

## ГАЛАКТОФУРАНАНЫ И ГАЛАКТОМАННАН КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК КАК ХЕМОТАКСОНОМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РОДА И ВИДОВ *CLAVIBACTER*

© 2024 г. Е. М. Тульская<sup>а, \*</sup>, Д. Ким<sup>а</sup>, Н. В. Потехина<sup>а</sup>, А. С. Шашков<sup>б</sup>, С. Н. Сенченкова<sup>б</sup>,  
Л. В. Дорофеева<sup>с</sup>, Л. И. Евтушенко<sup>с</sup>

<sup>а</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234, Россия

<sup>б</sup>Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва, 119991, Россия

<sup>с</sup>Всероссийская коллекция микроорганизмов, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов  
им. Г. К. Скрыбина, ФИЦ Пушинский научный центр биологических исследований РАН,  
Пушино, Московская обл., 142290, Россия

\*e-mail: em\_tulskaya@mail.ru

Поступила в редакцию 10.07.2023 г.

После доработки 13.09.2023 г.

Принята к публикации 17.09.2023 г.

В клеточных стенках типовых штаммов двух видов фитопатогенных бактерий — *Clavibacter insidiosus* ВКМ Ас-1402Т и *Clavibacter nebraskensis* ВКМ Ас-1404Т (семейство *Microbacteriaceae*, класс *Actinomycetes*) — обнаружено по два гликополимера разных типов. Первый тип представлен новыми, не описанными ранее (1→6)-связанными β-D-галактофурананами, отличающимися у двух изученных штаммов структурой боковых олигосахаридных цепочек. Второй гликополимер, пируватсодержащий галактоманнан, был идентичен у обоих штаммов. Полученные в настоящей работе результаты, в совокупности с ранее опубликованными, указывают на то, что наличие в клеточных стенках пируватсодержащего галактоманнана и (1→6)-связанных β-D-галактофурананов (с одинаковой структурой кора и различными олигосахаридными боковыми заместителями) можно рассматривать в качестве хемотаксономического признака рода *Clavibacter*, в то время как ди-, три- или тетрасахаридные заместители в галактофурананах (отличающиеся по структуре и компонентному составу) специфичны для видов или групп видов. Полученные данные расширяют представления о структурном разнообразии природных гликополимеров и особенностях строения клеточных стенок бактерий различных таксонов и могут представлять интерес для таксономических исследований и работ по выяснению молекулярных механизмов взаимодействия бактерий с клетками растений.

**Ключевые слова:** *Clavibacter*, галактофуранан, галактоманнан, клеточная стенка, хемотаксономия

DOI: 10.31857/S0026365624010025

**Принятые сокращения:** HSQC — протон-детектированная гетероядерная одноквантовая корреляция; ROESY — двумерная спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат; TOCSY — тотальная корреляционная спектроскопия; HMBC — гетероядерная корреляция через несколько связей; δ<sub>C</sub>, δ<sub>H</sub> — значения химических сдвигов атомов <sup>13</sup>C и <sup>1</sup>H, соответственно.

Представители рода *Clavibacter* (семейство *Microbacteriaceae*, класс *Actinomycetes*) — аэробные коринеформные бактерии, характеризующиеся пептидогликаном В<sub>2</sub>-типа на основе 2,4-диаминомасляной кислоты и преобладающим менахиномом МК-9 в составе дыхательной цепи (Saddler, Kerr, 2012). В настоящее время род включает восемь валидно описанных видов: *C. michiganensis*, *C. capsici*, *C. californiensis*, *C. insidiosus*, *C. nebraskensis*,

*C. sepedonicus*, *C. tessellarius*, *C. zhangzhongyongii* (<https://lpsn.dsmz.de/genus/clavibacter>, 2023). Все виды, за исключением *C. capsici* и *C. californiensis*, являются патогенами сельскохозяйственных культур, из них три вида (*C. michiganensis*, *C. insidiosus* и *C. sepedonicus*) — карантинные (Eichenlaub, Gartemann, 2011; Saddler, Kerr, 2012; [https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant\\_quarantine/A2\\_list](https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/A2_list), 2022).

Гликополимеры клеточных стенок, ковалентно связанные с пептидогликаном и расположенные на поверхности клетки, играют важную роль в различных жизненных процессах микробной клетки (Brown et al., 2013; Guérin et al., 2022). Гликополимеры бактерий, ассоциированных с высшими организмами, привлекают внимание исследователей в связи с их участием в процессах колонизации и инфицировании организма-хозяина (Schade,

Weidenmaier, 2016). Изучение особенностей строения и компонентного состава гликополимеров важны для понимания их физиологических функций и биологических свойств, выяснения молекулярных механизмов взаимодействия бактерий с клетками макроорганизма, разработки методов борьбы с патогенами (Schade, Weidenmaier, 2016; Guérin et al., 2022). Изучение состава и структур гликополимеров микробного происхождения представляет также интерес для ряда областей фундаментальной науки, в частности, органической химии, микробиологии, эволюции и систематики микроорганизмов.

