БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
Биологический факультет
Кафедра молекулярной биологии

Характеристика гена целлюлазы *Pectobacterium carotovorum*

Шарай О.А.

Научный руководитель:
доцент Николайчик Е.А. , Ph. D.

Pectobacterium carotovorum

Бактерии *Pectobacterium carotovorum* наносят значительный ущерб растениям картофеля, вызывая заболевание «черная ножка» (заболевание, приводящее к гибели растения вскоре после прорастания клубней), а также мягкую гниль клубней при хранении.

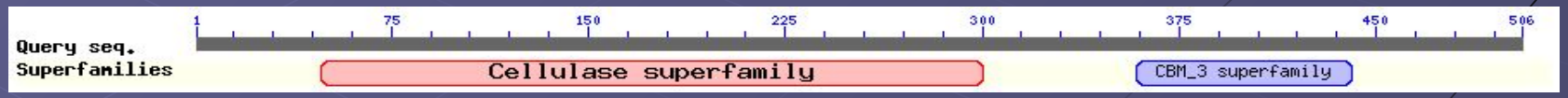
Основными факторами вирулентности для *Pectobacterium* считаются:

- внеклеточные пектатлиазы
- внеклеточные целлюлазы
- внеклеточные протеазы

Целлюлаза – фактор вирулентности *Pectobacterium carotovorum*

Предполагается, что целлюлаза является одним из основных факторов вирулентности *Pectobacterium carotovorum.* Молекулы целлюлазы состоят из субстратсвязывающего домена на С-конце, соединенного с помощью короткого полилинкерного участка с каталитическим доменом на N-конце.

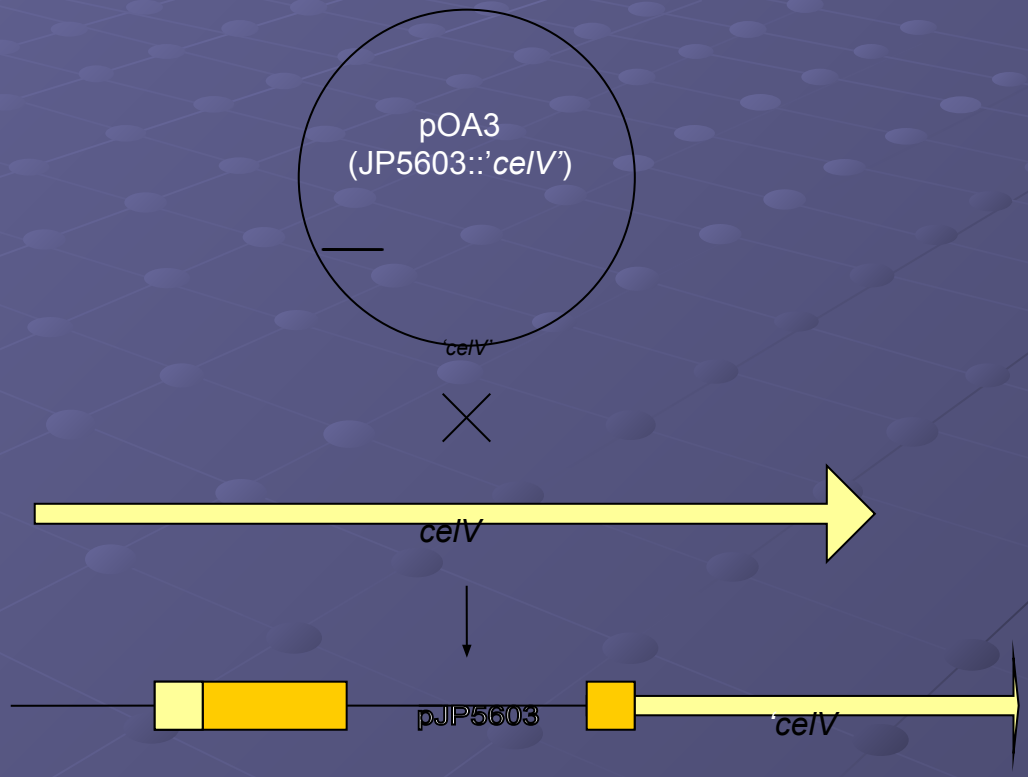
Ген целлюлазы *celV* кодирует эндоглюконазу семейства 5



Цель работы:

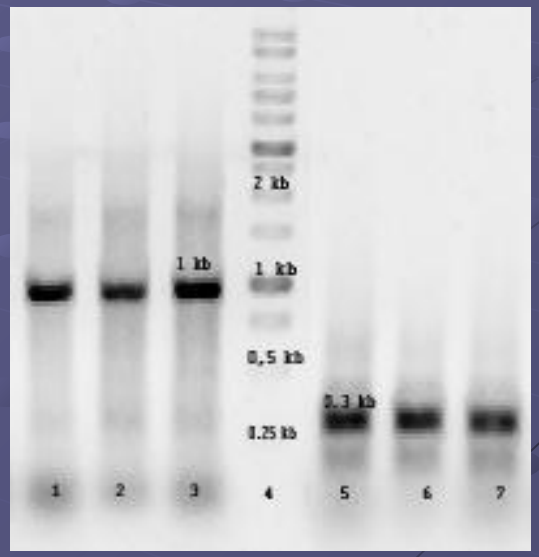
создание мутанта *Pectobacterium carotovorum* 3-2 по гену целлюлазы (*celV*) и оценка роли этого гена в вирулентности бактерий *Pca.*

