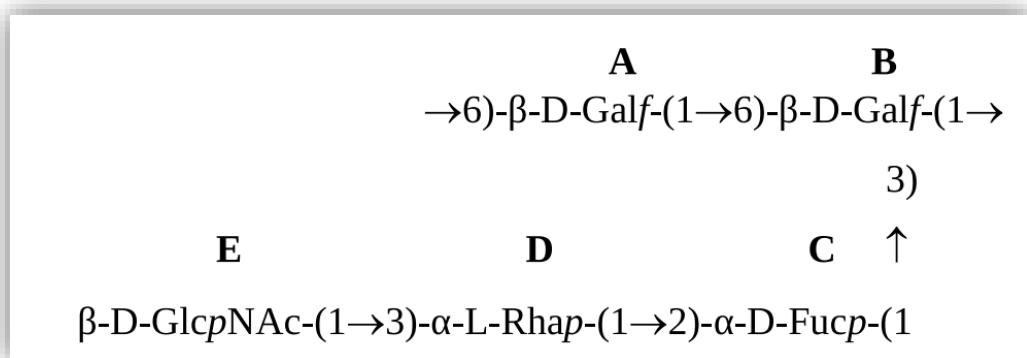
С помощью ГЖХ-хроматографии (см. методы) выявлены моносахариды *полисахарида 1* – GlcN, Rha, Fuc и Gal в соотношении 1 : 1 : 1 : 2, а в *полисахарида 2* – Gal и Man в соотношении 1 : 2. Оказалось, что все сахара имеют D-конфигурацию, кроме рамнозы, имеющей L-конфигурацию.

Предварительные исследования методами ЯМР-спектроскопии на ядрах ¹H и ¹³C обоих препаратов показало, что полисахарид препарата I является чистым *полисахаридом 1*, тогда как препарат II является смесью полисахаридов *1* и *2*.

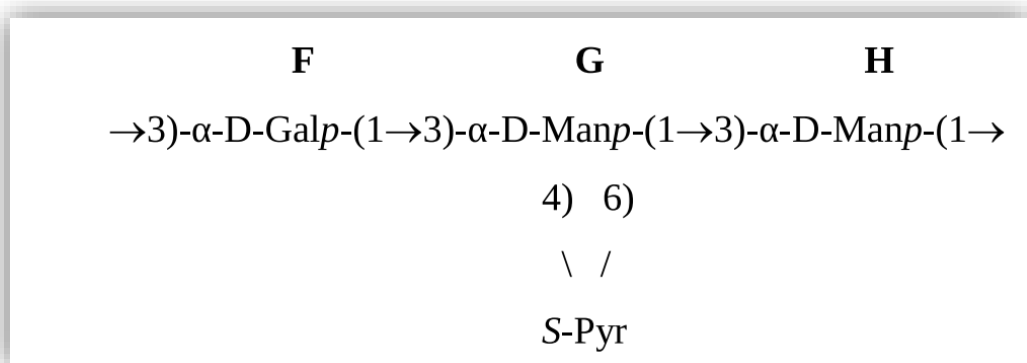
Препарат II был подвергнут разделению с помощью ионообменной хроматографии. В результате были получены две фракции: нейтральная, соответствующая *полисахариду 1*, и кислая, соответствующая *полисахариду 2*.

Структуры *полисахаридов 1* и *2* из клеточной стенки ВКМ Ас-1403^T (Рисунок 3) установлены на основании их двумерных гомоядерных ¹H, ¹H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных ¹H, ¹³C HSQC и HMBC спектров с учетом данных об абсолютной конфигурации сахаров.

Повторяющееся звено *полисахаридов 1* и *2* из клеточной стенки *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T можно представить следующим образом (Kim et al., 2021):



Полисахарид 1 (галактофуранан)



Полисахарид 2 (галактоманнан)

Рисунок 3. Структуры повторяющихся звена полисахаридов клеточной стенки *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T.

4.3. Гликополимеры клеточной стенки *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T и *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T

C. insidiosus ВКМ Ас-1402^T и *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T известны как фитопатогены люцерны (карантинный вид, и кукурузы, соответственно (<https://gd.eppo.int> 2024).

В кислотных гидролизатах клеточных стенок обоих штаммов не выявлены фосфат содержащие соединения, но обнаружены моносахариды такие же, как в клеточных стенках *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T (Таблица 2). Это позволило предположить, что в клеточных стенках ВКМ Ас-1402^T и ВКМ Ас-1404^T имеются полисахариды похожей структуры.

Препараты I гликополимеров из ВКМ Ас-1402^T и ВКМ Ас-1404^T («холодная экстракция», выход 21,8% и 20,5%, соответственно) содержал *полисахарид 1*. Препараты II – («горячая экстракция», выход 12,7% и 13,0%, соответственно) содержали смесь *полисахаридов 1* и *2*.

Гликополимеры (полисахариды) исследованы химическими методами (хроматография на бумаге, электрофорез, ГЖХ) и методами ЯМР-спектроскопии.

Методами ГЖХ в кислотных гидролизатах препаратов гликополимеров «холодной экстракции» штаммов ВКМ Ас-1402^T и ВКМ Ас-1404^T, выявлен одинаковый состав моносахаридов: Gal, Fuc, Rha и GlcN в соотношении 2:1:1:1. Моносахаридный состав препаратов, полученных методом «горячей экстракции», включал дополнительно Man. Изучение абсолютной конфигурации моносахаридов показало, что Rha имела L-конфигурацию, а Gal, Man, Fuc и GlcN были в D-конфигурации.

Полученные данные указывали на присутствие в клеточной стенке штаммов ВКМ Ас-1402^T и ВКМ Ас-1404^T по крайней мере двух бесфосфатных гликополимеров различных по составу и схожих по структуре с полимерами из ВКМ Ас-1403^T.

Препарат II подвергли разделению с помощью ионообменной хроматографии. В результате были получены две фракции: нейтральная, соответствующая полисахариду 1, и кислая, соответствующая полисахариду 2.