В настоящее время в основе системы классификации прокариот лежат данные сравнительного анализа геномов, однако информация о фенотипических характеристиках, в том числе хемотаксономических, по-прежнему актуальна (Chun et al., 2018; Nouioui et al., 2018). 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 столетия (Cummins, 1962; Lechevalier, Lechevalier, 1970; Goodfellow, Jones, 2012). Для видов рода *Clavibacter* в качестве диагностических сахаров клеточных стенок указывались, в частности, галактоза, манноза, рамноза и фукоза (Davis et al., 1984). Было также показано, что типы гликополимеров клеточных стенок актиномицетов (тейхоевые, тейхуроновые и тейхулозоновые кислоты, арабиногалактаны и другие кислые или нейтральные полисахариды), их комбинации и структуры могут быть специфичными для таксонов разного ранга (Takeuchi et al., 1990; Potekhina et al., 2011; Тульская и соавт., 2011; Evtushenko, Ariskina, 2012; Goodfellow, Jones, 2012; Nouioui et al., 2018; Шашков и соавт., 2020).

Наши предыдущие исследования клеточных стенок бактерий рода *Clavibacter* (*C. michiganensis*, *C. tessellarius*, *C. phaseoli*) и представителей потенциально новых видов этого рода показали, что все они содержали по два бесфосфатных гликополимера (галактоманнан и галактофуранан), при этом структуры галактофурананов были уникальны и различались у представителей разных видов (Kim et al., 2021, Shashkov et al., 2021; Perepelov et al., 2023a, 2023b).

Целью настоящей работы было установление состава и структур гликополимеров клеточных стенок типовых штаммов двух ранее не исследованных видов рода *Clavibacter* — *C. insidiosus* и *C. nebraskensis* и оценка таксономической значимости признака “состав и структура гликополимеров клеточных стенок” для бактерий этого рода.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использованные в работе типовые штаммы *C. insidiosus* ВКМ Ac-1402<sup>T</sup> и *C. nebraskensis* ВКМ Ac-1404<sup>T</sup> получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) ([www.vkm.ru](http://www.vkm.ru)). Культуры выращивали аэробно при перемешивании в течение суток (до середины логарифмической фазы роста) при 28°C на пептонно-дрожжевой среде (ПДС) (г/л): пептон — 5; дрожжевой экстракт — 3; глюкоза — 5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0.2; pH 7.2). Клеточные стенки получали методом дифференциального центрифугирования. После разрушения на ультразвуковом дезинтеграторе клетки обрабатывали 2% раствором додецилсульфата натрия — SDS (при 100°C, 10 мин), многократно отмывали дистиллированной водой и лиофилизировали. Выделение гликополимеров из клеточных стенок осуществляли методами экстракции 10%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ) при 2–4°C (“холодная экстракция”) и экстракции 5% ТХУ при 90°C (“горячая экстракция”) (Kim et al., 2021).

Очистку и изучение полимеров химическими и ЯМР-спектроскопическими методами проводили, как описано ранее (Kim et al., 2021). Продукты кислотного гидролиза (2 М HCl, 100°C, 3 ч) клеточных стенок и гликополимеров, а также абсолютную конфигурацию моносахаридов определяли методами хроматографии и электрофореза на бумаге и методами ГЖХ (Kim et al., 2021).

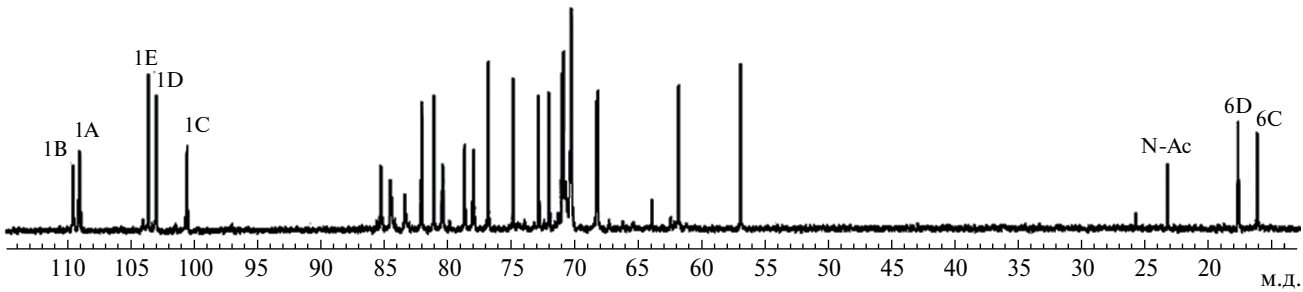
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В гидролизатах клеточных стенок обоих штаммов был выявлен одинаковый состав моносахаридов: галактоза (Gal), манноза (Man), фукоза (Fuc), рамноза (Rha), глюкозамин (GlcN) и следовые количества глюкозы (Glc). У штамма *C. insidiosus* ВКМ Ac-1402<sup>T</sup> обнаружены дополнительно следы рибозы (Rib). Клеточные стенки всех штаммов также содержали пировиноградную кислоту. Фосфатсодержащие соединения не были обнаружены (метод электрофореза) ни в продуктах кислотного гидролиза клеточных стенок штаммов, ни в выделенных из них препаратах гликополимеров.

