
БИОТЕХНОЛОГИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ

BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY

УДК 579.253.43

УВЕЛИЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* S-1 В РЕЗУЛЬТАТЕ ИНАКТИВАЦИИ ГЕНОВ *lysR3* И *mtfA*

А. А. МУРАТОВА¹⁾, М. Н. МАНДРИК-ЛИТВИНКОВИЧ¹⁾, Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ^{1), 2)}

¹⁾Институт микробиологии НАН Беларуси,

ул. Академика В. Ф. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Беларусь

²⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Проведена направленная безмаркерная инактивация генов *lysR3* и *mtfA* у бактерий *Pseudomonas brassicacearum* S-1. Показано, что у штаммов *P. brassicacearum* S-1-*lysR3*, *P. brassicacearum* S-1-*mtfA* и *P. brassicacearum* S-1-*lysR3*-*mtfA* антагонистическая активность в отношении ряда фитопатогенов в 1,2–1,6 раза выше, чем у исходного штамма. Полученные мутантные варианты в модельном эксперименте не оказывали фитотоксического действия на рост и развитие растений томата, огурца и петрушки. При обработке семян томата и огурца раствором культуральной жидкости штамма *P. brassicacearum* S-1-*lysR3*-*mtfA* длина корней проростков увеличивалась в 1,4 раза в сравнении с длиной корней при воздействии исходного штамма. Также было показано, что исследованные штаммы способны выживать в почвенном микробном консорциуме.

Ключевые слова: мутагенез; рекомбинерия; антимикробная активность; *Pseudomonas brassicacearum*; ростостимуляция.

Образец цитирования:

Муратова АА, Мандрик-Литвинкович МН, Валентович ЛН. Увеличение антимикробной активности бактерий *Pseudomonas brassicacearum* S-1 в результате инактивации генов *lysR3* и *mtfA*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;2:52–63. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-52-63>

For citation:

Muratova AA, Mandryk-Litvinkovich MN, Valentovich LN. Increasing the antimicrobial activity of *Pseudomonas brassicacearum* S-1 by inactivation of *lysR3* and *mtfA* genes. *Journal of the Belarus State University. Biology*. 2021;2:52–63. Russian. <https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-2-52-63>

Авторы:

Анна Алексеевна Муратова – младший научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований».

Марина Николаевна Мандрик-Литвинкович – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией молекулярной диагностики и биологического контроля фитопатогенных микроорганизмов отдела биотехнологии средств биологического контроля.

Леонид Николаевич Валентович – кандидат биологических наук, доцент; заведующий лабораторией «Центр аналитических и генно-инженерных исследований»¹⁾, старший преподаватель кафедры молекулярной биологии биологического факультета²⁾.

Authors:

Anna A. Muratova, junior researcher at laboratory «Centre of analytical and genetic engineering research».
anya.muratova.93@mail.ru

Maryna N. Mandryk-Litvinkovich, PhD (biology), docent; head of the laboratory of molecular diagnostics and biological control of phytopathogenic microorganisms, department of biotechnology of biological control agents.
biocontrol@mbio.bas-net.by

Leonid N. Valentovich, PhD (biology), docent; head of the laboratory «Centre of analytical and genetic engineering research»^a and senior lecturer at the department of molecular biology, faculty of biology^b.
valentovich@mbio.bas-net.by



INCREASING THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* S-1 BY INACTIVATION OF *lysR3* AND *mtfA* GENES

A. A. MURATOVA^a, M. N. MANDRYK-LITVINKOVICH^a, L. N. VALENTOVICH^{a, b}

^aInstitute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus,

2 Academician V. F. Kupreviča Street, Minsk 220141, Belarus

^bBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: A. A. Muratova (anya.muratova.93@mail.ru)

Site-specific markerless inactivation of genes *lysR3* and *mtfA* of bacteria *Pseudomonas brassicacearum* S-1 was carried out. It was shown that strains *P. brassicacearum* S-1-*lysR3*, *P. brassicacearum* S-1-*mtfA* and *P. brassicacearum* S-1-*lysR3*-*mtfA* demonstrate increased antagonistic activity against a number of phytopathogens 1.2–1.6 times higher compared with the original strain. In the laboratory experiment, mutant variants did not affect growth and development of tomato, cucumber and parsley plants. Treating tomato and cucumber seeds with a solution of the culture of the strain *P. brassicacearum* S-1-*lysR3*-*mtfA* led to the increase of seedlings roots length by 1.4 times compared with the original strain. We also determined that the examined strains were able to survive in the soil microbial consortium.

Keywords: mutagenesis; recombineering; antimicrobial activity; *Pseudomonas brassicacearum*; growth stimulation.

Введение

Важным фактором для получения высокой урожайности в современных системах земледелия является защита сельскохозяйственных культур от фитопатогенов. Для этого используются высокоэффективные химические средства защиты растений [1]. Однако существует ряд значительных недостатков применения пестицидов: подавление роста полезных почвенных микроорганизмов, умеренная фитотоксичность, загрязнение окружающей среды и т. д. [2]. Альтернативой пестицидам являются биопрепараты на основе живых штаммов ризобактерий [3]. Для создания таких средств защиты растений, в частности, используются бактерии рода *Pseudomonas*, продуцирующие во внешнюю среду широкий спектр биологически активных соединений с антимикробным и ростостимулирующим действием [4].

В настоящее время ведутся работы по созданию улучшенных препаратов нового поколения с комбинированными свойствами или более высокими показателями антагонистической и ростостимулирующей активности [5; 6]. Однако без информации о регуляторных и структурных элементах геномов, связанных с хозяйственно значимыми признаками, это довольно затруднительно. Ранее нами была определена нуклеотидная последовательность генома штамма *P. brassicacearum* S-1 (код доступа в базе данных *GenBank* – CP045701) [7], который является основой биопрепарата «Экогрин», разработанного на базе Института микробиологии НАН Беларуси. Данный препарат используется для защиты огурцов, томатов и зеленных культур от корневых и прикорневых гнилей [8]. Таким образом, стало возможным проведение детального молекулярно-генетического анализа в целях изучения механизмов синтеза первичных и вторичных метаболитов и последующего создания штаммов с улучшенными свойствами для практического использования. В частности, без внесения дополнительных генетических детерминант можно повысить антимикробную и ростостимулирующую активность штаммов за счет направленного изменения отдельных генов [9]. Также нами проведен транспозонный мутагенез для выявления генов, которые способны определять антагонистическую активность штамма *P. brassicacearum* S-1, но не входят в состав описанных в литературе кластеров. В результате анализа 100 мутантов были отобраны два штамма, у которых увеличивалась антагонистическая активность в отношении ряда фитопатогенов в сравнении с контролем. У отобранных мутантов определено место инсерции транспозона *mini-Tn5xylE*. Установлено, что вставка произошла в кодирующие белок последовательности GFU70_00385 и GFU70_25165, которые мы назвали *lysR3* и *mtfA* соответственно, так как они, предположительно, ответственны за синтез транскрипционного фактора семейства LysR и металлопептидазы семейства M90 [10; 11]. Однако полученные данные не позволили нам однозначно интерпретировать фенотипический эффект мутаций: с одной стороны, в результате редкого события множественной транспозиции *mini-Tn5xylE* мог встроиться в несколько точек в геноме, с другой стороны, так как в составе транспозона *mini-Tn5xylE* присутствует конститутивный промотор, наблюдаемые эффекты могут быть вызваны не инактивацией тех генов, в которые непосредственно встроился транспозон, а изменением экспрессии нижележащих генов. Таким образом, только при направленной безмаркерной инактивации генов *lysR3* и *mtfA* можно сделать точное заключение о роли данных кодирующих белок последовательностей в изменении антимикробных свойств штамма *P. brassicacearum* S-1.



