

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

УДК 579.25+579.253.4+579.841.11

**МУРАТОВА
АННА АЛЕКСЕЕВНА**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИЙ
PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM БИМ В-446 Д
С АНТИМИКРОБНОЙ И ФИТОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.02.03 – микробиология

Минск 2021

Научная работа выполнена в государственном научном учреждении «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси».

Научный руководитель: **Валентович Леонид Николаевич**, кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией «Центр аналитических и генно-инженерных исследований» государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»

Официальные оппоненты: **Максимова Наталья Павловна**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой генетики биологического факультета Белорусского государственного университета

Баранов Олег Юрьевич, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией геномных исследований и биоинформатики государственного научного учреждения «Институт леса Национальной академии наук Беларуси»

Оппонирующая организация: Государственное научное учреждение «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

Защита состоится «21» декабря 2021 г. в 9.00 ч на заседании совета по защите диссертаций Д 01.34.01 при государственном научном учреждении «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси» по адресу: 220141, г. Минск, ул. акад. В. Ф. Купревича, 2, тел.: (+375-17) 357-89-24, факс: (+375-17) 395-47-66, e-mail: microbio@mbio.bas-net.by.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси».

Автореферат разослан «19» ноября 2021 г.

Ученый секретарь совета по защите диссертаций, кандидат биологических наук



Т.В. Семашко

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертации. В настоящее время в соответствии с концепцией развития «зеленой» экономики актуальность приобретают биопрепараты для защиты растений на основе штаммов ризобактерий. Данные препараты являются альтернативой химическим средствам и, в отличие от них, лишены таких существенных недостатков как фитотоксичность, подавление роста полезных почвенных микроорганизмов и накопление в окружающей среде (Backer, 2018). При создании биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных культур от фитопатогенов большое внимание уделяется бактериям рода *Pseudomonas*, продуцирующим широкий спектр биологически активных соединений. Биопрепараты на основе псевдомонад являются безопасными для окружающей среды и используются для контроля инфекционных заболеваний растений, а также для стимуляции роста и развития сельскохозяйственных культур (Anderson, 2018).

Бактерии, входящие в состав таких препаратов, отбирают среди природных изолятов, опираясь на первом этапе на физиолого-биохимические свойства, но дальнейшее решение о применении штамма все чаще делается на основе результатов анализа структуры и функционирования их геномов. Данный современный подход является предпочтительным, поскольку наличие полной информации об организации генетического материала позволяет избежать непредусмотренных последствий при внесении таких микроорганизмов в природную среду обитания, а молекулярно-генетическая характеристика обеспечивает паспортизацию промышленно ценных штаммов бактерий и идентификацию в их геномах регуляторных и структурных генов, связанных с хозяйственно значимыми признаками (Leontidou, 2020).

Все вышеизложенное обуславливает актуальность исследований, направленных на разработку биопестицидов нового поколения для защиты сельскохозяйственных растений на основе бактерий рода *Pseudomonas* с известной генетической организацией. Для изучения биотехнологического потенциала перспективных штаммов используется метод полногеномного секвенирования, который позволяет проводить молекулярно-генетические исследования на принципиально новом уровне. Генетический анализ в масштабах всего генома позволяет выявить все гены (в том числе специфические для любого метаболического пути), продукты которых участвуют в процессе антагонизма и научно обосновать биологическую безопасность штамма для последующего коммерческого использования.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами и темами.

Диссертационная работа выполнена в лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований» государственного научного учреждения «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси» в рамках проекта «Секвенирование и анализ геномов бактерий, используемых для защиты растений и животных от болезней» (задание 3.29, ГПНИ «Биотехнологии», 2016-2020 годы, № госрегистрации 20190721).

Тема исследования соответствует приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы, утвержденным Указом Президента Республики Беларусь от 07.05.2020 № 156: п.2 «Биологические, химические, медицинские и фармацевтические технологии и производства: биотехнологии (геномные и постгеномные, клеточные, микробные, медицинские, промышленные)».

Цель и задачи исследования. Цель исследования – молекулярно-генетический и функциональный анализ генома бактерий *Pseudomonas brassicacearum* S-1 (номер в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов – БИМ В-446 Д) и определение роли вторичных метаболитов в антагонистической и фитостимулирующей активности изучаемых бактерий.

В соответствии с целью решались следующие задачи:

определить нуклеотидную последовательность генома бактерий *P. brassicacearum* S-1 и выявить основные гены, детерминирующие синтез практически значимых соединений;

провести анализ потенциальной стабильности генома бактерий *P. brassicacearum* S-1;

провести транспозонный и направленный мутагенез бактерий *P. brassicacearum* S-1, охарактеризовать полученные мутантные штаммы и отобрать гены-мишени для дальнейшего изучения;

подобрать условия для направленного безмаркерного мутагенеза бактерий *P. brassicacearum* S-1;

путем направленной безмаркерной инактивации генов-мишеней определить их влияние на антимикробную и фитостимулирующую активность штамма *P. brassicacearum* S-1.

Научная новизна. Впервые выполнены с использованием комбинации двух различных технологий (Illumina и Oxford Nanopore) *de novo* секвенирование и сборка генома бактерий *P. brassicacearum* S-1. Установлены особенности его молекулярно-генетической организации и определено, что геном штамма *P. brassicacearum* S-1 имеет показатель средней нуклеотидной идентичности 94,48 % при сравнении с геномом ближайшего родственного штамма

P. brassicacearum subsp. *brassicacearum* NFM421. В хромосоме бактерий *P. brassicacearum* S-1 выявлен уникальный ген *groEL2* (кодирует белок теплового шока), отсутствующий у всех близкородственных псевдомонад. Впервые установлено, что добавление дополнительного *lac* промотора перед геном *groEL2* приводит к повышению синтеза антибиотика широкого спектра действия 2,4-диацетилфлороглюцинола в 46 раз в сравнении с исходным штаммом.

Впервые установлена роль белок-кодирующей последовательности *GFU70_19300* (обозначенной как ген *pvdX*) в синтезе желто-зеленого пигмента пиовердина и антагонистической активности штамма *P. brassicacearum* S-1. Показано, что инактивация гена *pvdX* приводит к неспособности штамма *P. brassicacearum* S-1 синтезировать пиовердин. Определено, что пиовердин является одним из ключевых метаболитов, подавляющих рост фитопатогенного штамма *Fusarium oxysporum* БИМ F-798. Показано, что антагонистическая активность штамма *P. brassicacearum* S-1 в отношении фитопатогенного гриба *Colletotrichum lupini* БИМ F-397 пропадала в результате направленной безмаркерной инактивации *hcn*-кластера, что свидетельствует о роли циановодорода в подавлении роста данного фитопатогена.

Впервые определена роль генов *lysR3* (кодирует транскрипционный регулятор семейства LysR) и *mtfA* (кодирует Zn-зависимую пептидазу) в антимикробной активности штамма *P. brassicacearum* S-1. Показано, что направленная инактивация генов *lysR* и *mtfA* приводит к повышению антагонистической активности штамма *P. brassicacearum* S-1 в 1,2–1,6 раз в сравнении с исходным штаммом.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

- Геном штамма *P. brassicacearum* S-1 представлен кольцевой хромосомой размером 6 577 561 п.н. (5 726 генов, из них 5 568 белок-кодирующих последовательностей, 73 псевдогена, 65 генов тРНК, 4 гена нкРНК и 16 генов рРНК), в составе которой локализованы мобильные генетические элементы (15 инсерционных элементов, 6 интронов, 2 типа повторяющихся межгенных палиндромов и 3 уникальных интактных профага) и 12 генетических локусов, детерминирующих продукцию вторичных метаболитов с предсказанной антагонистической активностью.