Схема получения мутантного штамма *P. carotovorum* по гену *celV*



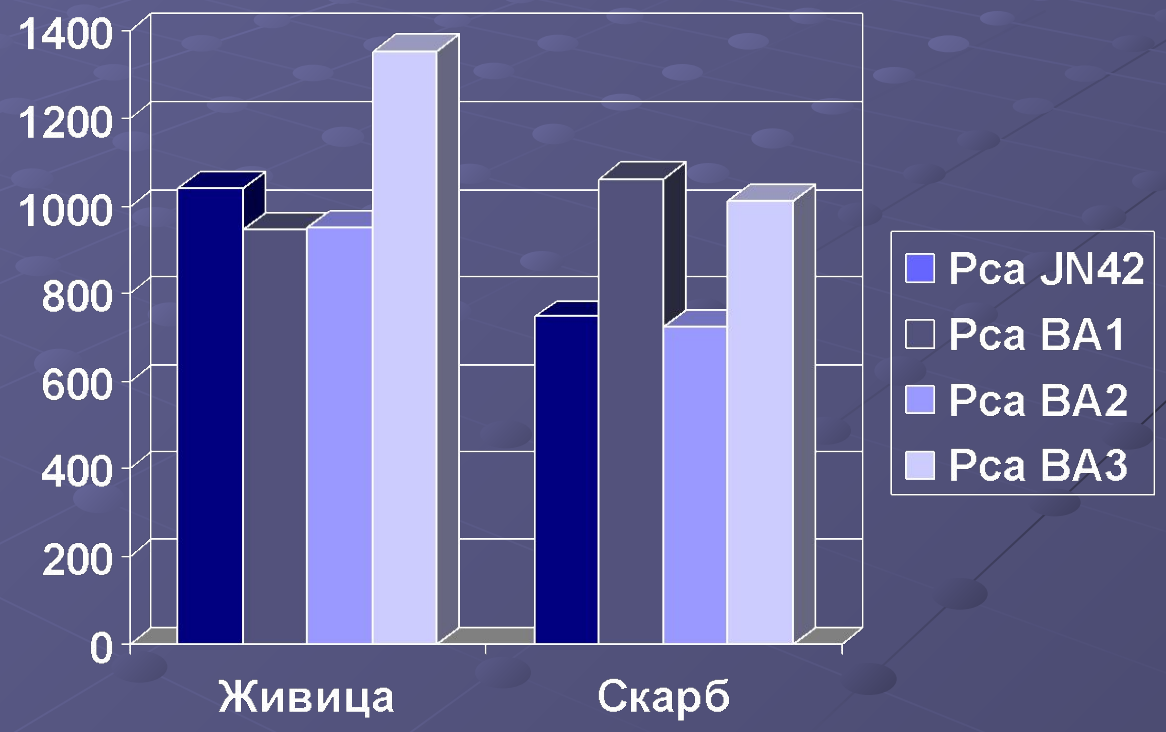
Создание мутанта *Pectobacterium carotovorum* 3-2 по гену целлюлазы (*celV*)

Чашечный тест на продукцию секретируемой целлюлазы клетками штамма *Pca* JN42 (сектор 1) и его мутантов BA1 (сектор 2), BA2 (сектор 3), BA3 (сектор 4).



Электрофореграмма продуктов амплификации хромосомной ДНК штаммов *Pca* BA1 (дорожки 1 и 5), BA2 (дорожки 2 и 6), BA3 (дорожки 3 и 7) с использованием праймеров cel1, cel2 и M13/pUC sequencing primer (дорожки 1-3) или cel1, cel2 и M13/pUC reverse sequencing primer (дорожки 5-7) при температуре отжига 50°C. Дорожка 4 - ДНК-маркер (Fermentas#SM0311).

Проверка вирулентности штаммов, мутантных по гену целлюлазы, при заражении клубней картофеля



Среднее значение веса мацерированной ткани клубней картофеля сортов Скарб и Живица, зараженных бактериями штаммов *Pca* JN42, BA1, BA2 и BA3.

Проверка вирулентности штаммов, мутантных по гену целлюлазы, при заражении стеблей картофеля

Оценка симптомов поражения «черной ножкой» стеблей картофеля сорта Дельфин

Штамм / № стебля	*Pca* BA1	*Pca* BA2	*Pca* BA3	*Pca* JN42
1	5	1,5	1	2
2	4	1	1,5	2,5
3	2	1	3	5
4	2,5	2,5	2	2,5
5	2	3	2	2,5
6	3	1,5	2	2,5
7	2,5	2,5	2,5	2,5
8	2,5	5	3	2
Среднее значение	2,9375	2,25	2,125	2,6875

0 - нет симптомов заболевания
1 - минимальное поражение
2 - выраженное поражение внутренних тканей
3 - поражение внутренних тканей стебля и небольшое поверхностное потемнение
4- сильное поражение тканей стебля, но не по всему диаметру междоузлия
5 - «черная ножка»: поражены все ткани междоузлия, интенсивная черная окраска, стебель высыхает, его верхняя часть выше места инокуляции поникает

Выводы

1. Введение суицидной плазмиды с фрагментом гена целлюлазы *celV* в клетки *Pectobacterium carotovorum* 3-2 привело к инактивации хромосомной копии этого гена.
2. У клеток клонов *P. carotovorum* 3-2 с инактивацией гена *celV* целлюлазная активность использованными методами не детектируется.
3. Инактивация гена *celV* не оказывает существенного влияния на способность бактерий *P. carotovorum* 3-2 инфицировать клубни картофеля.
4. Инактивация гена *celV* у бактерий *P. carotovorum* 3-2 не оказывает существенного влияния на развитие симптомов «черной ножки» при заражении стеблей картофеля.

Спасибо за внимание!