Целью настоящего исследования являлись молекулярно-генетический анализ генов *lysR3* и *mtfA*, вероятно кодирующих синтез транскрипционного фактора семейства LysR и металлопептидазы семейства M90 соответственно, и определение их роли в проявлении антагонистической и ростостимулирующей активности у бактерий *P. brassicacearum* S-1.

Материалы и методы исследования

Использованные в работе штаммы бактерий и плазмиды перечислены в табл. 1. Объектом исследования являлись бактерии *P. brassicacearum* S-1 – антагонисты фитопатогенов сельскохозяйственных культур. Глубинное культивирование псевдомонад и пектобактерий осуществляли на питательной среде LB (лизогенный бульон) [12] или Мейнелла [13] с перемешиванием при 200 об/мин и температуре 28–30 °С. Продолжительность культивирования составляла 24–48 ч. Бактерии *Escherichia coli* выращивали при 37 °С в жидкой LB-среде в течение 12–14 ч с перемешиванием при 120–160 об/мин. Грибные патогены культивировали в картофельном бульоне с перемешиванием при 120–160 об/мин и температуре 22 °С.

Таблица 1

Характеристика штаммов микроорганизмов и плазмид, использованных в работе

Table 1

Characteristics of strains and plasmids used in this work

Штаммы, плазмиды	Характеристика	Источник
Микроорганизмы		
<i>Alternaria alternata</i> БИМ В-462	Возбудитель альтернариоза огурца	Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов
<i>Pseudomonas syringae</i> БИМ В-280	Возбудитель бактериального ожога сои	
<i>Pectobacterium carotovorum</i> БИМ В-662	Возбудитель мокрых гнилей овощных культур	
<i>Colletotrichum lupini</i> БИМ F-397	Возбудитель антракноза люпина	
<i>Fusarium oxysporum</i> БИМ F-798	Возбудитель корневой гнили томата	
<i>E. coli</i>		
S17-1	<i>thi rspL</i> (Str ^R) <i>endA sbcB15 sbcC hsdR</i> (r _k ⁻ m _k ⁻) Δ (<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD36 lacI</i> ^q Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15 proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺] λ <i>pir</i> ⁺	[14]
XL1-Blue	F' <i>proAB lacI</i> ^q <i>lacZ</i> Δ <i>M15 Tn10</i> (Tet ^r)/ <i>recA1 endA1 gyrA96</i> (Nal ^r) <i>thi-1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>supE44 relA1 lac</i>	[15]
<i>P. brassicacearum</i>		
S-1 (БИМ В-446)	Eγ ^R , содержит спонтанную хромосомную мутацию, определяющую устойчивость к эритромицину, получен из штамма <i>P. brassicacearum</i> S	Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов
S-1-lysR3	Eγ ^R , в хромосоме <i>P. brassicacearum</i> S-1 делеция в гене <i>lysR3</i> с 286 по 522 п. н.	Получены в данной работе
S-1-mtfA	Eγ ^R , в хромосоме <i>P. brassicacearum</i> S-1 делеция в гене <i>mtfA</i> с 60 по 547 п. н.	
S-1-lysR3-mtfA	Eγ ^R , в хромосоме <i>P. brassicacearum</i> S-1 делеция в генах <i>lysR3</i> с 286 по 522 п. н. и <i>mtfA</i> с 60 по 547 п. н.	
Плазмиды		
pJET1.2	Ap ^R , P _{lacUV5} , <i>eco47IR</i> , oriV _{ColE1}	Официальный сайт фирмы-изготовителя ¹
pJQ200KS	Gm ^R , <i>lacZα</i> , <i>sacB</i> , <i>mob</i> , oriV _{p15A}	[16]

¹CloneJET PCR Cloning Kit [Electronic resource]. URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231> (date of access: 18.02.2021).



Окончание табл. 1
Ending table 1

Штаммы, плазмиды	Характеристика	Источник
pLS1648	Ap ^R , Km ^R , кассета loxP- <i>neo</i> -loxP, oriV _{R6K}	[17]
pLS3063	Tc ^R , <i>xyIS</i> , Pm – λ Red (Gam, Beta, Exo), <i>sacB</i> , <i>mekR</i> , P _{MekA} – cre, oriV _{RR2}	
pJET:: <i>lysR3</i>	pJET со вставкой гена <i>lysR3</i> с фланкирующими генами	Получены в данной работе
pJET:: <i>mtfA</i>	pJET со вставкой гена <i>mtfA</i> с фланкирующими генами	
pJET:: <i>lysR3-loxP-neo-loxP</i>	pJET со вставкой локуса генов <i>lysR3-loxP-neo-loxP</i> по сайту Eco32I	
pJET:: <i>mtfA-loxP-neo-loxP</i>	pJET со вставкой локуса генов <i>mtfA-loxP-neo-loxP</i> по сайту Eco32I	
pJQ200KS:: <i>lysR3-loxP-neo-loxP</i>	pJQ200KS со вставкой локуса генов <i>lysR3-loxP-neo-loxP</i> по сайту SmaI	
pJQ200KS:: <i>mtfA-loxP-neo-loxP</i>	pJQ200KS со вставкой локуса генов <i>mtfA-loxP-neo-loxP</i> по сайту SmaI	

Для ферментативного разрезания молекул ДНК использовали следующие эндонуклеазы рестрикции: SmaI, Eco32I, EcoO109I, KpnI. Для лигирования ДНК применяли ДНК-лигазу T4 (все ферменты производства компании *Thermo Fisher Scientific* (США)), придерживаясь рекомендаций фирмы-изготовителя.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием реактивов ООО «АртБиоТех» (Беларусь). Реакционная смесь (50 мкл) содержала 100 нг ДНК-матрицы, дНТФ (нуклеозидтрифосфаты, по 0,2 ммоль/л каждого нуклеотида), 1,5 ммоль/л MgCl₂, 0,2 мкмоль/л каждого праймера, Flash ДНК-полимеразу (1,25 ед.) и АМ-буфер (кратность ×1). Проверка на наличие шпилечных структур в пределах праймеров и определение температуры отжига выполнялись с помощью ресурса Primer-BLAST и онлайн-олигокалькулятора². Перечень и характеристика праймеров, режимы ПЦР приведены в табл. 2.