- Инактивация генетических детерминант, кодирующих транскрипционный регулятор семейства LysR (*lysR3*), Zeta-токсин (*GFU70_06845*), S-аденозилметионин-зависимую метилтрансферазу (*rlmK*), Zn-зависимую пептидазу (*mtfA*), пептидазу семейства C39 (*GFU70_09550*), трансмембранный сенсорный белок (*bvgS*), транспортер гема (*ccmC*) и белок с неизвестной функцией (*ydgA*) приводила к изменению одного или нескольких свойств штамма *P. brassicacearum* S-1, связанных с антимикробной активностью, подвижностью или способностью к флуоресценции.

- В геноме штамма *P. brassicacearum* S-1 выявлен уникальный ген *groEL2*, отсутствующий у всех известных близкородственных псевдомонад. Присутствие в хромосоме бактерий *P. brassicacearum* S-1 дополнительного *lac* промотора перед геном *groEL2* приводило к увеличению синтеза 2,4-диацетилфлороглюцинола в 46 раз по сравнению с исходным штаммом.

- Безмаркерные мутанты бактерий *P. brassicacearum* S-1 с нарушенными генами *lysR3*, *mtfA*, *lysR3* и *mtfA* характеризовались увеличенной в 1,2–1,6 раз антагонистической активностью по отношению к ряду бактериальных и грибных патогенов, а также стимулировали рост семян томата сорта «Загадка» и семян огурца сорта «Крак F1» (мутант с нарушенными генами *lysR3-mtfA*), увеличивая в 1,4–1,7 раз длину корней проростков по сравнению с исходным штаммом.

Личный вклад соискателя. Соискателем проведен анализ научной литературы по теме диссертации, получены и проанализированы экспериментальные данные, проведена их статистическая обработка, подготовлены публикации по теме диссертации.

Автор выражает благодарность д.б.н., профессору М. А. Титок за консультации и поддержку при выполнении диссертационной работы; к.б.н., доценту М. Н. Мандрик-Литвинкович за рекомендации при постановке экспериментов по антагонистической активности; к.б.н., доценту А. Л. Лагоненко и к.б.н., доценту А. В. Сидоренко за обсуждение результатов диссертации; коллективу лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований» за помощь в проведении полногеномного секвенирования, экспериментов с использованием ВЭЖХ и участие в обсуждении диссертационной работы.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов.

Материалы исследований были представлены в форме устных и стендовых докладов на следующих международных научных конференциях: «Молодежь в науке – 2015» (Минск, 1-4 декабря 2015 г.), 20-я международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 18-22 апреля 2016 г.), X международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 5-9 июня 2017 г.), XII молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 9-10 ноября 2017 г.), 23-я международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 15-19 апреля 2019 г.), XI международная научная конференция «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Минск, 3-6 июня 2019 г.), международная научно-практическая конференция «Биотехнологии микроорганизмов», посвященная профессору Ю. К. Фомичеву (1929-2015) (Минск, 27-29 ноября 2019 г.).

Нуклеотидная последовательность генома бактерий *P. brassicacearum* S-1 депонирована в базу данных GenBank NCBI, код доступа CP045701. Результаты

диссертационной работы используются в учебном процессе на кафедре молекулярной биологии биологического факультета Белорусского государственного университета и внедрены в научно-исследовательский процесс Института микробиологии НАН Беларуси. Разработаны методические указания по использованию набора праймеров для идентификации в геномах бактерий рода *Pseudomonas* генов биосинтеза вторичных метаболитов с антимикробной активностью и метод направленного безмаркерного мутагенеза, оптимизированного для бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 Д.

Опубликование результатов диссертации. По материалам диссертации опубликовано 18 работ, в том числе: статей в рецензируемых научных изданиях – 5, материалах конференций – 4, тезисов докладов – 9. Объем публикаций, соответствующих пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, составляет 3,0 авторских листа.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, описания материалов и методов исследования, трех глав экспериментальной части, заключения, библиографического списка и 5 приложений. Работа изложена на 131 странице машинописного текста, содержит 30 таблиц на 38 страницах, 28 рисунков на 27 страницах.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе «Обзор литературы» дана характеристика бактерий рода *Pseudomonas*, особый акцент сделан на представителях вида *P. brassicacearum*. Приведены данные, касающиеся антагонистической и фитостимулирующей активности. Рассмотрены основные способы повышения антагонистической активности псевдомонад и перспективы их практического применения в качестве основы биопрепаратов для защиты сельскохозяйственных растений от болезней.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основным объектом исследований являлись бактерии *P. brassicacearum* S-1 (номер в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов – БИМ-В-446 Д) - антагонисты фитопатогенов сельскохозяйственных культур (далее по тексту *P. brassicacearum* S-1). Данный штамм является основой биопрепарата «Экогрин», который применяется для защиты от патогенов овощных и зеленных культур в условиях малообъемной гидропоники. В качестве тест-объектов для определения антимикробной активности использовали фитопатогенные бактерии *Pseudomonas syringae* БИМ В-280, *Pectobacterium carotovorum* БИМ В-662,

Xanthomonas campestris БИМ В-634 и грибы *Alternaria alternata* БИМ F-462, *Botrytis cinerea* БИМ F-383, *Fusarium culmorum* БИМ F-459, *Fusarium oxysporum* БИМ F-798, *Colletotrichum lupini* БИМ F-397 из Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов. Для проведения молекулярно-генетических экспериментов использовали штаммы бактерий *Escherichia coli* XL1-Blue (Bullock, 1987), *E. coli* BW19851 (Metcalf, 1994), *E. coli* S17-1 (de Lorenzo, 1994) и плазмиды pUC19 (Yanisch-Perron, 1985), pK18mob (Schäfer, 1994), pJET1.2 (Fermentas), pJQ200KS (Quandt, 1993), pLS1648, pLS3063 (Luo, 2016).

Глубинное культивирование псевдомонад, пектобактерий и ксантомонад осуществляли в полноценной среде LB (Bertani, 1951) или минимальной среде Мейнелла (Мейнелл, 1967) с перемешиванием 200 об/мин при температуре 28–30 °С в течение 24-48 ч. Бактерии *E. coli* выращивали при 37 °С в жидкой LB-среде с перемешиванием 120-160 об/мин в течение 12-14 ч. Грибные патогены выращивали в картофельно-глюкозном бульоне (Wongjiratthiti, 2017) с перемешиванием 120-160 об/мин при температуре 22 °С в течение 24-36 ч. Также штаммы микроорганизмов выращивали на картофельно-глюкозной или LB-среде с содержанием агар-агара 0,5-2,0 %.

