

**МОНОСАХАРИДНИЙ СКЛАД ЛІПОПОЛІСАХАРИДІВ  
RALSTONIA SOLANACEARUM**

Встановлено моносахаридний склад ліпополісахаридів 8-ми штамів *Ralstonia solanacearum* різного географічного походження. Переважаючими моносахаридами були: глюкоза, рамноза та глюкозамін. За результатами аналізу виявлено штами, що гіпотетично мають неповноцінний О-полісахарид. За якісним та кількісним моносахаридним складом ЛПС, штами продемонстрували високий рівень гетерогенності.

*К л ю ч о в і с л о в а:* *Ralstonia solanacearum*, ліпополісахариди, О-полісахарид, моносахаридний склад.

*Ralstonia solanacearum* – бактеріальний агент, здатний уражувати судинну систему широкого кола рослин [5]. Ініціація розвитку патологічного процесу, що супроводжується накопиченням бактеріальних клітин у флоемі, визначається здатністю до розпізнавання інфекції рослинним організмом та ефективністю дії його захисних систем. Одним із ключових факторів патогенності на початкових етапах є ліпополісахариди – основні антигени клітинної стінки грамнегативних бактерій. З одного боку, підтверджена роль структури їх О-полісахариду в молекулярній взаємодії з рецепторами поверхні рослинних клітин та процесі запуску каскаду механізмів рослинного імунітету, з іншого, – вуглеводна частина ЛПС, що виступає в зовнішній простір, служить бар'єром на шляху антимікробних сполук в середину бактеріальної клітини [7].

*R. solanacearum* – є складним (комплексним) видом, який за особливостями екології та колом потенційних рослин-хазяїв прийнято поділяти на раси та біовари. Внутривидова гетерогенність штамів проявляється також за хемо- та генотиповими властивостями, однак спроби знайти генетичну чи біохімічну основу для створення на їх основі прикладних методів встановлення патогенного потенціалу штамів поки не принесли практичного результату [8].

Відомо, що брак О-полісахариду призводить до втрати вірулентних властивостей штаму, однак це часто спостерігається при тривалому культивуванні на штучних поживних середовищах, що накладає обмеження на використання серотипізації в лабораторній характеристиці штамів [4].

Інша справа якісний моносахаридний склад ЛПС. Раніше було показано, що для *R. solanacearum* типовими моносахаридами О-ланцюга є L-рамноза, D-гексозаміни та ксилоза. Однак для двох із досліджених штамів характерною була присутність D-рамнози, а також нетипового для ЛПС більшості досліджуваних штамів – D-арабінози. Аналіз встановлених структур дав можливість припустити, що два штами *R. solanacearum* 8089 і 4157, різко відрізняються від інших досліджуваних штамів [3] за структурами їхніх О-ПС, однак проведений нами полімеразний ланцюговий (ПЛР) аналіз до ділянки 16S РНК гену підтвердив їх видову приналежність. Це дає підстави стверджувати існування в межах даного виду декількох хемотипів ЛПС, що кардинально різняться за хімічним складом.

В даній роботі був досліджений моносахаридний склад ЛПС восьми штамів *R. solanacearum*, що представляють різні фенотипові групи та мають різне географічне походження.

**Матеріали та методи.** В роботі використовували штами *R. solanacearum* новозеландської (749, 758, 7954), в'єтнамської (ТХ<sub>1</sub>, ТS<sub>3</sub>) колекцій та колекції відділу фітопатогенних бактерій ІМВ ім. Д.К. Заболотного НАН України. Бактерії вирощували на картопляному агарі та рідкому синтетичному середовищі з хлоридом амонію за

температури 28 °С. Екстракцію ЛПС із сухої бактеріальної маси здійснювали за водно-фенольним методом Вестфала і Янна [2].

Ідентифікацію нейтральних моносахаридів проводили після гідролізу препаратів у 2 N розчині HCl протягом 5 год при температурі 100°C. Обробку зразків здійснювали за методом Albersheim з співавт. [2].

Після гідролізу проби висушували (під вакуумом) та тричі промивали дистильованою водою, до проби вносили боргідрид натрію та залишали на 10 год при кімнатній температурі (в захищеному від світла місці). Нейтралізували за допомогою іонообмінної смоли КУ-2 в H<sup>+</sup> формі, фільтрували, висушували і тричі обробляли метанолом (по 1 мл), кожний раз випаровуючи. До проби додавали 0,5 мл піридину та 0,5 мл оцтово-кислого ангідриду і гідролізували протягом 15 хв при температурі 100 °С, висушували, додавали 2-3 мл перегнаного хлороформу, центрифугували в скляних пробірках при 2500 g, 20 хв. Супернатант, який містив суміш нейтральних моносахаридів у вигляді ацетатів поліолів, розділяли на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973. Ідентифікацію моносахаридів проводили шляхом порівняння часу утримання ацетатів поліолів стандартних і досліджуваних зразків, а також із використанням комп'ютерної бази даних ChemStation. Кількісне співвідношення окремих моносахаридів визначали у відсотках від суми площ всіх піків моносахаридів [2].