Таблица 2

Характеристика использованных в работе праймеров и режимов ПЦР

Table 2

Characteristics of primers used in this work and PCR programs

Праймер	Последовательность (5' → 3')	Режим ПЦР	Мишень
pJET-F	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	96 °C – 3 мин (1 цикл); 96 °C – 15 с, 53 °C – 15 с, 72 °C – 1 мин 30 с (30 циклов); 72 °C – 3 мин (1 цикл)	Вставка в плазмиде pJET1.2
pJET-R	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG		
lysR3-F	AGTACGTGGAGCGCACATTG	98 °C – 3 мин (1 цикл); 98 °C – 15 с, 53 °C – 15 с, 72 °C – 1 мин (30 циклов); 72 °C – 3 мин (1 цикл)	Ген <i>lysR3</i> с фланкирующими генами
lysR3-R	TTCGTAGCCGTGCAACTGGT		
mtfA-F	AGGTCGGTGTATTCCTTCAC	98 °C – 3 мин (1 цикл); 98 °C – 15 с, 60 °C – 15 с, 72 °C – 1 мин (30 циклов); 72 °C – 3 мин (1 цикл)	Ген <i>mtfA</i> с фланкирующими генами
mtfA-R	ATCTACGCCATCCTGTTCCCT		
loxP-F	CCGAAGTTCCTATTCTCTAG	96 °C – 3 мин (1 цикл); 96 °C – 15 с, 53 °C – 15 с, 72 °C – 40 с (30 циклов); 72 °C – 3 мин (1 цикл)	Конструкция loxP- <i>neo</i> -loxP на плазмиде pLS1648
loxP-R	CGAAAAGTGCCACCTGCATCG		

²Олиго Кальк: программа для расчета свойств олигонуклеотидов (праймеров) [Электронный ресурс]. URL: <http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html> (дата обращения: 19.02.2021).



Праймер	Последовательность (5' → 3')	Режим ПЦР	Мишень
cre-F	ACGAGTGATGAGGTTTCGC	96 °С – 3 мин (1 цикл); 96 °С – 15 с, 54 °С – 15 с, 72 °С – 1 мин 30 с (30 циклов);	Ген, кодирующий Cre-рекомбиназу, на плазмиде pLS3063
trfA-R	CGAAGAGTTGCGAGGCAGC	72 °С – 3 мин (1 цикл)	

Электротрансформацию бактерий *E. coli* проводили согласно методическим рекомендациям, изложенным в руководстве [18].

Плазмидную ДНК из бактерий выделяли с использованием набора GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (каталожный номер – K0502) производства *Thermo Fisher Scientific*.

Для направленного мутагенеза применяли сочетание λ -Red-зависимой рекомбинации и сайт-специфической рекомбинации Cre-loxP. Совокупность данных методов позволяет без внесения дополнительных генетических детерминант инактивировать целевые гены, а также проводить множественные нокауты генов в составе хромосомы исследуемого штамма. Мутагенез выполняли согласно модифицированной методике, изложенной в статье С. В. Буйницкой с соавторами [19].

Конъюгацию осуществляли следующим образом: клетки донора *E. coli* S17-1, содержащие плазмидные конструкции pJQ200KS::lysR3-loxP-neo-loxP, pJQ200KS::mtfA-loxP-neo-loxP, а также клетки реципиента *P. brassicacearum* S-1 [pLS3063], находящиеся в стационарной фазе роста, сгущали в 5 раз, смешивали в соотношении 1 : 1 и наносили полученную смесь на стерильные мембранные фильтры Synpro 6 (размер пор – 0,45 мкм), помещенные на поверхность полноценной агаризованной среды в чашках Петри. Скрещиваемые бактерии инкубировали в течение 48 ч при 30 °С, после чего клетки смывали физиологическим раствором и высевали на селективные среды.

Определение антимикробной активности проводили в трехкратной повторности с помощью метода отсроченного антагонизма [20], расчеты выполняли с учетом стандартного отклонения³. Достоверность различий средних величин устанавливали с помощью *t*-критерия Стьюдента⁴. В качестве тест-культур использовали штаммы фитопатогенных микроорганизмов, приведенные в табл. 1.

Способность штаммов *P. brassicacearum* S-1, *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA и *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA стимулировать рост и развитие растений томата сорта Загадка, огурца сорта Крак F1 и петрушки сорта Листовая обычная определяли следующим образом: семена в течение 30 мин замачивали в растворе культуральных жидкостей (КЖ) бактерий $((1,4-2,2) \cdot 10^8$ КОЕ/мл) или воде (отрицательный контроль), после чего раскладывали на увлажненные бумажные фильтры в чашки Петри. Через 3–6 сут определяли всхожесть, а через 11–14 сут измеряли длину корней и гипокотили у проростков в опытном и контрольном вариантах.

Для проверки жизне- и конкурентоспособности штаммов *P. brassicacearum* S-1, *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA и *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA осуществляли моделирование почвенного микробного консорциума, для которого использовали почвогрунт *Terra Vita* (ООО «Норд Палп», Россия). В подготовленную почву высаживали растения томата, огурца и петрушки, которые предварительно были пророщены на смоченных в воде фильтрах в чашках Петри. Через 2 сут после высадки проростков в качестве полива растений вносили по 20 мл растворов КЖ исследуемых штаммов $((3,2-4,4) \cdot 10^9$ КОЕ/мл) на 150 г почвы. Через 15 и 31 сут после внесения в почву исследуемых штаммов осуществляли отбор 1 г почвы, готовили серии разведений, из которых проводили высеv на селективные среды, содержащие антибиотики – эритромицин и ампициллин – в концентрациях 50 и 100 мкг/мл соответственно. Подсчет числа КОЕ выполняли согласно методическим рекомендациям, изложенным в руководстве [21].

Визуализацию карт плазмидных векторов и генетических локусов осуществляли с помощью программы *SnapGene Viewer 5.2*. Сравнение аминокислотных и нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакета программ *Blast* [22] и баз данных, расположенных на ресурсе NCBI [23].

Результаты и их обсуждение

Согласно литературным данным не было описано влияние генов *lysR3* (GFU70_00385), *mtfA* (GFU70_25165) или их ортологов на хозяйственно ценные свойства бактерий рода *Pseudomonas*, которые

³Calculating standard deviation step by step [Electronic resource]. URL: <https://www.khanacademy.org/math/statistics-probability/summarizing-quantitative-data/variance-standard-deviation-population/a/calculating-standard-deviation-step-by-step> (date of access: 24.02.2021).

⁴Расчет *t*-критерия Стьюдента при сравнении средних величин (онлайн-калькулятор) [Электронный ресурс]. URL: <https://medstatistic.ru/calculators/averagetestudent.html> (дата обращения: 06.04.2021).