Структуры полисахаридов 1 и 2 из клеточных стенок ВКМ Ас-1402^T и ВКМ Ас-1404^T (Рисунок 4) установлены на основании их двумерных гомоядерных ¹H, ¹H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных ¹H, ¹³C HSQC и HMBC спектров с учетом данных об абсолютной конфигурации сахаров.

Сравнение ¹³C ЯМР и ¹H ЯМР спектров препаратов «холодной экстракции» из обоих штаммов показало их сходство. Однако на двумерных спектрах ¹H, ¹³C HSQC, ¹H, ¹H ROESY и ¹H, ¹³C HMBC препарата штамма ВКМ Ас-1404^T были обнаружены дополнительные сигналы, которые расшифрованы как принадлежащие терминальным остаткам рамнопиранозы D_t в боковом дисахариде α-L-Rhap-(1→3)-α-D-Fucp-(1→. Дисахарид замещает каждый второй остаток галактофуранозы в интегральной цепи, чередуясь с трисахаридом у галактофуранана штамма ВКМ Ас-1402^T (Рисунок 4).

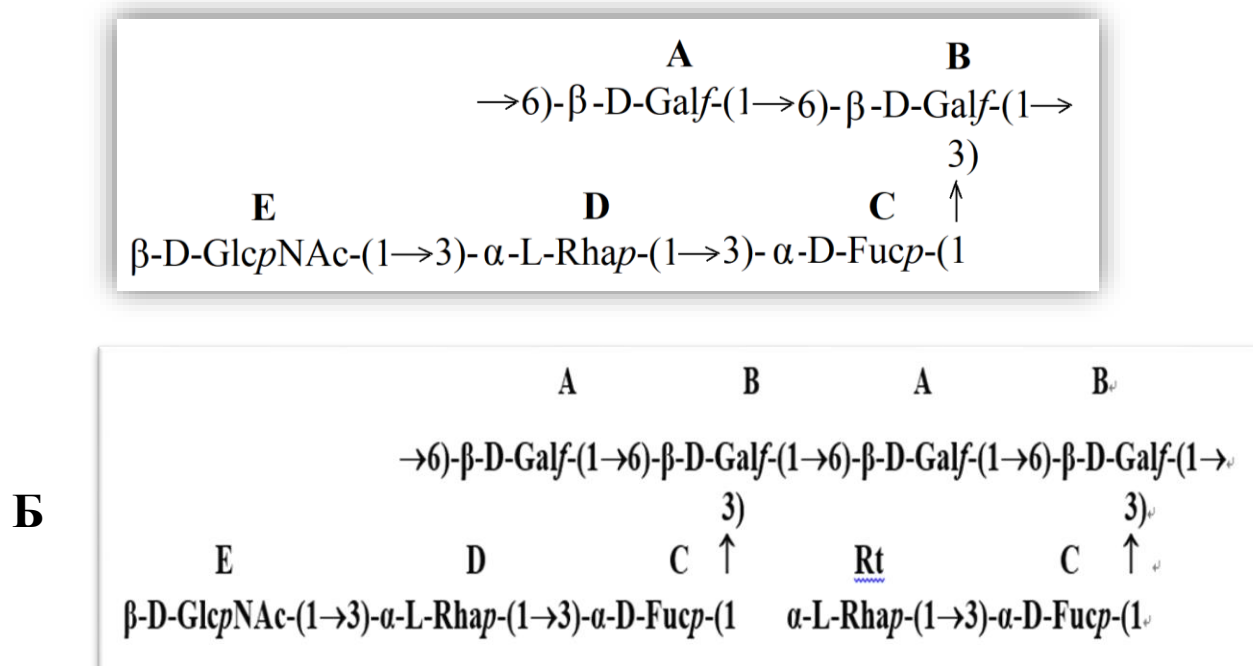


Рисунок 4. Структуры повторяющихся звеньев нейтральных полисахаридов (галактофурананов) клеточных стенок *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T (А) и *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T (Б).

Результаты исследований препаратов «горячей экстракции» из клеточных стенок штаммов ВКМ Ас-1402^Т и ВКМ Ас-1404^Т с использованием ранее описанных методов и подходов (Kim et al., 2021) показали присутствие помимо галактофурананов, описанных выше, пируватсодержащего галактоманнана. Структура галактоманнана обоих штаммов была полностью идентична галактоманнану из клеточной стенки *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^Т (Kim et al., 2021, Tul'skaya et al., 2024) и соответствовала таковой, представленной на Рисунке 3 (Полисахарид 2).

4.4. Гликополимеры клеточных стенок *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374

Clavibacter sp. ВКМ Ас-1371, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374 (Таблица 1) являются претендентами на новый вид (Стародумова и др., 2018, устное сообщение проф. Л.И. Евтушенко).

Из клеточных стенок ВКМ Ас-1371 с помощью ТХУ-экстракции получены препараты гликополимеров I («холодная экстракция», выход 9,5%), содержащего нейтральный полисахарид 1, и – II («горячая экстракция», выход 20,4%), содержащего смесь нейтрального полисахарида 1 и кислого полисахарида 2 (Shashkov et al., 2021). Что касается штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374 методами ЯМР-спектроскопии исследованы только препараты II, («горячая экстракция», выход 9,5% и 9,4%, соответственно) из клеточных стенок этих штаммов из-за малого выхода полимеров из препарата I.

ГЖХ гидролизата препарата I ВКМ Ас-1371 выявила Gal, Rib и Man в соотношении 2 : 1 : 1, а гидролизат препарата II содержал Gal, Rib и Man в соотношении 3 : 1 : 3. Аналогичное соотношение сахаров 3 : 1 : 3 установлено для гидролизата препаратов II из штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374. Предполагалось, что эти моносахариды входят в состав бесфосфатных гликополимеров исследуемых клеточных стенок. Все сахара из полисахаридов 1 и 2 имели D-конфигурацию.