Методами ГЖХ в кислотных гидролизатах препаратов гликополимеров обоих организмов, полученных методом “холодной экстракции”, выявлен одинаковый состав моносахаридов: Gal, Fuc, Rha и GlcN. Моносахаридный состав препаратов, полученных методом “горячей экстракции”, включал дополнительно Man.

Установлено, что Rha имела L-конфигурацию, а остальные моносахаридные компоненты полимеров (Gal, Man, Fuc и GlcN) были в D-конфигурации.

Полученные данные указывали на присутствие в клеточной стенке каждого из исследованных



**Рисунок.** Спектр <sup>13</sup>С ЯМР препарата “холодной экстракции” из клеточной стенки *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402<sup>Т</sup>. Арабские цифры в номерах относятся к атомам углерода в остатках, обозначенных заглавными буквами в табл. 1.

организмов, по крайней мере, двух бесфосфатных гликополимеров, различных по составу.

Дальнейшее изучение структур гликополимеров клеточных стенок изучаемых актинобактерий осуществляли химическими и ЯМР-спектроскопическими методами, как описано ранее (Kim et al., 2021).

Спектр <sup>13</sup>С ЯМР (рисунок, табл. 1) препарата “холодной экстракции” из штамма ВКМ Ас-1402<sup>Т</sup> был типичным для полисахарида с регулярно повторяющимся звеном. Этот спектр содержал пять сигналов примерно одинаковой интегральной интенсивности в аномерной области атомов углерода δ<sub>С</sub> 100–110 м.д., два сигнала от 6-дезоксисахаров (16.5 и 17. 9 м.д.) и сигнал от СН<sub>3</sub>-группы N-ацетила при 23.5 м.д. Остальные сигналы были расположены в области δ<sub>С</sub> 57–86 м.д.

<sup>1</sup>Н ЯМР-спектр этого препарата также содержал пять сигналов в аномерной области δ<sub>Н</sub> 4.7–5.1 м.д., два дублета от 6-дезоксисахаров (δ<sub>Н</sub> 1.24 и 1.28 м.д.,

*J*<sub>5,6</sub> 6 Гц) и сигналы от N-ацетильной группы при 2.05 м.д.

Анализ <sup>1</sup>Н,<sup>1</sup>Н COSY, TOCSY и ROESY спектров (не приведены) выявил присутствие двух остатков β-галактофуранозы (β-Galf, остатки **А** и **В**), α-фукопиранозы (α-Fucp, остаток **С**), α-рамнопиранозы (α-Rhap, остаток **Д**) и N-ацетилглюкозамин (β-GlcpNAc, остаток **Е**).

Заключение о составе моносахаридов, их пиранозной или фуранозой конфигурации, а также аномерной конфигурации гликозидного центра были сделаны на основании сравнения видимых констант спин-спинового взаимодействия и химических сдвигов остатков сахаров и соответствующих пираноз (Altona, Haasnoot, 1980; Janson et al., 1989) и фураноз (Angyal, 1979; Syr, Perlin, 1979; Bock, Pedersen, 1983).

При сравнении <sup>13</sup>С ЯМР и <sup>1</sup>Н ЯМР спектров препарата штамма ВКМ Ас-1402<sup>Т</sup> с соответствующими

**Таблица 1.** Химические сдвиги <sup>13</sup>С и <sup>1</sup>Н ЯМР (δ<sub>С</sub> TSP<sup>а</sup>–1.6 м.д. и <sup>1</sup>Н δ<sub>Н</sub> TSP 0.0 м.д.) галактофурананов из клеточных стенок *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402<sup>Т</sup> и *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404<sup>Т</sup>

| Остатки                   | (A) | C-1<br><i>H</i> -1 | C-2<br><i>H</i> -2 | C-3<br><i>H</i> -3 | C-4<br><i>H</i> -4 | C-5<br><i>H</i> -5 | C-6<br><i>H</i> -6 ( <i>H</i> -6,6') |
|---------------------------|-----|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------------------------|
| →6)-β-Galf-(1→            | (B) | 109.1<br>5.07      | 80.6<br>4. 24      | 78.1<br>4.06       | 83.4 4.18          | 70.7<br>3.99       | 70.5<br>3.86, 3.64                   |
| →6)-β-Galf-(1→<br>3)<br>↑ | (C) | 109.6<br>5.04      | 82.4<br>4.10       | 85.4<br>4.05       | 84.5<br>3.98       | 71.0<br>3.95       | 70.5<br>3.86, 3.64                   |
| α-Fucp-(1<br>3)<br>↑      | (D) | 100.8<br>4.99      | 68.5<br>3.89       | 78.9<br>3.89       | 73.1<br>3.87       | 68.4<br>4.17       | 16.5<br>1.21                         |
| α-Rhap-(1<br>3)<br>↑      | (E) | 103.5<br>5.00      | 71.1<br>4.26       | 81.3<br>3.91       | 72.3<br>3.52       | 70.5<br>3.81       | 17.9<br>1.27                         |
| β-GlcpNAc-(1              | (D) | 103.8<br>4.72      | 57.1**<br>3.73     | 75.0<br>3.57       | 71.3<br>3.47       | 77.1<br>3.45       | 62.1<br>3.90, 3.75                   |
| ***α-L-Rhap-(1→(3C)       |     | 103.5<br>5.00      | 71.1<br>4.06       | 72.2<br>3.85       | 73.3<br>3.43       | 70.1<br>3.82       | 17.9<br>1.27                         |

