

ПОИСК ГЕНОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА АНТАГОНИСТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* БИМ В-446, С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ТРАНСПОЗОНОВОГО МУТАГЕНЕЗА

И. В. Попова

Белорусский государственный университет, г. Минск;

irina.porova.blr@gmail.com;

науч. рук. – Л. Н. Валентович, канд. биол. наук, доц.

С помощью метода транспозонового мутагенеза бактериального штамма *Pseudomonas brassicacearum* В-446 было отобрано 7 мутантов с повышенной антагонистической активностью по отношению к фитопатогену *P. syringae* DC3000, 7 мутантов с пониженной антагонистической активностью и 4 мутанта, вообще не проявляющих антагонистической активности. С помощью секвенирования последовательностей генов с инсерцией транспозона mini-Tn5 χ lE было найдено 8 генов, предположительно обуславливающих проявление антагонистической активности данного штамма микроорганизмов, что открывает перспективы для дальнейшего выяснения функций продуктов этих генов.

Ключевые слова: *Pseudomonas brassicacearum*; транспозоновый мутагенез; антагонистическая активность.

ВВЕДЕНИЕ

Ризосферные флюоресцирующие бактерии рода *Pseudomonas* являются перспективными продуцентами биологических препаратов для защиты растений. Они обладают несколькими уникальными свойствами, среди которых выделяется способность к синтезу антимикробных веществ – феназиновых пигментов, флороглюцинов, псевдомоновых кислот (мупираминов) и др. Также антагонистическую активность против фитопатогенов проявляют синтезируемые псевдомонадами сидерофоры – пигменты ряда пиовердинов. Они связывают ионы железа и переводят его в недоступную для бактерий-конкурентов форму, таким образом, подавляя рост и размножение многих микроорганизмов [1].

Псевдомонады оказывают благотворное влияние на растения не только с помощью антимикробных соединений, но и с помощью синтезируемых ростстимулирующих и биологически активных веществ, например, различных фитогормонов (ауксинов, гибберелинов, этилена), витаминов и гидролитических ферментов, расщепляющих белки и полисахариды на легкоусвояемые растениями составные компоненты [2].

Целью настоящей работы является идентификация регуляторных и структурных элементов генома, отвечающих за проявление антимикробной активности бактерий *Pseudomonas brassicacearum*.

Актуальность выбранного направления исследований обусловлена необходимостью поиска новых биологически активных антимикробных соединений, изучения путей и регуляции их биосинтеза, а также конструирования на основе генов этих путей штаммов-продуцентов для использования в хозяйственной деятельности [3].

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлись природные бактерии *P. brassicacearum* БИМ В-446 из коллекции непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси. Для получения мутантов использовался метод транспозонового мутагенеза. Перенос транспозона mini-Tn5хуIЕ из клеток донора *Escherichia coli* S17-1, содержащих суицидный вектор рUT::mini-Tn5хуIЕ, осуществляли методом конъюгации. Таким образом, было получено 200 мутантов с единичной инсерцией транспозона в хромосому реципиента. Для дальнейшего анализа были отобраны мутанты с изменённой антагонистической активностью по отношению к фитопатогенной бактерии *P. syringae* DC3000 [4].

Для определения локализации вставки транспозона проводили клонирование фрагментов хромосомы в составе плазмидного вектора рUC19 в бактериях *E. coli* XL1-Blue, при этом отбирали конструкции, несущие маркер транспозона (Km^r). Затем проводили секвенирование плазмид по методу Сенгера с использованием праймера Tn5_OE (GCCGCACTTGTGTATAAG) и анализировали полученную последовательность с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) путем сравнения с базой данных Ген-Банк (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для бактерий *P. brassicacearum* характерна способность подавлять рост многих фитопатогенных микроорганизмов, например, оомицета *Phytophthora cactorum*, гриба *Verticillium dahliae* и бактерии *Clavibacter michiganensis* [5]. Антимикробные свойства штамма *P. brassicacearum* БИМ В-446, в частности, его способность синтезировать 2,4-диацетилфлороглюцинол, активно изучаются в Институте микробиологии НАН Беларуси [6]. В то же время важным является поиск новых генетических детерминант антагонистической активности вышеназванного штамма.

Поиск генов осуществлялся с помощью метода транспозонового мутагенеза, в ходе которого было отобрано 18 мутантов с изменённой антагонистической активностью, результаты отбора приведены в табл. 1.

Таблица 1

Антагонистическая активность полученных транспозонных мутантов*

Номер мутанта	Антагонистическая активность
9, 61, 62, 63, 64, 147, 183	+
17, 49, 50, 53, 59, 77, 78	-
89, 90, 149, 186	0

* «+» – антагонистические свойства выражены сильнее, чем у исходного штамма; «-» – пониженная антагонистическая активность; «0» – антагонистическая активность отсутствовала или была выражена крайне слабо.

Затем с помощью клонирования и секвенирования фрагментов хромосом удалось установить место инсерций транспозона у 8 мутантов, результаты аннотирования нуклеотидных последовательностей путём сравнения с базой данных ГенБанк представлены в табл. 2.