Строение полисахаридов 1 и 2 из штамма ВКМ Ас-1371 установлено на основании их двумерных гомоядерных ¹H,¹H COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных ¹H,¹³C HSQC и HMBC спектров с учетом данных об абсолютной конфигурации сахара. На основании этих данных повторяющееся звено полисахарида 1 выглядит следующим образом:

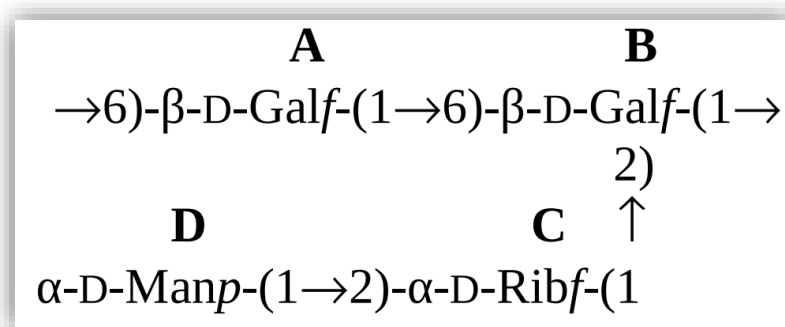


Рисунок 5. Структура повторяющегося звена полисахарида 1 из клеточной стенки *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371.

Структура кислого полимера клеточной стенки *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371, согласно полученным химическим и ЯМР-спектроскопическим данным, полностью совпала со структурой пируватсодержащего галактоманнана штаммов *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T и *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T (Рисунок 3).

Спектры ¹³С ЯМР препаратов II штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374 содержали в аномерной области все сигналы, характерные для препарата I штамма ВКМ Ас-1371, и дополнительно ряд минорных пиков, а также три сигнала, характерных для О-ацетильных групп. Оказалось, что появление новых сигналов связано с частичным О-ацетилированием кислого полисахарида 2 этих штаммов. Удалось установить, что кислый пируватсодержащий галактоманнан из штаммов ВКМ Ас-1372 и ВКМ Ас-1374 имеет следующую структуру:

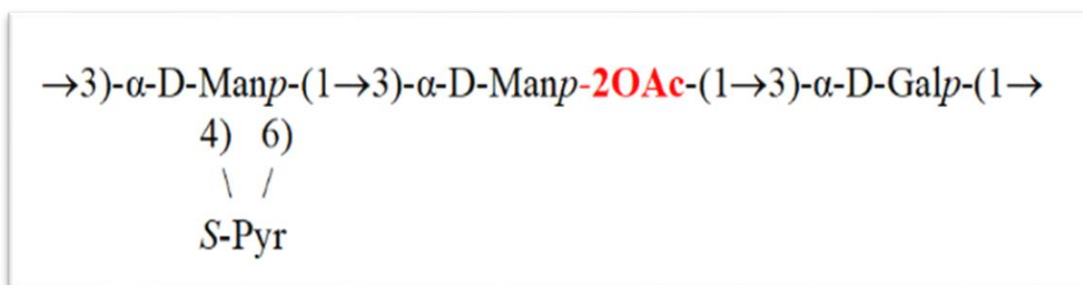


Рисунок 6. Структура повторяющегося звена полисахарида 2 клеточных стенок *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372 и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374.

4.5. Гликополимеры клеточных стенок *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T

C. tessellarius ВКМ Ас-1406^T является фитопатогеном пшеницы, вызывающим мозаичную болезнь последней, сопровождающуюся пятнистостью и пожелтением листьев и зерна, что приводит к значительным потерям урожая (Таблица 1).

Фосфатсодержащие соединения не были обнаружены ни в продуктах кислотного гидролиза клеточных стенок штаммов, ни в выделенных из них препаратах гликополимеров (метод электрофореза). На хроматограммах обнаружены моносахариды: Gal, Man, Fuc, Rha и следовое количество Glc (последняя – только в гидролизатах клеточных стенок).

Из клеточной стенки исследуемого штамма был получен препарат гликополимеров с помощью горячей экстракции ТХУ (выход ~ 20%). Препарат, а также выделенные из него гликополимеры (полисахариды) были исследованы химическими и ЯМР-спектроскопическими методами. Были получены одномерные ¹Н и ¹³С ЯМР спектры полисахаридов, которые были расшифрованы с помощью двумерных гомоядерных ¹Н,¹Н COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных ¹Н,¹³С HSQC, HMBC спектров.

Предварительные исследования препарата гликополимеров из клеточной стенки Ас-1406^T, проведенные с помощью ¹³С ЯМР спектроскопии выявили две серии сигналов - более интенсивные и второстепенные – минорные. Более интенсивная серия сигналов спектра ЯМР ¹³С принадлежала нейтральному полисахариду, полисахариду 1.

ГЖХ-хроматография препарата гликополимеров подтвердила состав сахаров Gal, Man, Rha и Fuc в соотношении 3,5 : 1,9 : 1,5 : 1. Gal, Man и Fuc из *полисахаридов 1 и 2* оказались в D-конфигурации, а Rha из *полисахарида 2* оказалась в L-абсолютной конфигурации.

Минорная серия сигналов выявила присутствие очень небольшого количества кислого полимера (*полисахарид 2*), типичного для ранее исследованных штаммов *Clavibacter*, с повторяющимся звеном $\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Galp-}(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-[4,6-S-Pyr]-Manp-}(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-Manp-[2OAc]}_{0,2}\text{-}(1\rightarrow$ (Shashkov et al., 2021, Peregulov et al., 2023a) (Рисунок 6).