являются основой биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных растений от болезней. Таким образом, чтобы определить изменение фенотипических свойств штамма *P. brassicacearum* S-1, связанных с инактивацией генов *lysR3*, *mtfA*, проведен молекулярно-генетический анализ исследуемых генетических детерминант.

Ген *lysR3* кодирует белок размером 315 аминокислотных остатков (а. о.) (pI 5,78). Было установлено, что белок LysR имеет наибольшее сходство с белками LysR из *Pseudomonas* sp. SWR1179 (WP_186728495.1, идентичность 96,52 %) и *Pseudomonas* sp. Root401 (WP_0574449273.1, идентичность 96,20 %). Он содержит домен chol_sulf_TF (8–297 а. о., TIGR03418), который характерен для транскрипционных факторов, обеспечивающих регуляцию экспрессии генов, ответственных за транспорт холина и синтез холинсульфата. Считается, что холин и его производные в бактериях являются предшественниками глицинбетаина, который действует как эффективный осмопротектор [24].

Ген *mtfA* определяет синтез белка размером 270 а. о. (pI 4,75). Как показал анализ, наибольшее сходство исследуемый белок имеет с белками из *P. fluorescens* (WP_064107071.1, идентичность 98,89 %) и *P. kilonensis* (WP_024619870.1, идентичность 98,15 %). Белок MtfA содержит домен Peptidase_M90 (4–249 а. о., pfam06167), который хорошо охарактеризован для бактерий *E. coli* [25]. Считается, что белок MtfA может инактивировать репрессор Mlc, который играет одну из ключевых ролей в регуляции работы глюкозофосфотрансферазной системы бактерий.

Было установлено, что гены *lysR3* и *mtfA* присутствуют в геномах не только всех изученных штаммов *P. brassicacearum*, но и других представителей рода *Pseudomonas*. Это говорит о важности выполняемых данными генами функций для клетки.

Далее для изучения влияния генов *lysR3* и *mtfA* на антимикробные свойства исследуемого штамма проводили направленный безмаркерный нокаут генов в несколько этапов. Для этого были амплифицированы генетические локусы, состоящие из генов *lysR3* и *mtfA* с фланкирующими генами. Для сохранности полученных ампликонов выполняли лигирование ПЦП-продуктов с вектором pJET1.2 по сайту Eco32I. Отбор рекомбинантных генетических конструкций осуществляли в клетках *E. coli* XL1-Blue. Затем выделяли плазмиды pJET::*lysR3*, pJET::*mtfA* и обрабатывали их парами рестриктаз Eco32I/SmaI и EcoO109I/KpnI соответственно для удаления большей части нуклеотидной последовательности целевых генов. В результате рамка считывания генов *lysR3* и *mtfA* была нарушена, оставались лишь области для гомологичной рекомбинации ниже и выше от генов *lysR3* и *mtfA* размером 669 и 859 п. н., а также 531 и 831 п. н. соответственно.

На следующем этапе проводили амплификацию фрагмента loxP-*neo*-loxP из плазмиды pLS1648, который лигировали с фрагментами плазмид pJET::*lysR3* и pJET::*mtfA*. Гибридные конструкции отбирали в клетках *E. coli* XL1-Blue. Затем выделяли полученные плазмиды pJET::*lysR3*-loxP-*neo*-loxP, pJET::*mtfA*-loxP-*neo*-loxP, выполняли амплификацию каскад *lysR3'*-loxP-*neo*-loxP-'*lysR3* и *mtfA'*-loxP-*neo*-loxP-'*mtfA* с использованием пар праймеров *lysR3*-F/*lysR3*-R и *mtfA*-F/*mtfA*-R. Полученные ПЦП-фрагменты лигировали с конъюгативным вектором pJQ200KS, предварительно обработанным рестриктазой SmaI. Схема получения конъюгативных векторов pJQ200KS::*lysR3*-loxP-*neo*-loxP и pJQ200KS::*mtfA*-loxP-*neo*-loxP представлена на рис. 1.

Векторные конструкции pJQ200KS::*lysR3*-loxP-*neo*-loxP, pJQ200KS::*mtfA*-loxP-*neo*-loxP вводили в клетки конъюгативного штамма *E. coli* S17-1 методом электропорации. Также была проведена электропорация клеток-реципиентов *P. brassicacearum* S-1 плазмидой pLS3063. Далее осуществляли конъюгацию на фильтрах штаммов-доноров *E. coli* S17-1 [pJQ200KS::*lysR3*-loxP-*neo*-loxP], *E. coli* S17-1 [pJQ200KS::*mtfA*-loxP-*neo*-loxP] и штамма-реципиента *P. brassicacearum* S-1 [pLS3063].

В результате гомологичной рекомбинации удалось отобрать варианты, несущие дефектные гены *lysR3* и *mtfA*. В составе данных генов после рекомбинации находились каскады loxP-*neo*-loxP, для удаления которых осуществляли индукцию экспрессии гена (в составе плазмиды pLS3063), кодирующего Cre-рекомбиназу. Cre-рекомбиназа удаляла каскады loxP-*neo*-loxP из состава хромосомы отобранных штаммов, что было подтверждено с помощью ПЦП: получены ампликоны дефектных генов размером 1646 п. н. для *lysR3* и 1480 п. н. для *mtfA* (рис. 2).

Далее проводили элиминацию плазмиды pLS3063 из мутантных вариантов путем посева штаммов на среду с сахарозой, в результате чего происходила экспрессия гена *sacB* (находился в составе плазмиды pLS3063) и образование фермента левансахаразы, который обеспечивает превращение сахарозы в токсичное для грамотрицательных бактерий соединение – леван. Выживали только те клетки, которые утратили плазмиду pLS3063. Отсутствие данной плазмиды в клетках проверено с помощью ПЦП со специфическими праймерами cre-F/trfA-R. В результате отобранны варианты бактерий *P. brassicacearum* S-1 с дефектными генами *lysR3* и *mtfA*. Аналогичным способом был получен штамм, несущий мутации по двум генам одновременно, при этом инактивированные гены не имеют в своем составе дополнительных генетических детерминант.