\* TSP — натриевая соль 3-(триметилсилил)-2,2,3,3-тетрадейтеропропионовой кислоты.  
\*\* СН<sub>3</sub>CON при δ<sub>С</sub> 23.5 м.д. (СН<sub>3</sub>) и 176.2 м.д.; (CO) и δ<sub>Н</sub> 2.03 м.д.  
\*\*\* Для *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404<sup>Т</sup> (терминальный остаток дисахарида: α-L-Rhap-(1→3)-α-D-Fucp-(1→).

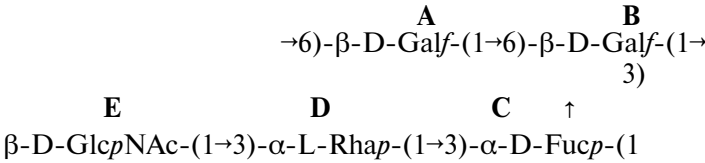
спектрами штамма ВКМ Ас-1403<sup>Т</sup>, изученного ранее (Kim et al., 2021), было выявлено их полное соответствие (химические сдвиги атомов <sup>13</sup>С и <sup>1</sup>Н для штамма ВКМ Ас-1402<sup>Т</sup> приведены в табл. 1 и на рисунке). Полученные данные свидетельствовали о сходстве структур полисахарида штамма ВКМ Ас-1402<sup>Т</sup> с изученным ранее галактофурананом *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403<sup>Т</sup> (Kim et al., 2021).

Спектры <sup>13</sup>С ЯМР (табл. 1, рисунок) были расшифрованы с использованием двумерного спектра <sup>1</sup>Н, <sup>13</sup>С HSQC. Анализ спектра <sup>1</sup>Н, <sup>13</sup>С HSQC выявил положение замещения в остатках сахаров на основании их <sup>13</sup>С химических сдвигов по сравнению с таковыми для исходных пираноз и фураноз (Bock, Pedersen, 1983). Остатки β-Galf были замещены по положению 6 (А, δ<sub>С-6</sub> 70.5) и 3,6 (В, δ<sub>С-3</sub> 85.4 и δ<sub>С-6</sub> 70.5, соответственно), остатки α-Fucp по положению 3 (С, δ<sub>С-3</sub> 78.9), остатки α-Rhap по положению 3 (D, δ<sub>С-3</sub> 81.3) и остатки β-GlcpNAc (Е) являлись терминальными для галактофуранана из штамма ВКМ Ас-1402<sup>Т</sup>. Последовательность остатков в полимерной цепи была доказана при анализе спектра <sup>1</sup>Н, <sup>1</sup>Н ROESY (табл. 1), где наблюдались корреляционные пики

δ<sub>Н</sub>/δ<sub>Н</sub> между остатками: Н-1(А)/Н-6'(В) (5.07/3.64), Н-1(В)/Н-6'(А) (5.04/3.64), Н-1(С)/Н-3(В) (4.99/4.05), Н-1(Д)/Н-3(С) (5.00/3.89), и Н-1(Е)/Н-3(Д) (4.72/3.91). Эта последовательность была подтверждена при анализе спектра <sup>1</sup>Н, <sup>13</sup>С НМВС (табл. 1), где выявлены следующие корреляционные пики δ<sub>Н</sub>/δ<sub>С</sub> между остатками Н-1(А)/С-6(В) (5.07/70.5), Н-1(В)/С-6(А) (5.04/70.5), Н-1(С)/С-3(В) (4.99/85.4), Н-1(Д)/С-3(С) (5.00/78.9) и Н1(Е)/С-3(Д) (4.72/81.3).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что галактофуранан из клеточной стенки ВКМ Ас-1402<sup>Т</sup> имел структуру, близкую к описанной ранее у *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403<sup>Т</sup> (Kim et al., 2021). Однако эти два полимера различаются положением гликозидной связи между остатками рамнозы (D) и фукозы (С) в трисахаридном заместителе: у штамма ВКМ Ас-1402<sup>Т</sup> связь 1→3, а у штамма *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403<sup>Т</sup> связь 1→2.