Структура *полисахарида 1* установлена на основании его двумерных гомоядерных ^1H , $^1\text{H COSY}$, TOCSY, ROESY и гетероядерных $^1\text{H}, ^{13}\text{C HSQC}$ и НМВС спектров с учетом данных об абсолютной конфигурации сахаров. Им оказался нейтральный гликополимер галактофуранан с сильно разветвленным повторяющимся звеном цепи:

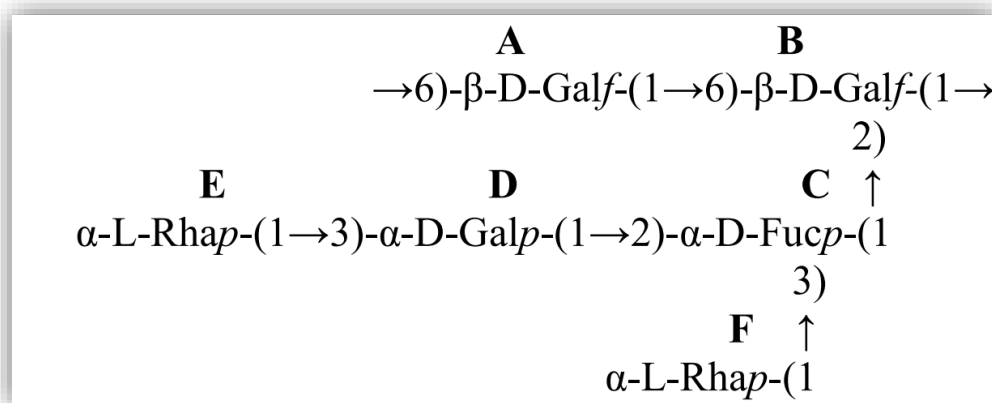


Рисунок 7. Структура повторяющегося звена *полисахарида 1* из клеточной стенки *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T.

4.6. Гликополимеры клеточных стенок *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555

C. phaseoli ВКМ Ас-2641^T является возбудителем бактериального заболевания фасоли, вызывающего пожелтение листьев (Gonzalez et al., 2014). *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555 был выделен в Белгородской области, из осоки (*Carex* sp.) без видимых симптомов заболевания (Таблица 1). Названные актинобактерии имеют высокое филогенетическое сходство (личное сообщение проф. Л.И. Евтушенко).

Препараты гликополимеров выделяли из клеточных стенок с помощью горячей ТХУ экстракции (выход 20,4% и 22,8%, соответственно). Препараты, а также выделенные из него гликополимеры были исследованы химическими и ЯМР-спектроскопическими методами.

В кислотных гидролизатах клеточных стенок и препаратах клеточных стенок *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555 выявлены Gal, Man, Rib и следовые количества Glc (Таблица 2), фосфатсодержащие соединения не обнаружены (электрофорез). Однако, пировиноградная кислота выявлена во

всех гидролизатах клеточных стенок. Можно предположить, что эти соединения входят в состав гликополимеров клеточных стенок изучаемых актинобактерий. ГЖХ-хроматография гидролизатов препаратов гликополимеров выявила Gal, Rib и Man в соотношении 2 : 1 : 2 (штамм ВКМ Ас-2641^T) и 2 : 0,8 : 2 (штамм ВКМ Ас-2555). Все сахара из *полисахаридов 1* и 2 имели D-конфигурацию.

Структуры *полисахаридов* из штаммов ВКМ Ас-2641^T и ВКМ Ас-2555 установлены методами ЯМР-спектроскопии на основании 2D-гомоядерных ¹H, ¹H-COSY, TOCSY, ROESY и гетероядерных ¹H, ¹³C-HSQC и HMBC-спектров и подтверждена 1D-спектрами ЯМР с селективным возбуждением аномерных протонов.

Предварительные исследования препаратов проводили химическими методами и 1D спектроскопией ЯМР на ядрах протона и углерода (¹H и ¹³C). Спектры ЯМР на ядрах ¹H и ¹³C показали, что препарат из штамма ВКМ Ас-2641^T был типичным для регулярного полисахарида и представлял собой нейтральный *полисахарид 1* (Рисунок 8). Тогда как спектры ЯМР на ядрах ¹H и ¹³C препарата из штамма ВКМ Ас-2555 содержали две серии сигналов: основную и минорную. Основные сигналы соответствовали таковым со спектров для препаратов ВКМ Ас-2641^T и принадлежали галактоманнану (*полисахарид 1*) со сходной структурой:

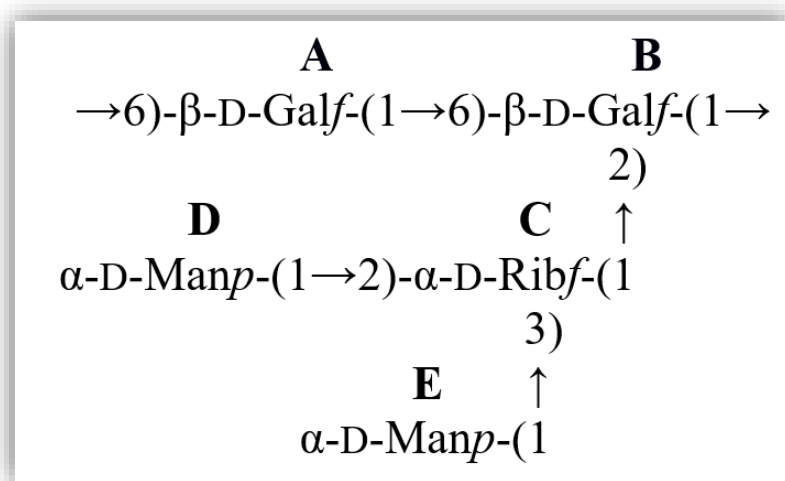


Рисунок 8. Структура повторяющегося звена *полисахарида 1* из клеточных стенок *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555.

Минорные сигналы указывали на присутствие небольшого количества кислого полисахарида – пируватсодержащего галактоманнана, частично ацетилированного по второму остатку маннозы →3)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-[4,6-S-Pyr]-Manp-(1→3)-α-D-Manp-[2OAc]_{0,2}-(1→. Такой полисахарид ранее был найден у штаммов ВКМ Ас 1406^T, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372 и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374 (Shashkov et al., 2021, Perepelov et al., 2023 а,б) (Рисунок 6).