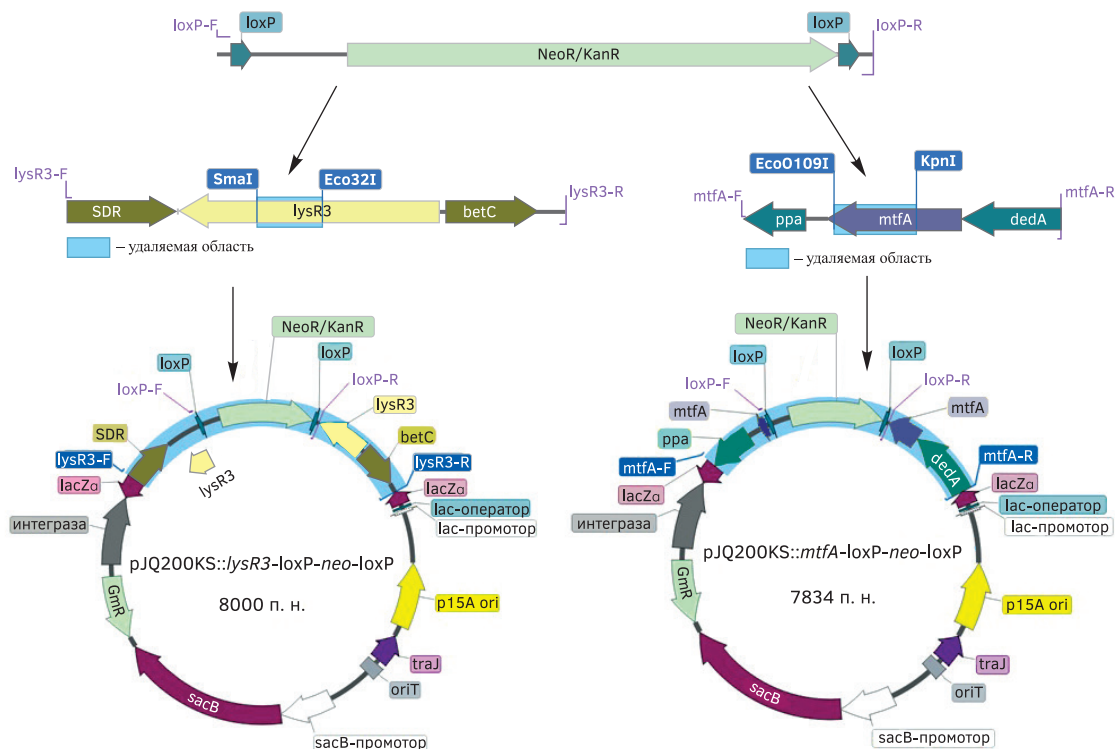


Рис. 1. Схема получения генетических конструкций pJQ200KS::lysR3-loxP-neo-loxP и pJQ200KS::mtfA-loxP-neo-loxP
Fig. 1. Design of genetic constructs pJQ200KS::lysR3-loxP-neo-loxP and pJQ200KS::mtfA-loxP-neo-loxP

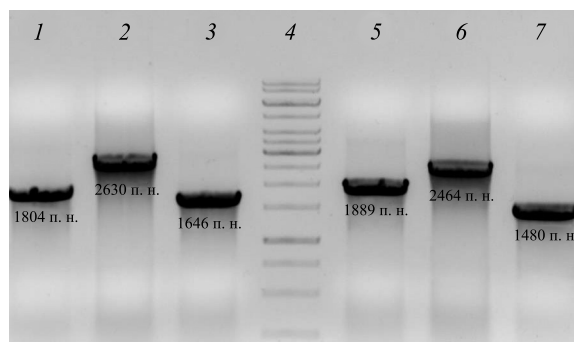


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР:
1 – исходный локус *lysR3*; 2 – *lysR3* со вставкой loxP-neo-loxP; 3 – *lysR3* после делеции;
4 – маркер молекулярной массы ДНК (GeneRuler 1 kb DNA Ladder); 5 – исходный локус *mtfA*;
6 – *mtfA* со вставкой loxP-neo-loxP; 7 – *mtfA* после делеции
Fig. 2. Electrophoregram of PCR products:
1 – original *lysR3* locus; 2 – *lysR3* with insertion loxP-neo-loxP; 3 – *lysR3* after deletion;
4 – molecular weight marker of DNA (GeneRuler 1 kb DNA Ladder); 5 – original *mtfA* locus;
6 – *mtfA* with insertion loxP-neo-loxP; 7 – *mtfA* after deletion

Для определения антимикробной активности штаммы *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA и *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA проверяли на способность ингибировать рост ряда патогенов сельскохозяйственных культур (табл. 3).

Как видно из данных, представленных в табл. 3, антагонистическая активность штаммов *P. brassicacearum* S-1-lysR3 и *P. brassicacearum* S-1-mtfA в отношении бактерий *P. syringae* и *P. carotovorum* возрасла примерно в 1,2 раза в сравнении с антагонистической активностью исходного штамма. У варианта *P. brassicacearum* S-1-mtfA также наблюдалось увеличение способности подавлять рост грибов *F. oxysporum* и *C. lupini* в 1,3–1,4 раза. Штамм *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA проявлял повышенную в 1,4–1,6 раза активность при подавлении роста всех исследованных патогенов в сравнении с исходным штаммом.



Таблица 3

**Результат сравнения
антагонистической активности исследуемых штаммов**

Table 3

**The result of comparing
of antagonistic activity of the studied strains**

Патоген	Зона задержки роста, мм			
	<i>P. brassicacearum</i> S-1-lysR3	<i>P. brassicacearum</i> S-1-mtfA	<i>P. brassicacearum</i> S-1-lysR3-mtfA	<i>P. brassicacearum</i> S-1
<i>P. syringae</i>	27,0 ± 2,6	26,0 ± 1,8	31,0 ± 2,0*	22,3 ± 1,6
<i>P. carotovorum</i>	27,0 ± 2,8	28,3 ± 3,2	32,3 ± 2,5*	23,0 ± 2,0
<i>A. alternata</i>	20,0 ± 2,0	22,0 ± 2,8	26,0 ± 1,4*	19,0 ± 1,4
<i>F. oxysporum</i>	20,0 ± 1,4	24,3 ± 2,8	25,0 ± 1,8*	17,0 ± 1,4
<i>C. lupini</i>	21,0 ± 2,8	25,0 ± 1,0*	30,0 ± 2,0*	19,0 ± 1,0

*Статистически значимые по *t*-критерию Стьюдента различия с контролем при $p < 0,05$.

В ходе первого этапа работы было подтверждено, что наблюдаемые ранее эффекты, связанные с увеличением антимикробной активности у транспозонных мутантов штамма *P. brassicacearum* S-1, являются результатом направленной инактивации генов *lysR3* и *mtfA*. Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что мутация в гене транскрипционного фактора семейства LysR приводит к нарушению осморегуляции или нетипичному ответу на осмотический стресс, что, в свою очередь, положительно влияет на синтез одного или нескольких вторичных метаболитов, определяющих антагонистические свойства штамма *P. brassicacearum* S-1 [26]. Металлопептидаза семейства M90, предположительно, способна влиять на работу фосфотрансферазной системы, что может глобально изменять регуляторные каскады в клетке. Не исключено, что белок MtfA может иметь еще несколько мишеней, помимо репрессора Mlc, и либо непосредственно, либо через каскад реакций регулировать работу белков-синтаз, которые определяют синтез вторичных метаболитов. В литературе есть достаточно примеров специфической деградации регуляторных белков рядом протеаз, в результате чего меняются фенотипические характеристики штаммов [27; 28]. В частности, протеаза Lon у бактерий *P. syringae* pv. *tomato* является негативным регулятором синтеза белков жгутикового аппарата и экзополисахаридов [29]. Поскольку высказаны лишь предположения относительно роли продуктов генов *lysR3* и *mtfA* в механизмах регуляции синтеза антимикробных метаболитов, данный вопрос требует дальнейшего изучения.