**Результати та обговорення.** Структуру вуглеводної частини ЛПС, зокрема моносахаридний склад, прийнято відносити до одних із хемотаксономічних критеріїв бактерій [6]. Для представників роду *Ralstonia* характерними є наявність рамнози як у складі кору, так і О-полісахаридного ланцюга, а також одночасна присутність О-полісахаридів декількох типів у межах одного штаму. При цьому співвідношення рамнози і глюкози в складі кору коливається в доволі широких межах. Переважаюча група штамів *R. solanacearum* містить лінійні, або розгалужені О-полісахаридні ланцюги, в яких послідовність LRha-LRha-LRha-GlcNAc є основним мотивом, а в якості латеральних замісників може виступати рамноза або ксилоза [1].

Спільними моносахаридами для всіх досліджуваних штамів виявилися глюкоза та глюкозамін. Основні відмінності між досліджуваними препаратами стосувалися вмісту (наявності чи відсутності) рамнози, фукози та галактози.

Враховуючи відсутність рамнози та ксилози в складі ЛПС шт. 758 та 7954, можна припустити неповноцінність їхніх ОПС. Це підтверджується даними досліджень попередніх років, а саме високим співвідношенням молекулярної частки КДО відносно інших вуглеводів. За результатами перекресних серологічних реакцій, ці штами було об'єднано в одну серогрупу, звідки можна зробити висновки про можливість обумовленість їх серологічної спорідненості епітопами кору. Факт про неповну серологічну реактивність шт. 7954 із шт. 35, 526 та 749 може свідчити на користь доступності епітопів кору S-форм ЛПС даних штамів для взаємодії в реакціях з антитілами або про значиму частку R-форм в загальному пулі їхніх ЛПС.

Штами українського походження, що були об'єднані в одну серогрупу (4 і 526), відрізняються від шт. 35, що не увійшов до жодної з серогруп, наявністю галактози, а також меншим вмістом глюкози (35,0 і 25,9 % проти 91,6 %, відповідно). В свою чергу шт. 7954 і 758, що теж складають одну серогрупу, достатньо різняться за моносахаридним складом ЛПС, однак вони єдині в яких не вдалося ідентифікувати рамнозу (таблиця).

В той же час гептози – конститутивні моносахариди кору ЛПС ентеробактерій, вдалося ідентифікувати лише в препаратах двох штамів *R. solanacearum* – 749 і TX<sub>1</sub>.

Таким чином вивчення моносахаридного складу ЛПС 8-ми штамів *R. solanacearum*, ізольованих із різних географічних зон, свідчить, що за якісним та кількісним моносахаридним складом ЛПС, штами продемонстрували високий рівень гетерогенності. Переважаючими моносахаридами були: глюкоза, рамноза та глюкозамін.