Глава V. Обсуждение результатов

Новые структуры гликополимеров служат хемотаксономическими маркерами видов рода *Clavibacter*

Настоящая работа выполнена с целью изучения моносахаридного состава и гликополимеров клеточных стенок ряда представителей рода *Clavibacter* для дальнейшего использования в установлении или уточнении видового статуса изучаемых штаммов и создания более совершенной системы идентификации фитопатогенов, а также оценки таксономической значимости признака «состав и структура гликополимеров клеточных стенок» для бактерий этого рода.

В соответствии с поставленной целью были получены клеточные стенки 9 штаммов актинобактерий, изучен их моносахаридный состав, а также состав и структуры гликополимеров этих актинобактерий.

Сахара клеточной стенки в характеристике бактерий рода *Clavibacter*. Сравнительный анализ опубликованных в литературе и данных настоящей работы по «сахарам клеточных стенок» показал, что определение сахаров в препаратах клеточных стенок является наиболее информативным и позволяет: а) локализовать найденные моносахариды; б) выявить дополнительные диагностические для таксона моносахариды, которые ранее не считались таковыми. Обнаружение характерных моносахаридов в составе клеточных стенок в некоторых случаях может достаточно точно указывать на принадлежность к определенному роду.

Клеточные стенки всех девяти исследованных штаммов (Таблица 1) содержали набор сахаров, среди которых галактоза, манноза, глюкоза (следовые количества) были выявлены во всех организмах. У некоторых штаммов дополнительно обнаружены фукоза, рамноза, глюкозамин и рибоза.

Наши результаты для *C. michiganensis*, *C. insidiosus*, *C. nebraskensis* и *C. tessellarius* в целом совпадают с данными, приведенными для этих видов в работе Davis et al. (1984). Однако у отдельных штаммов, в том числе у изученных претендентов на новый вид, нами были дополнительно выявлены глюкозамин и рибоза (Таблица 2). Отметим, что хемотаксономический признак «состав сахаров клеточной стенки» как правило отражает состав структурных компонентов гликополимеров клеточной стенки.

Таким образом, различный моносахаридный профиль клеточных стенок типовых штаммов клавибактерий согласуется с их принадлежностью к разным видам рода, поскольку обнаружение у штамма моносахарида, не найденного в составе клеточных стенок известных (близких) видов, с высокой степенью вероятности свидетельствует о том, что такой штамм относится к другому виду (Stackebrandt, 2006; Тульская, 2009).

Структуры гликополимеров, как хемотаксономический маркер видов рода *Clavibacter*. В работе показано, что набор гликополимеров клеточных стенок исследованных штаммов включает два гликополимера – нейтральной и кислой природы (Таблица 3). При этом кислый гликополимер – пируватсодержащий галактоманнан с повторяющимся звеном $\rightarrow 3)-\alpha-D-Galp-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-[4,6-S-Pyr]-Manp-(1\rightarrow 3)-\alpha-D-Manp-(1\rightarrow$ (в ряде случаев несущий О-ацетильные группы), присутствовал в составе клеточных стенок всех 9 изученных штаммов *Clavibacter* (Рисунок 3). Полимер с такой структурой

является уникальным и к настоящему времени описан только у представителей рода *Clavibacter* (<http://csdb.glycoscience.ru>, 2024). И хотя методами ЯМР-спектроскопии не удалось определить присутствие пируватсодержащего галактоманнана у *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T (вероятно, из-за его незначительного количества), химическими методами был обнаружен его компонент (пировиноградная кислота) в составе препарата «горячей экстракции», полученного из клеточных стенок штамма при повторных выращивании (наши неопубликованные данные).

Обнаружение идентичного по структуре гликополимера у пяти типовых штаммов и четырех не определённых до вида штаммов *Clavibacter* может свидетельствовать о том, что, этот гликополимер является **хемотаксономическим признаком актинобактерий на уровне рода**.

В клеточных стенках исследуемых актинобактерий также были выявлены нейтральные гликополимеры – (1→6)-связанные галактофурананы (Таблица 3). Вероятно, интегральная цепь галактофурананов, идентичная для всех штаммов, также как пируватсодержащий галактоманнан, может являться **хемотаксономическим признаком бактерий рода *Clavibacter***.

Если интегральная цепь нейтральных полимеров построена одинаково, то боковые заместители, ди-, три- и тетрасахариды, различаются по составу и структуре у представителей разных видов, что указывает на различие в структуре самих галактофурананов. Различающийся состав и структуры гликополимеров, характерных для представителей изученных видов клавибактерий приведены в Таблица 3.

Таблица 3. Гликополимеры клеточных стенок изученных представителей рода *Clavibacter*

Штаммы ВКМ	Гликополимеры						
	ГФ 1	ГФ 2	ГФ 3	ГФ 4	ГФ 5	ГФ 6	ГМ
<i>C. insidiosus</i> Ас-1402 ^T	◆						●
<i>C. michiganensis</i> Ас-1403 ^T		◆					●
<i>C. nebraskensis</i> Ас-1404 ^T			◆				●
<i>C. tessellarius</i> Ас-1406 ^T				◆			● О-Ас
<i>C. phaseoli</i> Ас-2641 ^T					◆		●*
<i>Clavibacter</i> sp. Ас-2555					◆		● О-Ас
<i>Clavibacter</i> sp. Ас-1371						◆	●
<i>Clavibacter</i> sp. Ас-1372						◆	● О-Ас
<i>Clavibacter</i> sp. Ас-1374						◆	● О-Ас

(◆) – ГФ, галактофуранан, (●) – ГМ, галактоманнан;

ГМ: →3)- α -D-Galp-(1→3)- α -D-[4,6-S-Pyr]-Manp-(1→3)- α -D-Manp-(1→ ;

ГФ 1: →6)- β -D-Galf-(1→6)- β -D-[β -D-GlcpNAc-(1→3)- α -L-Rhap-(1→3)- α -D-Fucp-(1→3)]-Galf-(1→ ;