Таким образом, повторяющееся звено галактофуранана из штамма ВКМ Ас-1402<sup>Т</sup> можно представить следующим образом:



Сравнение <sup>13</sup>С ЯМР и <sup>1</sup>Н ЯМР спектров препаратов “холодной экстракции” из штамма ВКМ Ас-1404<sup>Т</sup> (второго исследованного штамма) с соответствующими спектрами штамма ВКМ Ас-1402<sup>Т</sup> показало их сходство. Однако на двумерных

спектрах <sup>1</sup>Н, <sup>13</sup>С HSQC, <sup>1</sup>Н, <sup>1</sup>Н ROESY и <sup>1</sup>Н, <sup>13</sup>С НМВС препарата штамма ВКМ Ас-1404<sup>Т</sup> были обнаружены дополнительные сигналы, которые расшифрованы как принадлежащие терминальным остаткам рамнопиранозы D<sub>t</sub> (табл. 1) в боковом

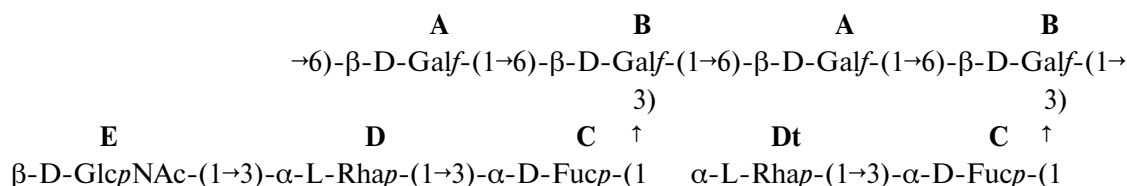
Таблица 2. Гликополимеры клеточных стенок некоторых штаммов рода *Clavibacter*

| Штаммы ВКМ                                   | Гликополимеры |      |      |      |      |      |        |
|----------------------------------------------|---------------|------|------|------|------|------|--------|
|                                              | ГФ 1          | ГФ 2 | ГФ 3 | ГФ 4 | ГФ 5 | ГФ 6 | ГМ     |
| <i>C. insidiosus</i> Ас-1402 <sup>Т</sup>    | ◆             |      |      |      |      |      | ●      |
| <i>C. michiganensis</i> Ас-1403 <sup>Т</sup> |               | ◆    |      |      |      |      | ●      |
| <i>C. nebraskensis</i> Ас-1404 <sup>Т</sup>  |               |      | ◆    |      |      |      | ●      |
| <i>C. tessellarius</i> Ас-1406 <sup>Т</sup>  |               |      |      | ◆    |      |      | ● O-Ac |
| <i>C. phaseoli</i> Ас-2641 <sup>Т</sup>      |               |      |      |      | ◆    |      | ●*     |
| <i>Clavibacter</i> sp. Ас-1371               |               |      |      |      |      | ◆    | ●      |
| <i>Clavibacter</i> sp. Ас-1372               |               |      |      |      |      | ◆    | ● O-Ac |

Примечание. (◆) — ГФ, галактофуранан, (●) — ГМ, галактоманнан.  
ГМ: →3)-α-D-Galp-(1→3)-α-D-[4,6-S-Pyr]-Manp-(1→3)-α-D-Manp-(1→ (Kim et al., 2021);  
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→ (настоящая работа);  
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→ (Kim et al., 2021);  
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→ (настоящая работа);  
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→ (Perepelov et al., 2023a);  
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→ (Perepelov et al., 2023b);  
ГФ 6: →6)-β-D-Galf-(1→6)-β-D-[α-D-Manp-(1→2)-α-D-Ribf-(1→2)]-Galf-(1→ (Shashkov et al., 2021).  
\* Наличие пируватсодержащего галактоманнана в минорных количествах предполагается на основании обнаружения его компонента (пирувиноградной кислоты) химическими методами.

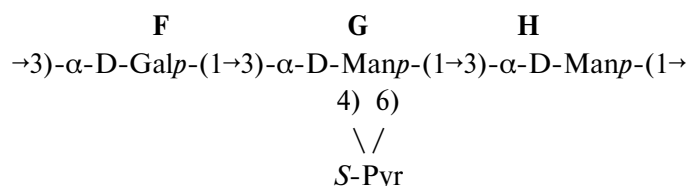
дисахарида  $\alpha$ -L-Rhap-(1→3)- $\alpha$ -D-Fucp-(1→. Дисахарид замещает каждый второй остаток галактофуранозы в интегральной цепи, чередуясь с вышеописанным (для галактофуранана штамма ВКМ Ас-1402<sup>Т</sup>) трисахаридом.

Таким образом, повторяющееся звено галактофуранана из штамма ВКМ Ас-1404<sup>Т</sup> можно представить следующим образом:



Результаты исследований препаратов “горячей экстракции” из клеточных стенок штаммов ВКМ Ас-1402<sup>Т</sup> и ВКМ Ас-1404<sup>Т</sup> 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<sup>Т</sup> (Kim et al., 2021):



В результате проведенного исследования установлены структуры гликополимеров клеточных стенок типовых штаммов видов рода *Clavibacter* — *C. insidiosus* и *C. nebraskensis*. Оба штамма содержали по два гликополимера нейтральной и кислой природы.