Таблица 2

Гены, наиболее схожие с измененной кодирующей последовательностью

Номер мутанта	Продукт гена	Процент сходства с генами других штаммов
17(-)	Предполагаемая пептидсинтетаза	92 % (<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> NFM421, AEA70310.1)
50(-)	ImpL белок	91 % (<i>P. brassicacearum</i> L13-6-12, AOS42605.1)
61(+)	Предполагаемая оксидоредуктаза	93 % (<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> NFM421, AEA72036.1)
63(+)	Углерод-азот гидролаза	88 % (<i>P. brassicacearum</i> L13-6-12, AOS38264.1)
77(-)	Предполагаемая фосфодиэстераза	97 % (<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> NFM421, AEA68539.1)
78(-)	АТФ-зависимая протеаза	94 % (<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> NFM421, AEA68032.1)
	Белок систем секреции	94 % (<i>P. brassicacearum</i> LBUM300, ALQ04467.1)
90(0)	MFS-транспортёр	94 % (<i>P. brassicacearum</i> L13-6-12, AOS40102.1)
147(+)	Триглицерид липаза	93 % (<i>P. brassicacearum</i> subsp. <i>brassicacearum</i> NFM421, AEA69127.1)

На основании полученных данных была предположена связь между инактивированными генами и изменением антагонистической активности мутантов. Например, ген пептидсинтетазы был инактивирован у мутанта №17, что может объяснять его пониженную антагонистическую активность, так как ферменты этого семейства отвечают за нерибосомный синтез циклических пептидов, многие из которых обладают антимикробной активностью [7].

Ген MFS-транспортёра был инактивирован у мутанта 90, что привело у него к полному отсутствию проявления антагонистической активности. MFS-транспортёры – это семейство трансмембранных белков, которые обеспечивают транспорт веществ через цитоплазматическую мембрану с использованием хемоосмотического градиента. Данные транспортёры могут переносить довольно разнообразные метаболиты, в том числе и вещества, проявляющие антимикробную активность [8]. Возможно, инактивированный ген ответственен за синтез транспортёра, отвечающего за транспорт основных антибактериальных метаболитов в изучаемом штамме псевдомонад.

Нарушения в генах, кодирующих белки II и III систем секреции, у мутантов 50 и 78 объясняют их пониженную антагонистическую активность, так как эти системы – один из путей выхода во внешнюю среду белков с потенциальными антимикробными свойствами [9].

В ходе работы не было обнаружено уже известных генов, обеспечивающих синтез антимикробных метаболитов, поэтому в дальнейшей работе можно более подробно изучить генетические детерминанты антагонистической активности и определить новые антибиотические вещества, например, с помощью метода масс-спектрометрии. Анализ генетических детерминант антагонистической активности позволит выяснить механизмы регуляции синтеза антимикробных веществ и в дальнейшем использовать эти гены при конструировании новых штаммов-продуцентов.

Библиографические ссылки

1. Raaijmakers J.M. Frequency of Antibiotic-Producing *Pseudomonas* spp. in Natural Environments / J.M. Raaijmakers, D.M. Weller, L.S. Thomashow // APPL. ENV. MICROBIOL. – 2018. – Vol. 63 – P. 7.
2. Roquigny R. Pseudomonadaceae: From Biocontrol to Plant Growth Promotion / [Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation / ed. S. Mehnaz. – Singapore: Springer Singapore, 2017. – Pseudomonadaceae. – P. 39–68.
3. Лысак В.В. Максимова Н.П. Теоретические и прикладные аспекты создания биопрепаратов для защиты растений // Вестн. БГУ. Сер. 2. 2001. № 3. – С. 56 – 64.
4. Sarkar S.F. Evolution of the Core Genome of *Pseudomonas syringae*, a Highly Clonal, Endemic Plant Pathogen / S.F. Sarkar, D.S. Guttman // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70, № 4 – P. 1999–2012.
5. Novinscak A. Complete Genome Sequence of *Pseudomonas brassicacearum* LBUM300, a Disease-Suppressive Bacterium with Antagonistic Activity toward Fungal, Oomycete, and Bacterial Plant Pathogens / Genome Announc. – 2016. – Vol. 4, № 1 – P. e01623-15.
6. Мандрик-Литвинкович М.Н. Молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих синтез 2,4-диацетилфлороглюцинола бактериями *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 // Прикладная Биохимия И Микробиология. – 2017, № 1 – С. 38-46.
7. Mishra S.H. Generating Novel Antibiotics from Non-Ribosomal Peptide Synthetases / S.H. Mishra // Adv. Tech. Biol. Med. – 2014. – T. 02, № 01.
8. Quistgaard E.M. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way / [et al.] // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2016. – Vol. 17, № 2 – P. 123-132.
9. Green E.R. Bacterial Secretion Systems: An Overview / E.R. Green, J. Mecsas // Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition / eds. I.T. Kudva [et al.]. – American Society of Microbiology, 2016. – Bacterial Secretion Systems. – P. 215–239.