ГФ 2: →6)- β -D-Galf-(1→6)- β -D-[β -D-GlcpNAc-(1→3)- α -L-Rhap-(1→2)- α -D-Fucp-(1→3)]-Galf-(1→ ;

ГФ 3: →6)- β -D-Galf-(1→6)- β -D-[β -D-GlcpNAc-(1→3)- α -L-Rhap-(1→3)- α -D-Fucp-(1→3)]-Galf-

(1→6)- β -D-Galf-(1→6)- β -D-[α -L-Rhap-(1→3)- α -D-Fucp-(1→3)]-Galf-(1→ ;

ГФ 4: →6)- β -D-Galf-(1→6)- β -D-{ α -L-Rhap-(1→3)- α -D-Galp-(1→2)- α -D-[α -L-Rhap-(1→3)]- Fucp-

(1→2)}-Galf-(1→ ;

ГФ 5: →6)- β -D-Galf-(1→6)- β -D-{ α -D-Manp-(1→2)- α -D-[α -D-Manp-(1→3)]-Ribf-(1→2)}-Galf-(1→ ;

ГФ 6: →6)- β -D-Galf-(1→6)- β -D-[α -D-Manp-(1→2)- α -D-Ribf-(1→2)]-Galf-(1→ .

Отметим, что *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T содержат идентичные по качественному составу нейтральные полимеры, галактофурананы. Так, галактофурананы, в качестве заместителя несут боковой трисахарид, состоящий из фукопиранозы, рамнопиранозы и глюкозамина. Однако их структуры различаются по ряду параметров. У *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T и *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T гликозидная связь между рамнопиранозой и фукопиранозой – (1→3), в то время как у *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T связь – (1→2). Кроме того, каждый второй остаток галактофуранозы *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T гликозилирован либо трисахаридом, либо дисахаридом, что отличает этот полимер от такового у *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T.

Структуры и состав гликополимеров клеточных стенок изученных актинобактерий рода *Clavibacter* (Таблица 3) хорошо коррелируют с филогенетической группировкой этих организмов (Li et al., 2018; Starodumova et al., 2018).

Сравнивая данные о структурах гликополимерах клеточных стенок с результатами исследований, других авторов (Li et al., 2018), можно увидеть, что штамм *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T достаточно удален от *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T и *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T (примерно 92% средней идентичности нуклеотидов (ANI), и около 48% по цифровой ДНК-ДНК-гибридизации (dDDH)). Что касается штаммов *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T и *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T, то они являются “более близкими родственниками” по генетическим показателям (примерно 95% ANI и примерно 60% по dDDH), которые являются практически пограничными значениями при определении степени родства микроорганизмов. Таким образом, незначительная разница в структурах гликополимеров, чётко определяемая в ЯМР-спектроскопических исследованиях, достаточно хорошо согласуется с генетическими данными.

Таким образом, пируватсодержащий галактоманнан и галактофурананы с олигосахаридными боковыми заместителями специфичны для представителей рода *Clavibacter*. С другой стороны, структуры галактофурананов с ди-, три- или тетрасахаридными заместителями различного состава и структуры могут служить диагностическими признаками или хемотаксономическими маркерами видов *Clavibacter*.

ЯМР спектроскопия является важным аналитическим методом для характеристики новых видов. Хемотаксономические методы сыграли важную роль в развитии полифазного подхода в классификации архей и бактерий. В настоящее время считается, что применение этих методов не является необходимым в эпоху, когда геномные данные доступны и достаточны для определения видов. Однако, ведущие микробиологи утверждают (Vandame and Sutcliffe, 2021), что «хемотаксономия будет процветать, если улучшенные аналитические методы будут внедрены и использованы, в первую очередь специализированными лабораториями, в исследованиях на таксономических уровнях, выходящих за рамки характеристики новых видов».

Так, сравнение ¹³C ЯМР-спектров как своеобразных «фингерпринтов» позволило визуализировать различия в составе гликополимеров изучаемых штаммов, что свидетельствовало о различиях типовых штаммов (и штаммов-

претендентов на новые виды) на фенотипическом уровне. Такой метод был предложен ранее для идентификации типовых штаммов рода *Nocardiosis* (Naumova et al., 2001; Tulskaaya et al., 2014), рода *Streptomyces* (Тульская и др., 2007).