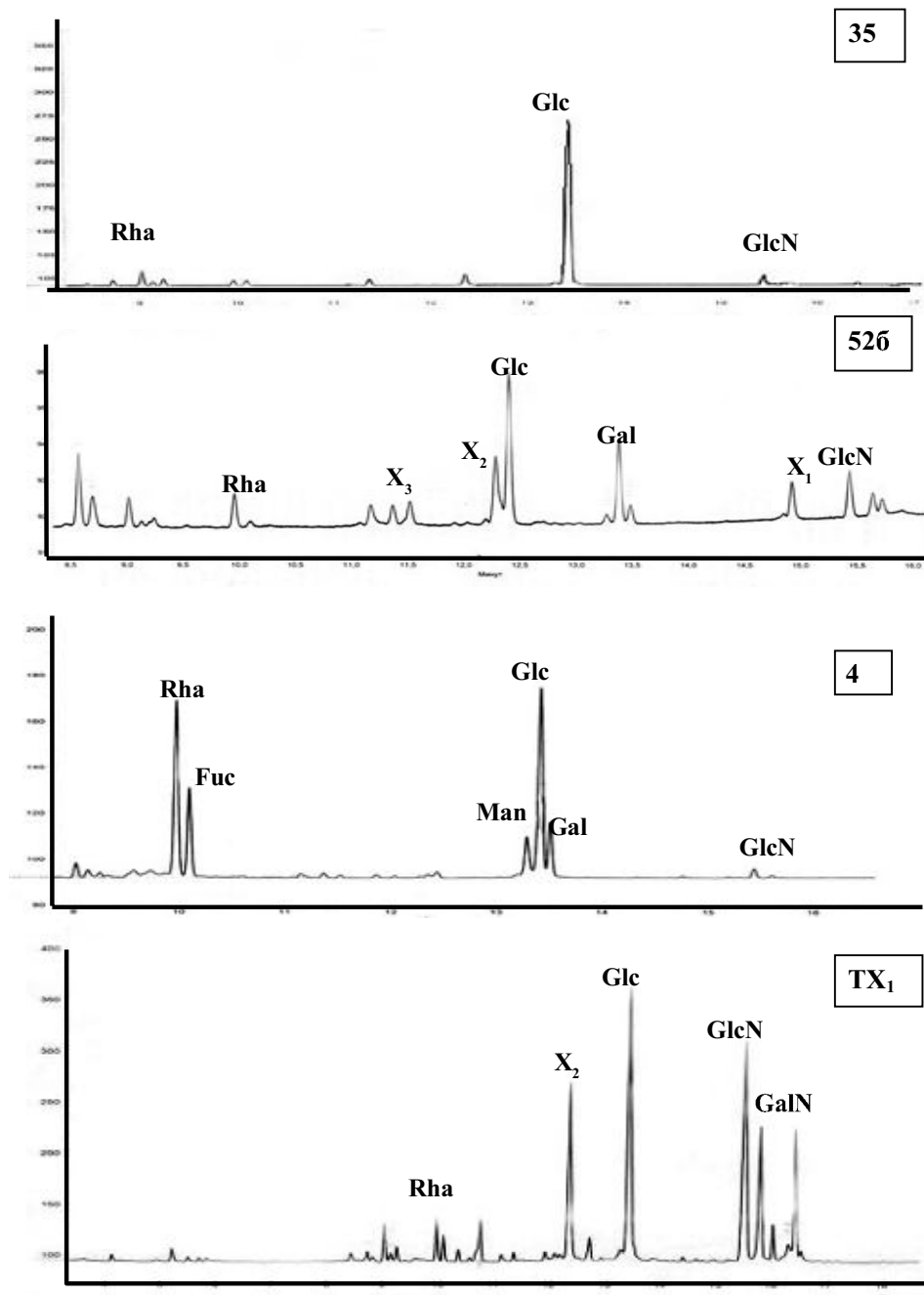


Рис. 1а. Моносахаридний склад ЛПС *R. solanacearum* штамів 4, 35, TX<sub>1</sub>, 526 (Rha – рамноза, Fuc – фукоза, Glc – глюкоза, Man – маноза, Gal – галактоза, Hep – гептоза, GlcN- глюкозамін, GalN – галактозамін, X- невизначений моносахарид).