Тотальную и плазмидную ДНК выделяли с использованием наборов реактивов «Bacteria DNA Preparation Kit» (PP-214L, Jena Bioscience) и «GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit» (K0502, Thermo Fisher Scientific) соответственно. Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля проводили с помощью наборов «GeneJET Gel Extraction Kit» (K0691, Thermo Fisher Scientific) или «Monarch® DNA Gel Extraction Kit» (T1020S, New England Biolabs). В качестве реперной ДНК использовали «GeneRuler 1 kb DNA Ladder» (SM0311, Thermo Fisher Scientific).

Рестрикционный анализ и лигирование ДНК проводили с помощью ферментов производства «Thermo Fisher Scientific». При постановке реакций придерживались рекомендаций фирмы изготовителя.

При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали реактивы фирм АртБиоТех или Праймтех.

Детекцию пиовердина проводили с помощью хроматографа «HPLC Shimadzu LC-30 Nexera» (Shimadzu). Масс-спектрометрический анализ 2,4-диацетилфлороглюцинола (2,4-ДАФГ) выполняли на приборе «Accurate-Mass Q-TOF LC/MS System 6530» (Agilent Technologies).

Мутантные штаммы получали методом транспозонного или направленного мутагенеза (de Lorenzo, 1990; Xin, 2018).

Оценку антимикробной активности проводили с помощью метода отсроченного антагонизма (Сэги, 1983). Проверку фитостимулирующих свойств осуществляли на семенах томата, огурца и петрушки, учитывая всхожесть семян и длину гипокотыля/корня проростков. Жизнеспособность бактерий оценивали согласно методам, описанным в работе (Зенова, 2002).

Для постановки секвенирующей реакции по Сенгеру использовали ДНК-анализатор Li-Cor 4300 и набор реактивов «DNA Cycle Sequencing Kit» (Jena Bioscience GmbH). Высокопроизводительное определение нуклеотидных последовательностей проводили на приборе MiSeq (Illumina), используя комплект реактивов «MiSeq Reagent Kit v3» (Illumina), а также с помощью нанопорового секвенатора MinION MK 1B (Oxford Nanopore Technologies) с проточной ячейкой R9.4.1. Для приготовления библиотек ДНК использовался набор реактивов «Nextera XT DNA Library Prep Kit» (FC-131-1024, Illumina) для последующего секвенирования по методу Illumina, или набор «Ligation Sequencing Kit» (SQK-LSK109, Oxford Nanopore Technologies) для секвенирования с помощью нанопор. Анализ последовательности генома осуществлялся с помощью биоинформатических программ и веб-сервисов (FastQC, NanoPlot, Trimmomatic, Barapost, Blast, SPAdes, Combinator-FQ, Flye, Bandage, Bowtie2, Tablet, Pilon, Mauve, CGView Server BETA, MiGA, antiSMASH, ISfinder, ResFinder, Restriction-ModificationFinder, PHASTER, VRprofile, CRISPRCasFinder, SnapGene Viewer, MEGA).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием программы Microsoft Excel. Расчеты проводили в трех биологических повторностях с учетом стандартного отклонения. Достоверность различия средних величин устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента. За уровень статистической значимости принимался $p < 0,05$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНОМА БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM S-1*

Для оценки биотехнологического потенциала и стабильности генома бактерий *P. brassicacearum S-1* было проведено полногеномное секвенирование с использованием двух различных технологий: Illumina и Oxford Nanopore [9, 18].

Собранная кольцевая хромосома штамма *P. brassicacearum S-1* имеет размер 6 577 561 п.н. и содержит 60,8 % ГЦ-пар (рисунок 1). Предсказано наличие 5 726 генов, из которых 5 568 аннотированы в виде белок-кодирующих последовательностей, 73 псевдогенов, 65 генов тРНК, 4 генов нкРНК и 16 генов рРНК. Гены, кодирующие рибосомные РНК (5S, 16S, 23S), организованы в пять кластеров. Геном бактерий депонирован в общедоступную базу данных GenBank (код доступа: CP045701).

Подтверждена таксономическая классификация штамма и найдены ближайшие родственники из описанных штаммов: *P. brassicacearum subsp. brassicacearum* NFM421

и *P. kilonensis* DSM 13647, средняя нуклеотидная идентичность (СНИ) с данными штаммами составила соответственно 94,48 % и 93,80 % [4].