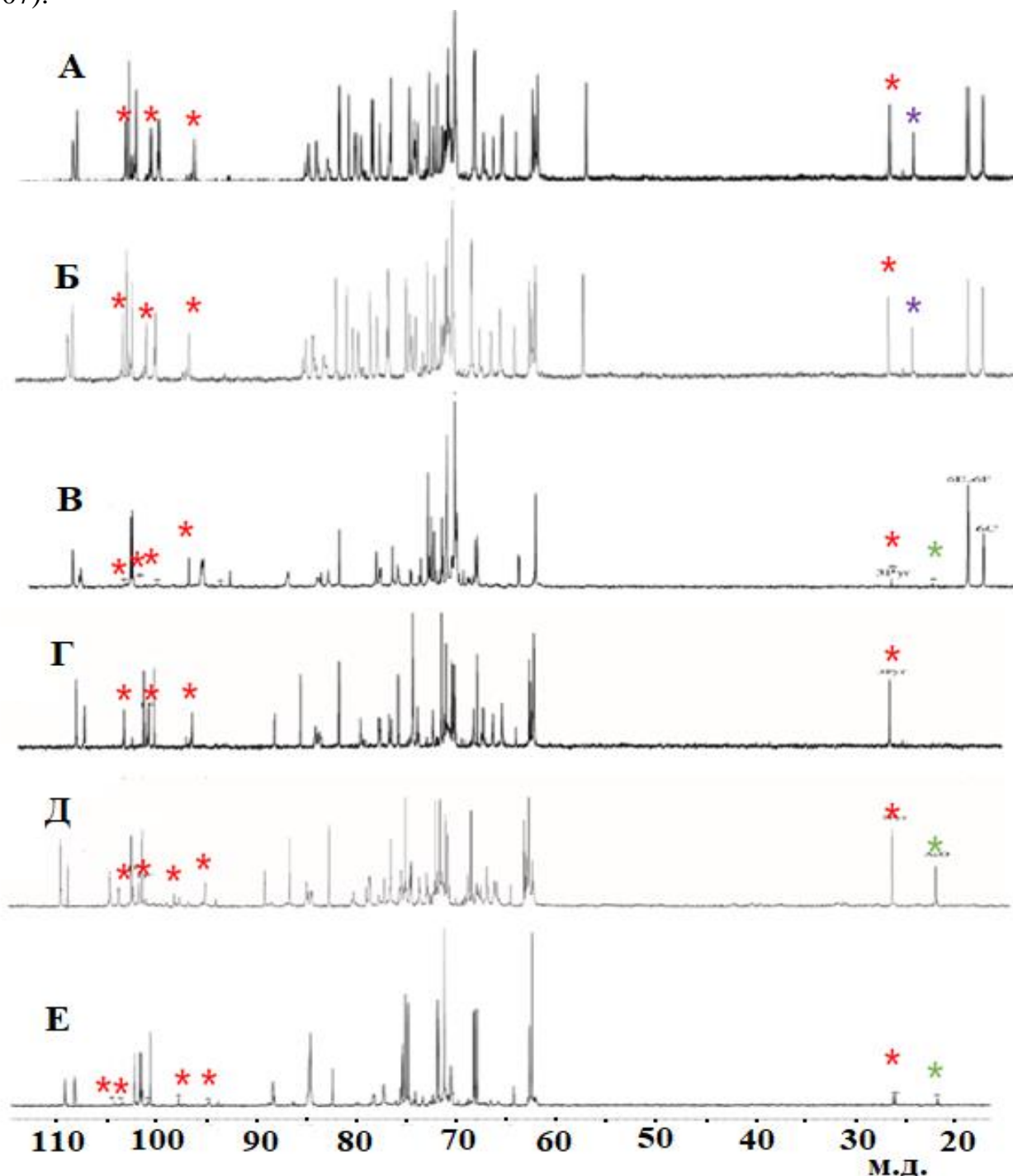


Рисунок 9. ^{13}C ЯМР – спектры суммарных препаратов (кислый + нейтральный гликополимеры): *C. insidiosus* Ac-1402^T, *C. nebraskensis* Ac-1404^T (А); *C. michiganensis* Ac-1403^T (Б); *C. tessellarius* Ac-1406^T (В); *Clavibacter* sp. Ac-1371 (Г); *Clavibacter* sp. Ac-1372 и *Clavibacter* sp. Ac-1374 (Д); *C. phaseoli* Ac-2641^T и *Clavibacter* sp. Ac-2555 (Е). Красными звездочками обозначены кислый ГП, фиолетовыми – CH_3 группы N ацетила, зелеными – O-ацетильные группы.

В нашей работе **характерные особенности первичной структуры гликополимеров** удалось выявить с помощью **ЯМР-спектроскопических исследований**. Лишь с помощью метода ЯМР удалось локализовать гликозидные связи между рамнопиранозой и фукопиранозой в галактофурананах *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T и *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T. Кроме того, именно с помощью двумерной ЯМР-спектроскопии в галактофуранане *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T обнаружены как три-, так и дисахаридные боковые заместители, а также выявить и локализовать остатки пировиноградной кислоты в общем для всех изученных актинобактерий кислотном полимере галактоманнана. На Рисунке 9 представлены одномерные ¹³C ЯМР спектры суммарных препаратов изученных клавибактерий.

Сравнение этих спектров уже на этом уровне позволяет выявить чёткую разницу в структурах гликополимеров у различных видов. А некую «похожесть» А и Б спектров, но различие выявленных структур, легко объяснить с помощью двумерных ¹H, ¹³C HSQC, ¹H, ¹³C HMBC спектров (в автореферате не приведены) (Tul'skaya et al., 2024).

Таким образом, применение методов ЯМР-спектроскопии является надежным и основополагающим методом в изучении структур углеводсодержащих бактериальных гликополимеров.

В целом настоящее исследование демонстрирует, что структуры и состав гликополимеров клеточной стенки вместе с продуктами их химической деградации и спектрами ЯМР являются индикаторными для видов рода *Clavibacter* и могут быть использованы в качестве надежных хемотаксономических критериев, в том числе и в качестве фингерпринтов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа выполнена в рамках изучения биологического разнообразия актинобактерий, а также структурного разнообразия природных биополимеров и посвящена изучению углеводного состава клеточных стенок фитопатогенных видов, а также новых представителей рода – претендентов на новый вид, из рода *Clavibacter*, не изученных в этом отношении ранее.

Актинобактерии рода *Clavibacter* представляют собой группу грамположительных актинобактерий (семейство *Microbacteriaceae*, порядок *Micrococcales*, класс *Actinomycetes*). Восемь известных видов рода – специализированные возбудители сосудистых заболеваний растений, три из которых являются карантинными объектами во многих странах мира (Li et al., 2018; <https://lpsn.dsmz.de/genus/clavibacter>, 2024; <https://gd.eppo.int>, 2024). Кроме того, были предложены к изучению претенденты на новые виды рода *Clavibacter*, включая непатогенные эндофиты, что подчеркивает генетические и экологические различия внутри этого рода (Starodumova et al., 2018).

В результате проведенных исследований получены новые данные о химическом составе клеточных стенок пяти типовых штаммов валидных фитопатогенных видов, а также четырёх претендентов на новый вид, выделенных из растений без признаков заболевания рода *Clavibacter*.

Каждый штамм содержал кислый и нейтральный полимер. Установлено шесть новых структур нейтральных гликополимеров, интегральная цепь которых построена из (1→6)-связанных остатков β-D-галактофуранозы, каждый второй остаток которой гликозилирован по второму или третьему гидроксилу ди-, три- или тетрасахаридом различного состава и строения. Кроме того, описана структура нового кислого гликополимера – галактоманнана с пируват-кетальными группами на остатках маннозы (в некоторых случаях несущего ещё и О-ацетильные группы).