Так как нами были внесены направленные мутации в гены *lysR3* и *mtfA*, то, помимо наблюдаемых эффектов увеличенной антагонистической активности, могли измениться и другие свойства, значимые для биотехнологического штамма. Также в результате делеций в генах *lysR3* и *mtfA* нельзя исключать возможности того, что полученные штаммы будут демонстрировать пониженную конкурентоспособность и выживаемость в природном почвенном консорциуме микроорганизмов. Для проверки данных предположений были проведены лабораторные эксперименты по изучению влияния штаммов *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA и *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA на рост и развитие ряда сельскохозяйственных растений.

Было показано, что при обработке семян томата, огурца и петрушки растворами КЖ в течение 30 мин исследуемые штаммы не оказывают фитотоксического действия на семена. Также отмечено, что штамм *P. brassicacearum* S-1-mtfA проявляет ростостимулирующий эффект в отношении семян томата, а штамм *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA – в отношении семян томата и огурца. В частности, наблюдалось увеличение в 1,4 раза длины корней в сравнении с их длиной после воздействия исходного штамма (табл. 4).

Кроме того, оценивали жизне- и конкурентоспособность изучаемых штаммов в модельном почвенном консорциуме микроорганизмов путем посева образцов земли на селективные среды (табл. 5). В качестве контролей на селективные среды с антибиотиками и без них высевали пробы земли, в которые не были внесены штаммы исследуемых бактерий. На контрольных чашках с антибиотиками формирование бактериальных колоний не наблюдалось, тогда как на чашках, содержащих среду без добавления антибиотиков, отмечался рост в виде сплошного газона.

Результат сравнения длин гипокотилей и корней проростков растений после обработки растворами КЖ исследуемых штаммов

Table 4

The result of comparing of length of hypocotyls and roots of plant seedlings after treatment with solutions of the studied strains

Штамм	Длина гипокотилей / длина корня, мм		
	Томат	Огурец	Петрушка
<i>P. brassicacearum</i> S-1-lysR3	24,0 ± 2,3 / 101,0 ± 12,5	35,0 ± 2,3 / 88,0 ± 8,4	9,0 ± 0,8 / 34,0 ± 3,4
<i>P. brassicacearum</i> S-1-mtfA	25,0 ± 2,6 / 121,0 ± 10,2*	33,0 ± 1,9 / 81,0 ± 5,9	8,0 ± 1,0 / 28,0 ± 3,5
<i>P. brassicacearum</i> S-1-lysR3-mtfA	26,0 ± 1,4 / 120,0 ± 11,0*	38,0 ± 1,9 / 122,0 ± 8,0*	9,0 ± 1,0 / 31,0 ± 4,8
<i>P. brassicacearum</i> S-1	24,0 ± 1,4 / 86,0 ± 9,1	36,0 ± 2,6 / 86,0 ± 7,5	9,0 ± 0,8 / 34,0 ± 1,9
Вода	21,0 ± 1,6 / 116,0 ± 9,3	25,0 ± 1,9 / 82,0 ± 8,7	10,0 ± 1,0 / 29,0 ± 3,2

*Статистически значимые по *t*-критерию Стьюдента различия с контролем при $p < 0,05$.

Значения КОЕ исследуемых штаммов в образцах почвы с растениями томата, огурца, петрушки

Table 5

Values of CFU of the studied strains in soil samples with tomato, cucumber, parsley plants

Штамм	Титр, КОЕ/г					
	Томат		Огурец		Петрушка	
	Через 15 сут	Через 31 сут	Через 15 сут	Через 31 сут	Через 15 сут	Через 31 сут
<i>P. brassicacearum</i> S-1-lysR3	$(7,8 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(8,3 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^5$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(9,7 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^4$
<i>P. brassicacearum</i> S-1-mtfA	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(7,4 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(5,5 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(7,2 \pm 0,3) \cdot 10^3$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(5,2 \pm 0,2) \cdot 10^3$
<i>P. brassicacearum</i> S-1-lysR3-mtfA	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^5$	$(7,1 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(5,7 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(8,9 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(9,4 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^4$
<i>P. brassicacearum</i> S-1	$(1,0 \pm 0,3) \cdot 10^5$	$(4,7 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(6,5 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(8,5 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(8,2 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(9,1 \pm 0,1) \cdot 10^3$



В ходе отбора образцов почвы и высевов на селективные среды по истечении 31 сут после внесения исследуемых штаммов в почву к растениям были выявлены штаммы *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA, *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA с титром не ниже $(5,2 \pm 0,2) \cdot 10^3$ КОЕ/г, что свидетельствует о выживаемости исследуемых штаммов в почвенном микробном консорциуме. Также не было зафиксировано фитотоксических эффектов на рост и развитие растений томата, огурца и петрушки в результате полива растений растворами КЖ исследованных штаммов.

Заключение

В результате проведения безмаркерного мутагенеза получены штаммы *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA, *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA, которые несут как одиночные мутации генов *lysR3* и *mtfA*, так и мутации двух генов одновременно. У исследуемых вариантов наблюдалось повышение антагонистической активности по отношению к ряду бактериальных и грибных патогенов сельскохозяйственных культур в 1,3–1,6 раза в сравнении с активностью исходного штамма. Впервые была установлена роль генов *lysR3* и *mtfA* в антимикробной активности штамма S-1.

Показано, что полученные штаммы не оказывают фитотоксического действия на прорастание и развитие семян растений томата сорта Загадка, огурца сорта Крак F1 и петрушки сорта Листовая обычная в лабораторных условиях. Также при обработке семян огурца и томата КЖ штамма *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA отмечалось увеличение длины корней проростков в 1,4 раза в сравнении с их длиной после воздействия исходного штамма.

Установлено, что при внесении штаммов *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA, *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA в почву через 31 сут титр был не ниже $(5,2 \pm 0,2) \cdot 10^3$ КОЕ/г, что свидетельствует об успешной интеграции исследованных штаммов в почвенный консорциум. Полученные данные могут быть использованы при разработке бактериальных препаратов нового поколения для защиты сельскохозяйственных растений от болезней.