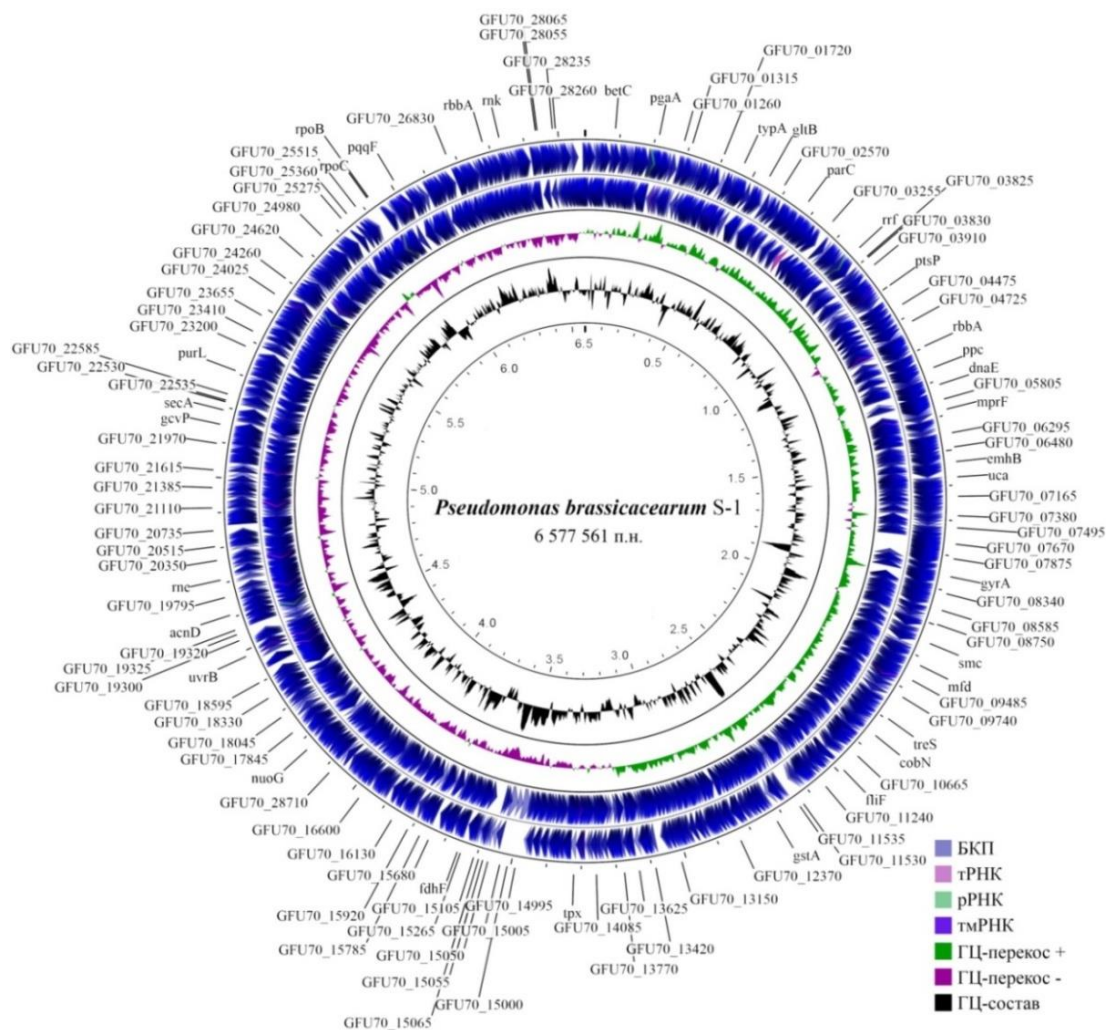


Рисунок 1. – Карта генома бактерий *P. brassicacearum* S-1

В пределах генома штамма *P. brassicacearum* S-1 найдены инсерционные последовательности, относящие к 3 семействам: IS66 (5 копий), IS110 (2 копии), IS1182 (8 копий). Обнаружены 6 интронов группы II, идентифицированы 2 типа множественных повторяющихся экстрагенных палиндромов (тип GTAG и тип GTGG). Выявлены гены, кодирующие ДНК-метилтрансферазы I и II типа, а также гены, кодирующие эндонуклеазы рестрикции I и IV типа. Установлена локализация трех полноразмерных профаговых последовательностей, схожих с *Vibrio_VP882* (NC_009016), *Vibrio_VP58.5* (NC_027981) и *Entero_HK022* (NC_002166) [4].

В геноме штамма *P. brassicacearum* S-1 выявлены гены, продукты которых определяют утилизацию лигнина (*GFU70_24415*, *dyp*, *copA*, *vanB*, *pcaFHGDC*, *pcaQHG*), а также гены, продукты которых способны стимулировать рост растений (*acdS*, *pqqFABCDE*, *trpAB*, *trpCDEG*, *phyC*, *pgpA*, *gph*, *mupP*, *ubiG*). Установлена

локализация генов, кодирующих синтез белков, способствующих колонизации бактериями корней растений (*algDKEGXLJFA*, *alg8*, *alg44*, *sacB*). Выявлены кластеры генов, ответственные за синтез циановодорода и пиовердина: *hcnABC* и *pvdSL*, *pvdIJKDEONMP*, *pvdH*, *pvdA*. Установлено наличие генов системы секреции VI типа, определяющей антагонистическую активность по отношению к другим видам бактерий при непосредственном контакте. Обнаружено 9 локусов, содержащих гены, предположительно ответственные за синтез вторичных антимикробных метаболитов (таблица 1) [4, 7, 8, 9, 12, 16, 18].

Таблица 1. – Гены *P. brassicacearum* S-1, определяющие синтез вторичных метаболитов с предполагаемой антимикробной активностью

№ области	Номер локуса / ген	Размер, п.н.	Функция белка или продукт	Штаммы со схожими генами (код доступа)	Идентичность, %
1	GFU70_01215 (<i>nrps_1</i>)	3 540	биосинтез нерибосомной пептидсинтетазы	<i>P. brassicacearum</i> LBUM300 (CP012680.1) <i>P. brassicacearum</i> L13-6-12 (CP014693.1)	94,72 92,70
2	GFU70_02420 - GFU70_02435 (-)	3 612	биосинтез арилполиена	<i>P. brassicacearum</i> LBUM300 (CP012680.1) <i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725.1)	96,32 96,26
3	GFU70_08005 - GFU70_08015 (<i>naggn</i>)	4 983	биосинтез N- ацетилглутамил- глутамина	<i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725.1) <i>P. brassicacearum</i> NFM421 (CP002585.1)	96,25 96,22
4	GFU70_09760 - GFU70_09765 (-)	3 252	биосинтез β-лактона	<i>P. fluorescens</i> FW300- N2E2 (CP015225.1) <i>P. thivervalensis</i> BS3779 (LT629691.1)	93,00 92,38
5	GFU70_11525 - GFU70_11550 (<i>nrps_2</i>)	35 806	биосинтез нерибосомной пептидсинтетазы	<i>P. brassicacearum</i> LBUM300 (CP012680.1) <i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725.1)	93,98 93,96
6	GFU70_11690 - GFU70_11700 (<i>nrps_3</i>)	5 123	поликетидсинтаза	<i>P. brassicacearum</i> NFM421 (CP002585.1) <i>P. brassicacearum</i> L13-6-12 (CP014693.1)	95,16 95,24
7	GFU70_12325 - GFU70_12330 (-)	1 920	биосинтез тиамида	<i>P. synxantha</i> KENGFT3 (CP014868.1) <i>P. synxantha</i> LBUM223 (CP011117.2)	85,02 84,97
8	GFU70_14995 - GFU70_15065 (<i>nrps_4</i>)	124 185	биосинтез нерибосомной пептидсинтетазы	<i>P. fluorescens</i> FW300- N2C3 (CP012831.1) <i>P. brassicacearum</i> DF41 (CP007410.1)	88,00 85,13
9	GFU70_15265 - GFU70_15270 (<i>nrps_5</i>)	8 451	поликетидсинтаза	<i>P. mediterranea</i> DSM 16733 (LT629790.1) <i>P. mediterranea</i> S58 (CP046874.1)	78,65 78,43

ИЗУЧЕНИЕ ВКЛАДА АНТИМИКРОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В АНТАГОНИСТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ШТАММА *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* S-1

Метод транспозонного мутагенеза позволяет изучить вклад новых, ранее не охарактеризованных генов в антагонистическую активность изучаемого штамма. В свою очередь, направленная инактивация генов, определяющих синтез антимикробных метаболитов с известной функцией, дает возможность сделать заключение об участии данных соединений в подавлении роста определенных типов фитопатогенов.

Для проведения транспозонного мутагенеза штамм-реципиент *P. brassicacearum* S-1 скрещивали со штаммом-донором *E. coli* S17-1, содержащим суицидный вектор pUT::mini-Tn5*xylE*, в результате чего происходила инсерция транспозона mini-Tn5*xylE* в случайные места генома *P. brassicacearum* S-1. Было отобрано 100 мутантов бактерий *P. brassicacearum* S-1, для которых изучены следующие свойства:

- 1) антагонистическая активность по отношению к фитопатогену *P. syringae* БИМ В-280;
- 2) флуоресценция на диагностической среде Кинг Б;
- 3) подвижность в 0,5 % LB-агаре;
- 4) наличие продукта репортерного гена *xylE* (катехол-2,3-диоксигеназы), что свидетельствовало о встраивании mini-Tn5*xylE* непосредственно за промоторной последовательностью инактивированной генетической детерминанты и служило дополнительной характеристикой сайта встраивания [1, 6, 11].