Все выявленные структуры гликополимеров являются уникальными для *Clavibacter* и найдены впервые у прокариот.

Состав сахаров клеточной стенки, описанный ранее, был уточнен и дополнен новыми данными, которые войдут в характеристику представителей рода и исследованных видов.

Сравнительный анализ гликополимеров клеточных стенок представителей *Clavibacter*, изученных в настоящей работе, показал, что состав и структуры гликополимеров и их структурные компоненты (определяемые в кислотных гидролизатах клеточных стенок) являются специфичными и могут служить хемотаксономическими маркерами рода и видов *Clavibacter*.

Применение методов ЯМР-спектроскопии для изучения структур гликополимеров у представителей одного рода открывает новые возможности для использования полученных данных в качестве своеобразных фингерпринтов видов для идентификации новых изолятов, предварительно отнесенных к роду *Clavibacter*-(Рисунок 9).

Помимо таксономического аспекта, изучение галактофурананов как небелковых адгезинов, а также путей их биосинтеза может представлять интерес для разработки средств борьбы с фитопатогенными видами *Clavibacter*. Кроме того, описанные новые химические структуры полимеров расширяют представления о многообразии органического мира и биосинтетическом потенциале микроорганизмов, и представляют интерес для будущих исследований в области молекулярной и клеточной биологии, экологии, эволюции микроорганизмов, в частности фитопатогенных и эндофитных представителей рода *Clavibacter*, а полученные результаты будут, несомненно, востребованы при аннотации полных геномов актинобактерий этого рода.

ВЫВОДЫ

1. Охарактеризован состав сахаров, а также структуры гликополимеров клеточных стенок *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T, *C. tessellarius* ВКМ Ас-1406^T и *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641^T, а также четырех новых изолятов – претендентов на новый вид: *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1371, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1372, *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-1374 и *Clavibacter* sp. ВКМ Ас-2555.

2. У всех исследованных штаммов выявлены преобладающие моносахариды клеточных стенок – галактоза, манноза и следовые количества глюкозы; у штаммов *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T – глюкозамин; у штаммов *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402^T, *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403^T, *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404^T и *C.*

tessellarius VKM Ac-1406^T – фукоза и рамноза; у штаммов *C. phaseoli* VKM Ac-2641^T, *Clavibacter* sp. VKM Ac-2555, *Clavibacter* sp. VKM Ac-1371, *Clavibacter* sp. VKM Ac-1372, *Clavibacter* sp. VKM Ac-1374 – рибоза.

3. Показано, что в клеточных стенках 9 изученных штаммов содержится по два бесфосфатных гликополимера с новыми, не описанными ранее, структурами. Первый – идентичный для всех штаммов пирувилированный (частично ацелированный у некоторых штаммов) галактоманнан, второй – (1→6)-связанный галактофуранан с ди-, три- или тетрасахаридным заместителем различной структуры.

4. Присутствие пирувилированного галактоманнана с соотношением моносахаридов Gal : Man = 1 : 2, а также (1→6)-связанного β-D-галактофуранана с различными боковыми заместителями может рассматриваться как хемотаксономический признак для бактерий рода *Clavibacter*.

5. Признаком, дифференцирующим виды *Clavibacter*, могут являться особенности строения различных боковых ди- три- и тетрасахаридных заместителей в структуре галактофуранана.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова:

1. **Kim D.**, Shashkov A.S., Dmitrenok A.S., Potekhina N.V., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I., Tul'skaya E.M. Novel galactofuranan and pyruvylated galactomannan in the cell wall of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* VKM Ac-1403^T // Carbohydrate research. – 2021. – V. 500. – P.108247. DOI: 10.1016/j.carres.2021.108247 (**IF WoS – 3,1, Q 2; IF SJR – 0,464, Q 2**). Вклад автора в печатных листах: 0,871/0,61 (Здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах).

2. Shashkov A.S., Potekhina N.V., **Kim D.**, Dmitrenok A.S., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I., Tul'skaya E.M. Cell wall galactofuranan and pyruvate-containing galactomannan in the cell walls of *Clavibacter* strains // Carbohydrate Research. – 2021. – V. 510. – P. 108435. DOI: 10.1016/j.carres.2021.108435 (**IF WoS – 3,1, Q 2; IF SJR – 0,464, Q 2**). (2,20/0,88)

3. Perepelov A.V., **Kim D.**, Tul'skaya E.M., Potekhina N.V., Dmitrenok A.S., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I., Shashkov A.S. A novel cell wall galactofuranan in *Clavibacter phaseoli* VKM Ac-2641^T // Carbohydrate Research. – 2023. – V. 525. – P. 108778. DOI: 10.1016/j.carres.2023.108778 (**IF WoS – 3,1, Q 2; IF SJR – 0,464, Q 2**). (0,544/0,218)

4. Perepelov A.V., Shashkov A.S., **Kim D.**, Potekhina N.V., Dmitrenok A.S., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I., Tul'skaya E.M. A highly branched novel galactofuranan in the cell wall of *Clavibacter tessellarius* VKM

Ac-1406^T // Carbohydrate Research. – 2023. – V. 529. – P. 108823. DOI: 10.1016/j.carres.2023.108823 (**IF WoS – 3,1, Q 2; IF SJR – 0,464, Q 2**). (0,653/0,261)

5. Tul'skaya E.M., **Kim D.**, Potekhina N.V., Shashkov A.S., Senchenkova S.N., Dorofeeva L.V., Evtushenko L.I. Cell wall galactofuranans and galactomannan as chemotaxonomic characteristics of the *Clavibacter* genus and its species // Microbiology. – 2024. – V. 93. – № 1. – P. 28-34. <https://doi.org/10.1134/S0026261723603007> (**IF WoS – 1,51, Q 4; IF SJR – 0,35. Q3**). (0,782/0,313)