Первый, нейтральный полимер *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402<sup>Т</sup>, представляет собой (1→6)-связанный  $\beta$ -D-галактофуранан, каждый второй остаток которого несет боковой трисахарид,  $\beta$ -D-GlcpNAc-(1→3)- $\alpha$ -L-Rhap-(1→3)- $\alpha$ -D-Fucp-(1→. Этот полимер отличается от галактофуранана *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403<sup>Т</sup>, структура которого опубликована ранее (Kim et al., 2021), (1→3)-локализацией гликозидной связи между остатками рамнозы и фукозы в боковом трисахаридном заместителе. Нейтральный гликополимер *C. nebraskensis* ВКМ Ас-1404<sup>Т</sup> имеет структуру кора и боковой трисахарид,

идентичные таковым у *C. insidiosus* ВКМ Ас-1402<sup>Т</sup>, но отличается присутствием дополнительного дисахаридного заместителя  $\alpha$ -L-Rhap-(1→3)- $\alpha$ -D-Fucp-(1→, который чередуется с трисахаридом.

Положение (1→3)-гликозидной связи между остатками рамнозы и фукозы в боковом остатке трисахарида, а также наличие боковых дисахаридных заместителей на основной цепи галактофуранана указывает на новые детали структуры, не описанные ранее для *Clavibacter* и других грамположительных бактерий (<http://csdb.glycoscience.ru/>, 2022).

Второй гликополимер клеточных стенок исследованных штаммов — пируватсодержащий галактоманнан с повторяющимся звеном  $\rightarrow 3) - \alpha\text{-D-Galp-} (1 \rightarrow 3) - \alpha\text{-D-[4,6-S-Pyr]-Manp-} (1 \rightarrow 3) - \alpha\text{-D-Manp-} (1 \rightarrow$ . Полимер с такой структурой был впервые идентифицирован

**Таблица 3.** Сахара клеточных стенок изученных штаммов рода *Clavibacter*

| Сахара в гидролизатах клеточной стенки*          |     |     |     |     |     |      |                         |
|--------------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-------------------------|
| Штаммы                                           | Gal | Man | Fuc | Rib | Rha | GlcN | Ссылка                  |
| <i>C. insidiosus</i> ВКМ Ас-1402 <sup>Т</sup>    | +   | +   | +   | (+) | +   | +    | Н.п.                    |
| <i>C. nebraskensis</i> ВКМ Ас-1404 <sup>Т</sup>  | +   | +   | +   | —   | +   | +    | Н.п.                    |
| <i>C. michiganensis</i> ВКМ Ас-1403 <sup>Т</sup> | +   | +   | +   | —   | +   | +    | Kim et al., 2021        |
| <i>C. tessellarius</i> ВКМ Ас-1406 <sup>Т</sup>  | +   | +   | +   | —   | +   | —    | Perepelov et al., 2023a |
| <i>C. phaseoli</i> ВКМ Ас-2641 <sup>Т</sup>      | +   | +   | —   | +   | —   | —    | Perepelov et al., 2023b |
| <i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1371               | +   | +   | —   | +   | —   | —    | Shashkov et al., 2021   |
| <i>Clavibacter</i> sp. ВКМ Ас-1372               | +   | +   | —   | +   | —   | —    | Shashkov et al., 2021   |

Примечание. “+” — присутствует; “—” — отсутствует; (+) — следовые количества; н.п. — настоящая работа.

\* У всех штаммов обнаруживается также глюкоза в следовых количествах.

у *C. michiganensis* ВКМ Ас-1403Т (Kim et al., 2021) и к настоящему времени описан только у представителей рода *Clavibacter* (<http://csdb.glycoscience.ru/>, 2022). Хотя методами ЯМР-спектроскопии не удалось определить присутствие пируватсодержащего галактоманнана у *C. phaseoli* ВКМ Ас-2641Т (вероятно, из-за его незначительного количества) (Perepelov et al., 2023b), химическими методами был обнаружен его компонент (пировиноградная кислота) в составе препарата “горячей экстракции”, полученного из клеточных стенок штамма при повторных выращивании (Тульская Е. М., неопубликованные данные).

Сравнительный анализ гликополимеров, идентифицированных в настоящей работе и ранее у представителей разных видов *Clavibacter* (табл. 2), показал, что (1→6)-связанные β-D-галактофурананы (с одинаковой структурой кора и различными боковыми олигосахаридными заместителями), а также пируватсодержащий галактоманнан (несущий в ряде случаев О-ацетильные группы), присутствуют в составе клеточных стенок организмов всех 7 изученных видов *Clavibacter*. Помимо типовых штаммов признанных видов, в это число входят штаммы ВКМ Ас-1371 и ВКМ Ас-1372 — представители двух пока не описанных новых видов (Starodumova et al., 2018).

Полученные в настоящей работе результаты согласуются с ранее высказанным предположением о том, что 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 видов.