В результате первичного скрининга были отобраны мутанты с повышенной и пониженной антимикробной активностью и подвижностью (соответственно мутант № 31 и № 51), а также обладающие высокой подвижностью, но пониженной антимикробной активностью и отсутствием флуоресценции (мутант № 70). Анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей, примыкающих к транспозону, позволил установить, что mini-Tn5*xylE* у мутанта № 31 встроился в ген, детерминирующий транскрипционный регулятор семейства LysR (*lysR3*), а у мутантов № 51 и 70 инсерция транспозона инактивировала гены, определяющие синтез Zeta-токсина (*GFU70_06845*) и S-аденозилметионин-зависимой метилтрансферазы (*rlmK*) соответственно. Анализ антимикробной активности показал, что относительно штамма дикого типа мутант № 31 в 1,2-2,0 раза эффективней подавлял рост *Pec. carotovorum*, *P. syringae*, *B. cinerea*, *C. lupini*, *F. oxysporum*. Мутанты № 51 и 70 утрачивали антибактериальную, но сохраняли антифунгальную активность по отношению к двум патогенам *B. cinerea* и *C. lupini*. Полученные данные свидетельствовали о влиянии продуктов генов *lysR3*, *GFU70_06845*, *rlmK* на проявление антимикробных свойств, подвижность и

флуоресценцию штамма *P. brassicacearum* S-1 [1, 2, 6, 11].

На следующем этапе работы проведена молекулярно-генетическая характеристика *pvd*-кластера, отвечающего за синтез пиовердина. Показано, что направленная инактивация гена *GFU70_19300* (обозначен как *pvdX*), кодирующего нерибосомную пептидсинтетазу, приводит к неспособности штамма *P. brassicacearum* S-1 синтезировать пиовердин. Путем транспозонного мутагенеза выявлены гены (*mtfA*, *GFU70_09550*, *ydgA*, *bvgS*, *ccmC*), не входящие в состав *pvd*-кластера, но влияющие на синтез пиовердина и антимикробную активность штамма *P. brassicacearum* S-1. Установлено, что пиовердин является одним из ключевых метаболитов, подавляющих рост фитопатогена *F. oxysporum* БИМ F-798 [1, 12, 13, 15, 16].

В результате анализа генома бактерий *P. brassicacearum* S-1 определено наличие двух генов *groEL*, один из которых входит в состав оперона (*groELS*), а второй представлен отдельной транскрипционной единицей (*groEL2*), локализованной в другом участке бактериальной хромосомы. Установлено, что в отличие от всех известных представителей группы *P. fluorescens*, продуцирующих 2,4-ДАФГ, только в хромосоме *P. brassicacearum* S-1 присутствует дополнительный ген *groEL2*, кодирующий белок теплового шока, сходный с таковым бактерий групп *P. mandelii* и *P. jessenii*. Присутствие данной уникальной детерминанты позволило использовать ее в качестве маркера для молекулярного типирования штамма *P. brassicacearum* S-1 с использованием сконструированных штаммоспецифичных праймеров EL2-F/EL2-R, обеспечивающих образование ампликона размером 3 190 п.н. [5, 10].

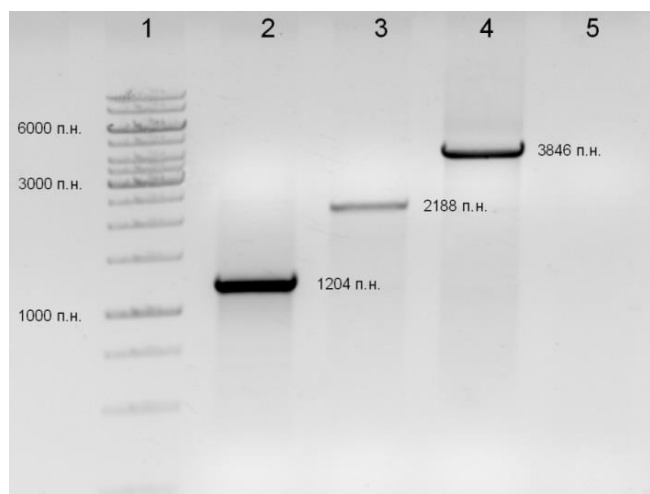
Путем направленного мутагенеза получены мутанты бактерий *P. brassicacearum* S-1, в хромосому которых перед генами *groELS* и *groEL2* встроены *lac* промотор [5]. Установлено, что присутствие дополнительной регуляторной последовательности перед генами *groELS* и *groEL2* приводило к изменению антимикробной активности (таблица 2) и к увеличению синтеза антибиотика 2,4-ДАФГ в 9,7 и 46,0 раз соответственно в сравнении с исходным штаммом, и в 1,2 и 5,9 раз по сравнению с мутантным штаммом *P. brassicacearum phlF::Ω-Tn5* с дефектным геном *phlF* [10].

Таблица 2. – Значения антагонистической активности штаммов *P. brassicacearum* S-1-*groELS*, *P. brassicacearum* S-1-*groEL2*, *P. brassicacearum* S-1

Штамм	Диаметр зоны задержки роста фитопатогенов (мм)			
	<i>X. campestris</i>	<i>P. syringae</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. alternata</i>
<i>P. brassicacearum</i> S-1- <i>groELS</i>	17,5±0,8*	25,0±1,2*	23,0±0,6*	17,2±0,8*
<i>P. brassicacearum</i> S-1- <i>groEL2</i>	24,5±0,6*	27,0±0,7*	18,5±1,0	21,5±0,6
<i>P. brassicacearum</i> S-1	21,0±0,6	20,0±0,8	18,0±0,4	21,0±0,7

Примечание - «*» статистически значимые по t-критерию Стьюдента различия с контролем при $p < 0,05$

Для определения роли циановодорода в антагонистической активности бактерий *P. brassicacearum* S-1 путем безмаркерного мутагенеза был получен штамм *P. brassicacearum* S-1-hcn с нокаутом *hcn*-кластера, определяющего синтез циановодорода (рисунок 2) [8, 14].



- 1 – маркер молекулярной массы ДНК;
- 2 – *hcnABC* после делеции;
- 3 – *hcnABC* со вставкой *loxP-neo-loxP*;
- 4 – исходный локус *hcnABC*;
- 5 – отрицательный контроль

Рисунок 2. – Электрофореграмма продуктов амплификации генов *hcn*-кластера

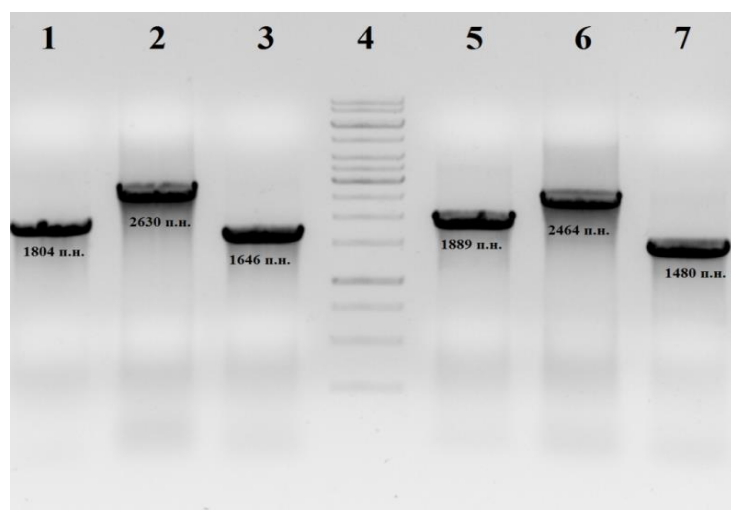
Анализ мутантов, содержащих делецию *hcn*-кластера, позволил установить, что они на уровне исходного штамма сохраняют антимикробную активность по отношению к патогенам *P. syringae*, *Pec. carotovorum*, *A. alternata* и *F. oxysporum*, но теряют способность подавлять рост патогена *C. lupini* [8]. Таким образом, впервые установлено, что циановодород является одним из ключевых действующих веществ в отношении фитопатогена *C. lupini* БИМ F-397.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОЛИ ГЕНОВ *LYSR* И *MTFA* В АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ И ФИТОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ШТАММА *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* S-1

Ранее в результате транспозонного мутагенеза были отобраны мутанты бактерий *P. brassicacearum* S-1 с нарушенными генами *lysR3* и *mtfA*, обладающие повышенной антимикробной активностью [1]. Используемый методический подход не позволял однозначно интерпретировать фенотипический эффект мутаций, поскольку в результате редкого события множественной транспозиции *mini-Tn5xylE* мог встроиться одновременно в несколько локусов генома или обеспечить полярный эффект, приводящий к изменению экспрессии генов, непосредственно расположенных за местом его локализации. В связи с этим для установления роли данных белок-кодирующих последовательностей в проявлении антимикробных свойств штамма *P. brassicacearum* S-1 был использован метод направленной безмаркерной инактивации генов.