Библиографические ссылки

1. Maksimov IV, Abizgil' dina RR, Pusenkova LI. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011;47(4):333–345. DOI: 10.1134/S0003683811040090.
2. Labite H, Butler F, Cummins E. A review and evaluation of plant protection product ranking tools used in agriculture. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 2011;17(2):300–327. DOI: 10.1080/10807039.2011.552392.
3. Stockwell VO, Stack JP. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology*. 2007;97(2):244–249. DOI: 10.1094/PHYTO-97-2-0244.
4. Nelkner J, Torres Tejerizo G, Hassa J, Lin TW, Witte J, Verwaaijen B, et al. Genetic potential of the biocontrol agent *Pseudomonas brassicacearum* (formerly *P. trivialis*) 3Re2-7 unraveled by genome sequencing and mining, comparative genomics and transcriptomics. *Genes*. 2019;10(8):601. DOI: 10.3390/genes10080601.
5. Pylak M, Oszust K, Frac M. Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2019;18(3):597–616. DOI: 10.1007/s11157-019-09500-5.
6. de Souza R, Ambrosini A, Passaglia LMP. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*. 2015;38(4):401–419. DOI: 10.1590/S1415-475738420150053.
7. Валентович ЛН, Муратова АА, Шавела ЮВ, Сиколенко МА, Охремчук АЭ. Секвенирование и анализ геномов бактерий, используемых для защиты растений и животных от болезней. В: Тихонович ИА, редактор. *Материалы 2-й Международной научной конференции PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего»; 5–9 октября 2020 г.; Саратов, Россия = Abstract book of the 2nd International scientific conference «Plants and microbes: the future of biotechnology» PLAMIC2020; 2020 October 5–9; Saratov, Russia*. Саратов: Ассоциация «Аграрное образование и наука»; 2020. с. 264.
8. Коломиец ЭИ, Купцов ВН, Сверчкова НВ, Евсегнеева НВ, Мандрик-Литвинкович МН, Мишин ЛТ и др. Бактерии *Pseudomonas aurantiaca* БИМ В-446 – основа биопрепарата «Экогрин» для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники. В: *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Том 4*. Минск: Беларуская навука; 2012. с. 98–107.
9. Jing X, Cui Q, Li X, Yin J, Ravichandran V, Pan D, et al. Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 to improve its antifungal activity and nitrogen fixation. *Microbial Biotechnology*. 2020;13(1):118–133. DOI: 10.1111/1751-7915.13335.
10. Муратова АА, Мандрик-Литвинкович МН, Носонова ТЛ, Валентович ЛН, Коломиец ЭИ, Титок МА. Молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих антимикробные свойства бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446. *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2016;3:81–84.
11. Муратова АА, Мандрик-Литвинкович МН, Валентович ЛН, Коломиец ЭИ. Молекулярно-генетический анализ генома бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446, стимулирующих рост и развитие сельскохозяйственных растений. В: *Материалы Международной научно-практической конференции «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Становление и перспективы развития органического земледелия в Российской Федерации»; 11–13 сентября 2018 г.; Краснодар, Россия = Proceedings of the International conference «Biological plant protection is the basis of agroecosystems stabilization. Formation and prospects of the development of organic agriculture in the Russian Federation»; 2018 September 11–13; Krasnodar, Russia*. Краснодар: Гранат; 2018. с. 56–59.



12. Bertani G. Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1951; 62(3):293–300. DOI: 10.1128/JB.62.3.293-300.1951.
13. Мейнелл Дж, Мейнелл Э. *Экспериментальная микробиология (Теория и практика)*. Меклер ЛБ, переводчик. Москва: Мир; 1967. 347 с.
14. Metcalf WW, Jiang W, Wanner BL. Use of the *rep* technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K λ origin plasmids at different copy numbers. *Gene*. 1994;138(1–2):1–7. DOI: 10.1016/0378-1119(94)90776-5.
15. Pridmore RD. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene*. 1987;56(2–3):309–312. DOI: 10.1016/0378-1119(87)90149-1.
16. Quandt J, Hynes MF. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene*. 1993;127(1):15–21. DOI: 10.1016/0378-1119(93)90611-6.
17. Luo Xi, Yang Y, Ling W, Zhuang H, Li Q, Shang G. *Pseudomonas putida* KT2440 markerless gene deletion using a combination of λ Red recombineering and Cre/*loxP* site-specific recombination. *FEMS Microbiology Letters*. 2016;363(4):fnw014. DOI: 10.1093/femsle/fnw014.
18. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 3 volumes.
19. Буйницкая СВ, Пилипенко НН, Валентович ЛН. Оптимизация метода рекомбинерии для направленного мутагенеза бактерий *Pseudomonas corrugata* 3'. В: *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Том II*. Минск: Беларуская навука; 2019. с. 45–61.
20. Сэги Й. *Методы почвенной микробиологии*. Куренный ИФ, переводчик; Муромцев ГС, редактор. Москва: Колос; 1983. 296 с.
21. Зенова ГМ, Степанов АЛ, Лихачева АА, Манучарова НА. *Практикум по биологии почв*. Москва: Издательство Московского университета; 2002. 120 с.
22. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990; 215(3):403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
23. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(14):6614–6624. DOI: 10.1093/nar/gkw569.
24. Wargo MJ. Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: lessons from *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79(7):2112–2120. DOI: 10.1128/AEM.03565-12.
25. Göhler A-K, Staab A, Gabor E, Homann K, Klang E, Kosfeld A, et al. Characterization of MtfA, a novel regulatory output signal protein of the glucose-phosphotransferase system in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 2012;194(5):1024–1035. DOI: 10.1128/JB.06387-11.
26. Pan X, Sun C, Tang Mi, You J, Osire T, Zhao Y, et al. LysR-type transcriptional regulator MetR controls prodigiosin production, methionine biosynthesis, cell motility, H₂O₂ tolerance, heat tolerance, and exopolysaccharide synthesis in *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2020;86(4):e02241-19. DOI: 10.1128/AEM.02241-19.
27. Li Y, Yamazaki A, Zou L, Biddle E, Zeng Q, Wang Y, et al. ClpXP protease regulates the type III secretion system of *Dickeya dadantii* 3937 and is essential for the bacterial virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2010;23(7):871–878. DOI: 10.1094/MPMI-23-7-0871.
28. Ades SE, Connolly LE, Alba BM, Gross CA. The *Escherichia coli* σ E-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti- σ factor. *Genes & Development*. 1999;13(18):2449–2461. DOI: 10.1101/gad.13.18.2449.
29. Figaj D, Ambroziak P, Przepiora T, Skorko-Glonek J. The role of proteases in the virulence of plant pathogenic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(3):672. DOI: 10.3390/ijms20030672.