Клеточные стенки всех исследованных в этой работе и ранее штаммов содержали галактозу, маннозу, глюкозу (следовые количества); 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 нами были дополнительно выявлены глюкозамин и рибоза (табл. 3).

Таким образом, в результате проведенных исследований получены новые данные о химическом составе клеточных стенок типовых штаммов видов *C. insidiosus* и *C. nebraskensis*. Сравнительный анализ гликополимеров клеточных стенок всех изученных к настоящему времени представителей *Clavibacter* показал, что состав и структуры гликополимеров и их структурные компоненты (определяемые в кислотных гидролизатах клеточных стенок) специфичны для рода и видов *Clavibacter* и могут служить их хемотаксономическими маркерами. Полученные данные могут быть

востребованы в таксономических исследованиях и работах по выяснению молекулярных механизмов взаимодействия бактерий с клетками растений. Изучение галактофурананов как небелковых адгезинов, а также путей их биосинтеза, может представлять интерес для разработки средств борьбы с фитопатогенами рода *Clavibacter*.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075–15–2021–1051) и в рамках темы научного проекта государственного задания МГУ № 121032300094–7.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований с использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Тульская Е. М., Шашков А. С., Стрешинская Г. М., Сенченкова С. Н., Потехина Н. В., Козлова Ю. И., Евтушенко Л. И. Тейхуроновые и тейхулозоновые кислоты актиномицетов // Биохимия. 2011. Т. 76. С. 904–913.
- Tul'skaya E. M., Shashkov A. S., Streshinskaya G. M., Senchenkova S. N., Potekhina N. V., Kozlova Yu. I., Evtushenko L. I. Teichuronic and teichulosonic acids of actinomycetes // Biochemistry (Moscow). 2011. V. 76. P. 736–744. <https://doi.org/10.1134/S0006297911070030>
- Шашков А. С., Тульская Е. М., Стрешинская Г. М., Дмитренко А. С., Потехина Н. В., Сенченкова С. Н., Пискункова Н. Ф., Дорофеева Л. В., Евтушенко Л. И. Рамноманнаны и тейхуроновая кислота из клеточной стенки *Rathayibacter tritici* ВКМ Ас-1603<sup>Т</sup> // Биохимия. 2020. Т. 85. С. 428–437.
- Shashkov A. S., Tul'skaya E. M., Streshinskaya G. M., Dmitrenko A. S., Potekhina N. V., Senchenkova S. N., Piskunkova N. F., Dorofeeva L. V., Evtushenko L. I. Rhamnomannans and teichuronic acid from cell wall of *Rathayibacter tritici* VKM Ac-1603<sup>T</sup> // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. P. 369–377. <https://doi.org/10.1134/S0006297920030128>
- Altona C., Haasnoot C. A. G. Prediction of anti and gauche vicinal proton-proton coupling constants in carbohydrates: a simple additivity rule for pyranose rings // Org. Magn. Reson. 1980. V. 13. P. 417–429. <https://doi.org/10.1002/mrc.1270130606>
- Angyal S. J. Hudson's rules of isorotation as applied to furanosides, and the conformations of methyl aldofuranosides // Carbohydr. Res. 1979. V. 77. P. 37–50. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)83791-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83791-X)