В результате проведенного мутагенеза были отобраны мутанты бактерий *P. brassicacearum* S-1 с нарушением отдельных генов *lysR3* и *mtfA* и штамм,

содержащий одновременно мутации по двум генам. При этом инактивированные гены не содержали в своем составе дополнительных генетических детерминант (рисунок 3) [3, 17].



- 1 – исходный локус *lysR3*;
 2 – *lysR3* со вставкой *loxP-neo-loxP*;
 3 – *lysR3* после инактивации;
 4 – маркер молекулярной массы ДНК;
 5 – исходный локус *mtfA*;
 6 – *mtfA* со вставкой *loxP-neo-loxP*;
 7 – *mtfA* после инактивации

Рисунок 3. – Электрофореграмма продуктов амплификации генов *lysR3* и *mtfA*

Показано, что у полученных мутантных вариантов (*P. brassicacearum* S-1-*lysR*, *P. brassicacearum* S-1-*mtfA* и *P. brassicacearum* S-1-*lysR-mtfA*) в 1,2-1,6 раз повышалась антагонистическая активность в отношении ряда фитопатогенов (таблица 3) [3, 17].

Таблица 3. – Значения антагонистической активности штаммов *P. brassicacearum* S-1-*lysR*, *P. brassicacearum* S-1-*mtfA*, *P. brassicacearum* S-1-*lysR-mtfA*, *P. brassicacearum* S-1

Патоген	Диаметр зоны задержки роста фитопатогенов (мм)			
	<i>P. brassicacearum</i> S-1- <i>lysR3</i>	<i>P. brassicacearum</i> S-1- <i>mtfA</i>	<i>P. brassicacearum</i> S-1- <i>lysR3-mtfA</i>	<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>Pec. 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

Примечание – «*» статистически значимые по t-критерию Стьюдента различия с контролем при $p < 0,05$

На основе анализа литературных данных можно предположить, что мутация в гене, кодирующим синтез транскрипционного фактора семейства LysR, приводила к нарушению осморегуляции или нетипичному ответу на осмотический стресс, что в свою очередь положительно влияло на синтез одного или нескольких вторичных метаболитов, определяющих антагонистическую активность штамма *P. brassicacearum* S-1. Металлопептидаза MtfA способна влиять на работу фосфотрансферазной системы, что может изменять экспрессию ряда генов, в том числе, определяющих синтез вторичных метаболитов [3].

Помимо наблюдаемых эффектов увеличенной антагонистической активности, могли измениться и другие свойства, значимые для биотехнологического штамма, такие как влияние на рост растений или способность выживать в микробном консорциуме. При проверке не было зафиксировано фитотоксических эффектов исследованных штаммов *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA и *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA на растения томата, огурца и петрушки. Напротив, при обработке семян томата и огурца раствором культуральной жидкости штамма *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA длина корней проростков увеличивалась в 1,4-1,7 раз в сравнении с исходным штаммом.

Для определения жизнеспособности мутантных штаммов проводили высеv в почвогрунт проростков томата, огурца и петрушки, которые предварительно проращивались в воде, а затем обрабатывались культуральной жидкостью штаммов *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA, *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA, *P. brassicacearum* S-1 в количестве $(3,2-4,4) \times 10^9$ КОЕ/мл. Через 31 сутки исходные и мутантные бактерии выявлялись в схожих количествах (не ниже $(5,2 \pm 0,2) \times 10^3$ КОЕ/г), что свидетельствовало об отсутствии влияния исследованных нарушений на выживаемость мутантных бактерий в микробном почвенном сообществе [1, 3, 17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Проведено секвенирование нуклеотидной последовательности тотальной ДНК штамма *P. brassicacearum* S-1, в результате чего осуществлена *de novo* сборка генома, который представлен кольцевой хромосомой размером 6 577 561 п.н. Геном бактерий депонирован в общедоступную базу данных GenBank (код доступа: CP045701). Подтверждено систематическое положение штамма S-1 и выявлены ближайшие родственные штаммы *P. brassicacearum* subsp. *brassicacearum* NFM421 (NC_015379, СНИ 94,48 %) и *P. kilonensis* DSM 13647 (GCA_001269885, СНИ 93,80 %). В пределах генома штамма *P. brassicacearum* S-1 найдены инсерционные последовательности, относящиеся к 3 семействам (IS66, IS110, IS1182), интроны группы II, а также 2 типа повторяющихся межгенных палиндромов (2 246 повторов). Идентифицированы гены, кодирующие ДНК-метилтрансферазы I и II типа, а также эндонуклеазы рестрикции I и IV типа. Определена локализация трех профагов (схожих с последовательностями фагов Vibrio_VP882 (NC_009016), Vibrio_VP58.5 (NC_027981) и Entero_HK022 (NC_002166)). Показано наличие генов системы секреции VI типа. Выявлены гены, определяющие синтез практически значимых соединений, в том числе вторичных метаболитов с антагонистической активностью [4, 7, 8, 9, 12, 16, 18].

2. Получены и охарактеризованы 100 транспозонных мутантов бактерий *P. brassicacearum* S-1 с измененной антимикробной активностью, подвижностью и способностью к флуоресценции. Определены гены, кодирующие транскрипционный регулятор семейства LysR, S-аденозилметионин-зависимую метилтрансферазу и Zeta-токсин, инактивация которых влияла на проявление антимикробной активности бактерий *P. brassicacearum* S-1 [1, 2, 6, 11].

3. Для определения роли пиовердина в антимикробной активности бактерий *P. brassicacearum* S-1 проведена направленная инактивация гена нерибосомной пептидсинтетазы *pvdX* (номер локуса GFU_19300), что приводило к отсутствию синтеза желто-зеленого пигмента пиовердина. Путем транспозонного мутагенеза выявлен ряд генов (*mtfA*, *GFU70_09550*, *ydgA*, *bvgS*, *ccmC*), которые не входили в состав основного *pvd*-кластера, но влияли на синтез пиовердина и антимикробную активность штамма *P. brassicacearum* S-1. Определено, что пиовердин является одним из ключевых метаболитов, обеспечивающих подавление фитопатогена *F. oxysporum* БИМ F-798 [1, 12, 13, 15, 16].