References

1. Maksimov IV, Abizgil'dina RR, Pusenkova LI. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2011;47(4):333–345. DOI: 10.1134/S0003683811040090.
2. Labite H, Butler F, Cummins E. A review and evaluation of plant protection product ranking tools used in agriculture. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*. 2011;17(2):300–327. DOI: 10.1080/10807039.2011.552392.
3. Stockwell VO, Stack JP. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology*. 2007;97(2):244–249. DOI: 10.1094/PHYTO-97-2-0244.
4. Nelkner J, Torres Tejerizo G, Hassa J, Lin TW, Witte J, Verwaaijen B, et al. Genetic potential of the biocontrol agent *Pseudomonas brassicacearum* (formerly *P. trivialis*) 3Re2-7 unraveled by genome sequencing and mining, comparative genomics and transcriptomics. *Genes*. 2019;10(8):601. DOI: 10.3390/genes10080601.
5. Pylak M, Oszust K, Frac M. Review report on the role of bioproducts, biopreparations, biostimulants and microbial inoculants in organic production of fruit. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2019;18(3):597–616. DOI: 10.1007/s11157-019-09500-5.
6. de Souza R, Ambrosini A, Passaglia LMP. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*. 2015;38(4):401–419. DOI: 10.1590/S1415-475738420150053.
7. Valentovich LN, Muratova AA, Shavela YuV, Sikolenko MA, Akhremchuk AE. Sequencing and analysis of genomes of bacteria used to protect plants and animals from diseases. In: Tikhonovich IA, editor. *Abstract book of the 2nd International scientific conference «Plants and microbes: the future of biotechnology» PLAMIC2020; 2020 October 5–9; Saratov, Russia*. Saratov: Association «Agrarian Education and Science»; 2020. p. 264. Russian.
8. Kolomiets EI, Kuptsov VN, Sverchkova NV, Evsegneeva NV, Mandrik-Litvinkovich MN, Mishin LT, et al. [Bacteria *Pseudomonas aurantiaca* BIM B-446 – the basis of biopesticide ecogreen intended for control of vegetable and green crop pathogens in low-scale hydroponics]. In: *Mikrobnye biotekhnologii: fundamental'nye i prikladnye aspekty. Tom 4* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects. Volume 4]. Minsk: Belaruskaja navuka; 2012. p. 98–107. Russian.
9. Jing X, Cui Q, Li X, Yin J, Ravichandran V, Pan D, et al. Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 to improve its antifungal activity and nitrogen fixation. *Microbial Biotechnology*. 2020;13(1):118–133. DOI: 10.1111/1751-7915.13335.



10. Muratova AA, Mandryk-Litvinkovich MN, Nasonova TL, Valentovich LN, Kolomiets EI, Titok MA. Molecular genetic analysis of the determinants associated of antimicrobial properties of bacteria *Pseudomonas brassicacearum* BIM B-446. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series*. 2016;3:81–84. Russian.
11. Muratova AA, Mandrik-Litvinkovich MN, Valentovich LN, Kolomiets EI. Molecular genetic analysis of the genome of bacteria *Pseudomonas brassicacearum* BIM B-446, stimulating the growth and development of agricultural plants. In: *Proceedings of the International conference «Biological plant protection is the basis of agroecosystems stabilization. Formation and prospects of the development of organic agriculture in the Russian Federation»; 2018 September 11–13; Krasnodar, Russia*. Krasnodar: Granat; 2018. p. 56–59. Russian.
12. Bertani G. Studies on lysogenesis I: the mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1951; 62(3):293–300. DOI: 10.1128/JB.62.3.293-300.1951.
13. Meynell GG, Meynell E. *Theory and practice in experimental bacteriology*. New York: Cambridge University Press; 1965. 274 p.
Russian edition: Meynell G, Meynell E. *Экспериментальная микробиология (Теория и практика)*. Moscow: Mir; 1967. 347 p.
14. Metcalf WW, Jiang W, Wanner BL. Use of the *rep* technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K λ origin plasmids at different copy numbers. *Gene*. 1994;138(1–2):1–7. DOI: 10.1016/0378-1119(94)90776-5.
15. Pridmore RD. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene*. 1987;56(2–3):309–312. DOI: 10.1016/0378-1119(87)90149-1.
16. Quandt J, Hynes MF. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene*. 1993;127(1):15–21. DOI: 10.1016/0378-1119(93)90611-6.
17. Luo Xi, Yang Y, Ling W, Zhuang H, Li Q, Shang G. *Pseudomonas putida* KT2440 markerless gene deletion using a combination of λ Red recombineering and Cre/*loxP* site-specific recombination. *FEMS Microbiology Letters*. 2016;363(4):fnw014. DOI: 10.1093/femsle/fnw014.
18. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 3 volumes.
19. Buinitskaya SV, Pilipenok NN, Valentovich LN. Optimization of recombineering for directed mutagenesis of bacteria *Pseudomonas corrugata* 3'. In: *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. Том 11* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects. Volume 11]. Minsk: Belaruskaja navuka; 2019. p. 45–61. Russian.
20. Szegi J. *Talajmikrobiológiai vizsgalati módszerek*. Budapest: Mezogazdasági kiadó; 1979. 310 p.
Russian edition: Szegi J. *Методы почвенной микробиологии*. Kurennyi IF, translator; Muromtsev GS, editor. Moscow: Kolos; 1983. 296 p.
21. Zenova GM, Stepanov AL, Likhacheva AA, Manucharova NA. *Практикум по биологии почвы* [Workshop on soil biology]. Moscow: Izdatel'stvo Moskovskogo universiteta; 2002. 120 p. Russian.
22. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990; 215(3):403–410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
23. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(14):6614–6624. DOI: 10.1093/nar/gkw569.
24. Wargo MJ. Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: lessons from *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013;79(7):2112–2120. DOI: 10.1128/AEM.03565-12.
25. Göhler A-K, Staab A, Gabor E, Homann K, Klang E, Kosfeld A, et al. Characterization of MtfA, a novel regulatory output signal protein of the glucose-phosphotransferase system in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 2012;194(5):1024–1035. DOI: 10.1128/JB.06387-11.
26. Pan X, Sun C, Tang Mi, You J, Osire T, Zhao Y, et al. LysR-type transcriptional regulator MetR controls prodigiosin production, methionine biosynthesis, cell motility, H₂O₂ tolerance, heat tolerance, and exopolysaccharide synthesis in *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2020;86(4):e02241-19. DOI: 10.1128/AEM.02241-19.
27. Li Y, Yamazaki A, Zou L, Biddle E, Zeng Q, Wang Y, et al. ClpXP protease regulates the type III secretion system of *Dickeya dadantii* 3937 and is essential for the bacterial virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2010;23(7):871–878. DOI: 10.1094/MPMI-23-7-0871.
28. Ades SE, Connolly LE, Alba BM, Gross CA. The *Escherichia coli* σ E-dependent extracytoplasmic stress response is controlled by the regulated proteolysis of an anti- σ factor. *Genes & Development*. 1999;13(18):2449–2461. DOI: 10.1101/gad.13.18.2449.
29. Figaj D, Ambroziak P, Przepiora T, Skorko-Glonek J. The role of proteases in the virulence of plant pathogenic bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(3):672. DOI: 10.3390/ijms20030672.

Получена 16.03.2021 / исправлена 06.04.2021 / принята 03.05.2021.
Received 16.03.2021 / revised 06.04.2021 / accepted 03.05.2021.