- Bock K., Pedersen C. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharides // Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 1983. V. 41. P. 27–66.  
https://doi.org/10.1016/S0065-2318(08)60055-4
- Brown S., Santa Maria J. P. Jr., Walker S. Wall teichoic acids of gram-positive bacteria // Annu. Rev. Microbiol. 2013. V. 67. P. 313–336.  
https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412155620
- Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal D. R., da Costa M. S., Rooney A. P., Yi H., Xu X. W., De Meyer S., Trujillo M. E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2018. V. 68. P. 461–466.  
https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002516
- Cummins C. S. La composition chimique des parois cellulaires d'actinomycètes et son application taxonomique // Ann. Inst. Pasteur. 1962. V. 103. P. 385–391.
- Davis M. J., Graves Gillaspie A. Jr., Vidaver A. M., Harris R. W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1984. V. 34. P. 107–117.  
https://doi.org/10.1099/00207713-34-2-107
- Evtushenko L. I., Ariskina E. V. *Nocardioideaceae* // Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria / Ed. Whitman W. B. 2015. P. 1–18.  
https://doi.org/10.1002/9781118960608.fbm00042
- Guérin H., Kulakauskas S., Chapot-Chartier M. P. Structural variations and roles of rhamnose-rich cell wall polysaccharides in Gram-positive bacteria // J. Biol. Chem. 2022. V. 298. Art. 102488.  
https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102488
- Goodfellow M., Jones A. L. Order V. *Corynebacteriales* ord. nov. // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edn. / Eds. Whitmann W., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M., Ludwig W., Suzuki K. New York–Dordrecht–Heidelberg–London: Springer, 2012. V. 5. P. 1–14.  
https://doi.org/10.1002/9781118960608.obm00009
- Eichenlaub R., Gartemann K.-H. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens // Annu. Rev. Phytopathol. 2011. V. 49. P. 445–464.  
https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095258
- Janson P.-E., Kenne L., Widmalm G. Computer-assisted structural analysis of polysaccharides with an extended version of CASPER using <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-n.m.r. data // Carbohydr. Res. 1989. V. 188. P. 169–191.  
https://doi.org/10.1016/0008-6215(89)84069-8
- 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<sup>T</sup> // Carbohydr. Res. 2021. V. 500. Art. 108247.  
https://doi.org/10.1016/j.carres.2021.108247
- Lechevalier M. P., Lechevalier H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 1970. V. 20. P. 435–443.
- Nouioui I., Carro L., Garcia-Lopez M., Meier-Kolthoff J. P., Woyke T., Kyrpides N. C., Pukall R., Klenk H. P., Goodfellow M., Goker M. Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria* // Front. Microbiol. 2018. V. 9. Art. 2007.  
https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02007
- 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<sup>T</sup> // Carbohydr. Res. 2023a. V. 529. Art. 108823.  
https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108823
- 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<sup>T</sup> // Carbohydr. Res. 2023b. V. 525. P. 108778.  
https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108778
- Potekhina N. V., Streshinskaya G. M., Tul'skaya E. M., Shashkov A. S. Cell wall teichoic acids in the taxonomy and characterization of Gram-positive bacteria // Taxonomy of Prokaryotes. Methods in Microbiology / Eds. Rainey F. A., Oren A. London: Academic Press, 2011. V. 38. Ch. 6. P. 132–164.  
https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387730-7.00006-1
- Saddler G. D., Kerr E. M. “Genus V. *Clavibacter* Davis, Gillaspie, Vidaver and Harris 1984” // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd edn. / Eds. Whitmann W., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M., Ludwig W., Suzuki K. New York–Dordrecht–Heidelberg–London: Springer, 2012. V. 5. P. 877–883.
- Schade J., Weidenmaier C. Cell wall glycopolymers of *Firmicutes* and their role as nonprotein adhesins // FEBS Lett. 2016. V. 590. P. 3758–3771.  
https://doi.org/10.1002/1873-3468.12288
- 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 // Carbohydr. Res. 2021. V. 510. Art. 108435.  
https://doi.org/10.1016/j.carres.2021.108435
- Starodumova I., Prisyazhnaya N., Tarlachkov S., Dorofeeva L., Vasilenko O., Evtushenko L. Taxonomy of the genus *Clavibacter* // XXXVII Annual Meeting of the European Culture Collections' Organisation Conference Proceedings. Moscow: Moks-Press, 2018. P. 107.
- Syr N., Perlin A. S. The conformations of furanosides. A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance study // Can. J. Chem. V. 57. 1979. P. 2504–2511.  
https://doi.org/10.1139/v79-399
- Takeuchi M., Yokota A., Misaki A. Comparative structures of the cell-wall polysaccharides of four species of the genus *Microbacterium* // J. Gen. Appl. Microbiol. 1990. V. 36. P. 255–271.

## Galactofuranans and Galactomannan of Cell Walls as Chemotaxonomic Characteristics of the Genus and Species of *Clavibacter*

E. M. Tul'skaya<sup>1, \*</sup>, D. Kim<sup>1</sup>, N. V. Potekhina<sup>1</sup>, A. S. Shashkov<sup>2</sup>, S. N. Senchenkova<sup>2</sup>,  
L. V. Dorofeeva<sup>3</sup>, L. I. Evtushenko<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

<sup>2</sup>Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

<sup>3</sup>All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, 142290 Russia

\*e-mail: em\_tulskaya@mail.ru

Received July 10, 2023; revised September 13, 2023; accepted September 17, 2023

**Abstract**—Two types of glycopolymers of different structures were found in the cell walls of type strains of two species of phytopathogenic bacteria, *Clavibacter insidiosus* VKM Ac-1402<sup>T</sup> and *Clavibacter nebraskensis* VKM Ac-1404<sup>T</sup> (family *Microbacteriaceae*, class *Actinomycetes*). The first type is represented by new, previously undescribed (1→6)-linked β-D-galactofuranans, which differ in the studied strains of the two species by the structure of side oligosaccharide chains (the structures are given in the text). The structure of the second glycopolymer, pyruvate-containing galactomannan, was identical in both strains. The results obtained in this work, together with those previously obtained, indicate that the presence of pyruvate-containing galactomannan and galactofuranans with an identical core structure and different oligosaccharide side substituents can be considered as a chemotaxonomic trait of the genus *Clavibacter*, and galactofuranans with di-, tri-, or tetrasaccharide substituents of different composition and structures can serve as chemotaxonomic markers of species. The data obtained expand our understanding of the structural diversity of natural glycopolymers and structural features of the bacteria cell walls of various taxa and may be of interest for taxonomic studies and studies aimed at elucidating the molecular mechanisms of interaction between bacteria and plant cells.

**Keywords:** *Clavibacter*, galactofuranan, galactomannan, cell wall, chemotaxonomy