4. Показано, что в геноме штамма *P. brassicacearum* S-1, помимо генов *groELS*, присутствует уникальный ген *groEL2*, который отсутствует у всех известных близкородственных псевдомонад. Сконструированы штаммоспецифичные праймеры EL2-F/EL2-R, позволяющие осуществлять молекулярное типирование бактерий *P. brassicacearum* S-1. Получены штаммы *P. brassicacearum* S-1-*groELS* и

P. brassicacearum S-1-groEL2 с добавленным *lac* промотором перед генами *groELS* или *groEL2*. Установлено, что присутствие дополнительной регуляторной последовательности приводило к синтезу антибиотика 2,4-ДАФГ в концентрации 9,7 мкг/мл штаммом *P. brassicacearum* S-1-groELS и 46,0 мкг/мл штаммом *P. brassicacearum* S-1-groEL2. При этом исходный штамм продуцировал данный метаболит в количестве до 1 мкг/мл. В сравнении с исходным штаммом у бактерий *P. brassicacearum* S-1-groELS и *P. brassicacearum* S-1-groEL2 изменялась антагонистическая активность к ряду фитопатогенов [5, 10].

5. Путем безмаркерного мутагенеза получен штамм *P. brassicacearum* S-1-hcn, содержащий делецию *hcn*-кластера, отвечающего за синтез циановодорода. Мутант *P. brassicacearum* S-1-hcn утрачивал антагонистическую активность в отношении патогена *C. lupini* БИМ F-397, что свидетельствовало о ключевой роли циановодорода в подавлении роста данного фитопатогена. Проведена направленная безмаркерная инактивация генов *lysR3* и *mtfA* бактерий *P. brassicacearum* S-1. Показано, что у штаммов *P. brassicacearum* S-1-lysR3, *P. brassicacearum* S-1-mtfA и *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA увеличивалась антагонистическая активность в 1,2–1,6 раза в отношении ряда фитопатогенов. Установлено, что при обработке семян огурца и томата культуральной жидкостью бактерий *P. brassicacearum* S-1-lysR3-mtfA у проростков увеличивалась длина корней в 1,4–1,7 раз в сравнении с таковыми, обработанными культуральной жидкостью исходного штамма. Таким образом, впервые была установлена роль генов *lysR3* и *mtfA* в антимикробной и фитостимулирующей активности штамма *P. brassicacearum* S-1. Показано, что выживаемость полученных мутантных штаммов в модельном микробном консорциуме сохранялась на уровне исходного штамма [1, 3, 8, 14, 17].

Рекомендации по практическому использованию результатов.

К практическому использованию рекомендуется:

- разработанные штаммоспецифичные праймеры EL2-F/EL2-R к уникальному генетическому локусу *groEL2-GFU70_13040* для молекулярного типирования штамма *P. brassicacearum* БИМ В-446 Д (акт об использовании последовательностей праймеров EL2-F/EL2-R от 07 сентября 2020 г.);

- полученный штамм *P. brassicacearum* S-1-groEL2 с увеличенным синтезом 2,4-диацетилфлороглюцинола, который может быть использован в качестве продуцента 2,4-ДАФГ для биотехнологического применения;

- модифицированный метод безмаркерного мутагенеза бактерий *P. brassicacearum* для получения множественных нокаутов генов без внесения дополнительных генетических детерминант позволяет изучать механизмы синтеза различных хозяйственно значимых соединений (Метод направленного безмаркерного мутагенеза, оптимизированного для бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 Д от 01 октября 2019 г.);

- разработанный набор праймеров для идентификации в геномах бактерий генов биосинтеза вторичных метаболитов с антимикробной активностью (Методические указания по использованию набора праймеров для идентификации в геномах бактерий рода *Pseudomonas* генов биосинтеза вторичных метаболитов с антимикробной активностью от 12 мая 2021 г.).

Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе на кафедре молекулярной биологии Белорусского государственного университета (акт о практическом использовании результатов исследования в учебном процессе от 04 сентября 2017 г.).

Список публикаций соискателя ученой степени

Статьи в рецензируемых изданиях:

1. Молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих антимикробные свойства бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ Б-446 / **А. А. Муратова**, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Т. Л. Носонова, Л. Н. Валентович, Э. И. Коломиец, М. А. Титок // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2016. – № 3. – С. 81–84.

2. Молекулярно-генетическая диагностика возбудителей заболеваний огурца и томата, выращиваемых в условиях малообъемной гидропоники / В. Н. Купцов, Т. А. Пилипчук, А. В. Бережная, Л. Ю. Чеботарёв, **А. А. Муратова**, Л. Н. Валентович, А. В. Сидоренко, М. А. Титок, Э. И. Коломиец // Микробные биотехнологии : фундам. и прикл. аспекты : сб. науч. тр. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. – Минск, 2017. – Т. 9. – С. 202–210.

3. **Муратова, А. А.** Увеличение антимикробной активности бактерий *Pseudomonas brassicacearum* S-1 в результате инактивации генов *lysR3* и *mtfA* / **А. А. Муратова**, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Л. Н. Валентович // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. – 2021. – № 2. – С. 52–63.

4. **Muratova, A. A.** Genome analysis of *Pseudomonas brassicacearum* S-1 – an antagonist of crop pathogens / **A. A. Muratova**, A. E. Akhremchuk, L. N. Valentovich // Biotechnol. Acta. – 2021. – Vol. 14, № 2. – P. 47–58.

5. Влияние генов *groEL*, кодирующих синтез белков-шаперонов, на продукцию 2,4-диацетилфлороглюцинола у бактерий *Pseudomonas brassicacearum* S-1 / **А. А. Муратова**, А. А. Букляревич, О. В. Евдокимова, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Л. Н. Валентович, М. А. Титок, Э. И. Коломиец // Вестн. Фонда фундам. исслед. – 2021. – № 3. – С. 195–206.

Материалы конференций:

6. Молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих антимикробные свойства бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 /

А. А. Муратова, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Т. Л. Носонова, Л. Н. Валентович, Э. И. Коломиец, М. А. Титок // Молодежь в науке – 2015 : материалы XII междунар. науч. конф., Минск, 1–4 дек. 2015 г. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. – Минск, 2015. – С. 87–88.

7. Молекулярно-генетический анализ генома бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446, стимулирующих рост и развитие сельскохозяйственных растений / **А. А. Муратова**, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Л. Н. Валентович, Э. И. Коломиец // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем : материалы междунар. науч.-практ. конф. «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. Становление и перспективы развития органического земледелия в Российской Федерации», 11–13 сент. 2018 г. / Рос. акад. наук [и др.]. – Краснодар, 2018. – Вып. 10. – С. 56–59.

8. **Муратова, А. А.** Анализ влияния *hcn*-кластера генов на антибактериальную и антифунгальную активность бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 / **А. А. Муратова**, Л. Н. Валентович // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : материалы XI междунар. науч. конф., Минск, 3–6 июня 2019 г. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. – Минск, 2019. – С. 103–104.

9. **Муратова, А. А.** Определение биотехнологического потенциала бактерий *Pseudomonas* sp. S-1 на основе анализа последовательности генома / **А. А. Муратова**, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Л. Н. Валентович // Биотехнологии микроорганизмов : материалы междунар. науч. конф., Минск, 27–29 ноября 2019 г. / Белорус. гос. ун-т, Биол. фак. ; редкол.: В. Е. Мямин (отв. ред.) [и др.]. – Минск, 2019. – С. 280–281.