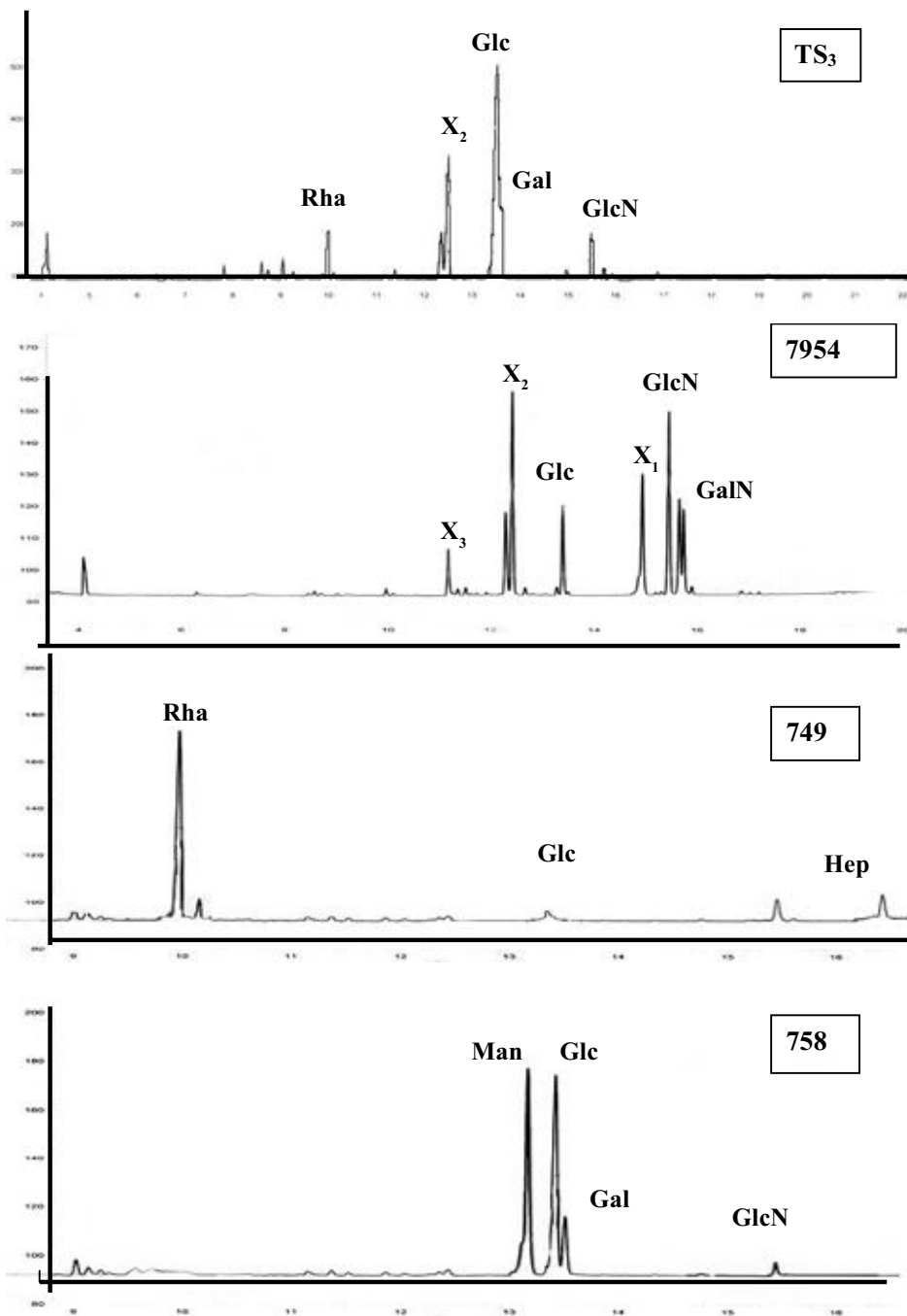


Рис. 16. Моносахаридний склад ЛПС *R. solanacearum* штамів TS<sub>3</sub>, 7954, 749, 758 (Rha – рамноза, Glc – глюкоза, Man – маноза, Gal – галактоза, Hep – гептоза, GlcN- глюкозамін, GalN – галактозамін, X- невизначений моносахарид).

Таблиця

Моносахаридний склад ЛПС *R. solanacearum*

Моносахарид	Штам							
	4	35	526	749	758	7954	ТХ <sub>1</sub>	ТS <sub>2</sub>
	%, до загальної суми площ піків							
Рамноза	30,0	2,2	8,2	82,5	-	-	3,24	5,2
Фукоза	14,8	2,1	-	-	-	-	2,0	1,2
Маноза	8,7	-	-	-	46,0	-	-	-
Глюкоза	35,0	91,6	20,6	6,4	39,4	11,5	32,7	50,0
Галактоза	9,4	-	5,0	-	13,6	-	-	8,9
Глюкозамін	2,1	4,1	3,9	1,8	1,0	24,7	30,0	6,4
Галактозамін	-	-	-	-	-	10,9	14,3	1,8
Гептози	-	-	-	8,1	-	-	11,6	-
Ксилоза	-	-	-	1,2	-	-	-	-
X <sub>1</sub>	-	-	14,8	-	-	6,0	-	5,2
X <sub>2</sub>	-	-	38,8	-	-	25,7	18,3	21,3
X <sub>3</sub>	-	-	8,7	-	-	21,2	-	-

*R.V. Gritsay, O.S. Brovarska, L.D. Varbanets*

*Institut microbiologii i virusologii im. D.K. Zabolotnoho NAN Ukrainy, Kiev*

**МОНОСАХАРИДНЫЙ СОСТАВ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ  
*RALSTONIA SOLANACEARUM***

Резюме

Представлены результаты анализа моносахаридного состава липополисахаридов штаммов *Ralstonia solanacearum* разного географического происхождения. Преобладающими моносахаридами были – глюкоза, рамноза и глюкозамин. По результатам анализа выявлены штаммы, гипотетически имеющие неполноценный О-полисахарид. По количественному и моносахаридному составу ЛПС, штаммы продемонстрировали высокий уровень гетерогенности.

Ключевые слова: *Ralstonia solanacearum*, липополисахариды, О-полисахарид, моносахаридный состав.

*R.V. Gritsay, O.S. Brovarska, L.D. Varbanets*

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

**MONOSACCHARIDE COMPOSITION OF *RALSTONIA SOLANACEARUM*  
LIPOPOLYSACCHARIDES**

Summary

Results of monosaccharide analysis of *Ralstonia solanacearum* lipopolysaccharides of the strains of different geographical origin are shown. Such monosaccharides as glucose, rhamnose and glucosamine prevail. Following the results of analysis, strains with supposedly truncated O-polysaccharide are revealed. As to their quantitative and monosaccharide composition of LPS the strains have demonstrated high level of heterogeneity.

The paper is presented in Ukrainian.

Key words: *Ralstonia solanacearum*, lipopolysaccharides, O-polysaccharide, monosaccharide composition.

The author's address: *Gritsay R.V.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.