Тезисы докладов:

10. Молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих синтез 2,4-диацетилфлороглюцинола у бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 / **А. А. Муратова**, М. Н. Мандрик-Литвинкович, М. А. Титок, Т. Л. Носонова, О. В. Евдокимова, Л. Н. Валентович, Э. И. Коломиец // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : тез. докл. IX междунар. науч. конф., посвящ. 50-летию создания Ин-та микробиологии НАН Беларуси, Минск, 7–11 сент. 2015 г. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. – Минск, 2015. – С. 90–92.

11. Характеристика транспозонных мутантов бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 / **А. А. Муратова**, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Т. Л. Носонова, Л. Н. Валентович, Э. И. Коломиец // Биология – наука XXI века : 20-я междунар. Пуш. шк.-конф. молодых учен., Пушкино, 18–22 апр. 2016 г. : сб. тез. / Пуш. науч. центр Рос. акад. наук, Межфак. науч.-образоват. центр Моск. гос. ун-та. – Пушкино, 2016. – С. 33–34.

12. Физиолого-биохимические и молекулярно-генетические особенности бактерий *P. brassicacearum* S-1 / М. Н. Мандрик-Литвинкович, **А. А. Муратова**, Т. Л. Носонова, Л. Н. Валентович, М. А. Титок, Э. И. Коломиец // Биология – наука XXI века : 20-я междунар. Пуш. шк.-конф. молодых учен., Пущино, 18–22 апр. 2016 г. : сб. тез. / Пуш. науч. центр Рос. акад. наук, Межфак. науч.-образоват. центр Моск. гос. ун-та. – Пущино, 2016. – С. 29–30.

13. Молекулярно-генетический анализ детерминант, определяющих синтез пигментов у бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 / **А. А. Муратова**, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Т. Л. Носонова, М. А. Титок, Л. Н. Валентович, Э. И. Коломиец // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : тез. докл. X междунар. науч. конф., Минск, 5–9 июня 2017 г. / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. – Минск, 2017. – С. 66–68.

14. **Муратова А. А.** Оптимизация метода электрической трансформации бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 / **А. А. Муратова**, Л. Н. Валентович // Биологическая осень 2017 : тез. докл. междунар. науч. конф. молодых учен., Минск, 9 нояб. 2017 г. / Белорус. гос. ун-т, Биол. фак., Совет молодых учен. ; редкол.: В. В. Лысак (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2017. – С. 32–34.

15. Молекулярно-генетическая характеристика детерминант, участвующих в регуляции биосинтеза антимикробных метаболитов бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 / **А. А. Муратова**, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Л. Н. Валентович, Э. И. Коломиец / Актуальные аспекты современной микробиологии : XII молодеж. шк.-конф. с междунар. участием, Москва, 9–10 нояб. 2017 г. : тезисы / Федер. агентство науч. орг. [и др.]. – Москва, 2017. – С. 74–76.

16. **Муратова, А. А.** Анализ регуляции синтеза пиовердина у бактерий *Pseudomonas brassicacearum* БИМ В-446 / **А. А. Муратова**, М. Н. Мандрик-Литвинкович, Л. Н. Валентович // Биология – наука XXI века : 23-я междунар. Пуш. шк.-конф. молодых учен., Пущино, 15–19 апр. 2019 г. : сб. тез. / Ин-т теорет. и эксперим. биофизики Рос. акад. наук [и др.]. – Пущино, 2019. – С. 232.

17. **Muratova A. A.** Inactivation of genes *lysR* and *mtfA* increases antagonistic activity of bacteria *Pseudomonas brassicacearum* S-1 / **A. A. Muratova**, L. N. Valentovich // Вторая международная научная конференция PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», Саратов, 5–9 окт. 2020 г. : сб. тез. / Саратов. гос. аграр. ун-т [и др.] ; отв. ред. И. А. Тихонович. – [Саратов], 2020. – С. 177.

18. Секвенирование и анализ геномов бактерий, используемых для защиты растений и животных от болезней / Л. Н. Валентович, **А. А. Муратова**, Ю. В. Шавела, М. А. Сиколенко, А. Э. Охремчук // Вторая международная научная конференция PLAMIC2020 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего», Саратов, 5–9 окт. 2020 г. : сб. тез. / Саратов. гос. аграр. ун-т [и др.] ; отв. ред. И. А. Тихонович. – [Саратов], 2020. – С. 264.

Муратава Ганна Аляксееўна

**МАЛЕКУЛЯРНА-ГЕНЕТЫЧНЫ АНАЛІЗ БАКТЭРЫЙ
PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM БІМ В-446 Д
З АНТЫМІКРОБНАЙ І ФІТАСТЫМУЛЮЮЧАЙ АКТЫЎНАСЦЮ**

Ключавыя словы: *Pseudomonas brassicacearum*, геном, секвенаванне, другасныя метабаліты, біякантроль, мутагенез, антымیکробная актыўнасць.

Мэта даследавання: малекулярна-генетычны і функцыянальны аналіз геному бактэрыі *Pseudomonas brassicacearum* S-1 (нумар у Беларускай калекцыі непатагенных мікраарганізмаў – БІМ В-446 Д) і вызначэнне ролі другасных метабалітаў у антаганістычнай і фітастымулюючай актыўнасці бактэрыі, якія вывучаюцца.

Метады даследавання: біяінфарматычныя, мікрабіялагічныя, фізіёлага-біяхімічныя, генетычныя, малекулярна-біялагічныя.

Выкарыстаная апаратура: секвенатары MinION (Oxford Nanopore Technologies), MiSeq (Illumina), 4300 DNA Analyzer (Li-COR), хроматограф высокага ціску HPLC 1260 Infinity (Agilent Technologies), ДНК-ампліфікатар SureCycler 8800 (Agilent Technologies) і інш.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Упершыню была вызначана паслядоўнасць геному бактэрыі *P. brassicacearum* S-1 і выяўлены асаблівасці яго малекулярна-генетычнай арганізацыі. Вызначана размяшчэнне ў геноме ўнікальнага гена *groEL2*, атрыманы мутантны штамп *P. brassicacearum* S-1-*groEL2* – звышпрадукцэнт 2,4-дыацетылфлораглюцынолу, у якога канцэнтрацыя дадзенага антыбіётыку павялічана ў 46 разоў у параўнанні з зыходным штамам. Даследаваны кластары генаў, якія вызначаюць сінтэз піявердыну і цыянавадароду. Упершыню ў бактэрыях *P. brassicacearum* ажыццёўлена бязмаркерная інактывацыя генаў, якія ўплываюць на практычна важныя ўласцівасці. Упершыню вызначана роля генаў *lysR3* і *mtfA* у антымیکробнай і фітастымулюючай актыўнасці штаму *P. brassicacearum* S-1.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: набор праймераў для ідэнтыфікацыі генаў біясінтэзу другасных метабалітаў з антымیکробнай актыўнасцю; мадыфікаваны метады бязмаркера мутагенезу бактэрыі *P. brassicacearum*; штамаспецыфічныя праймеры для малекулярнага тыпавання бактэрыі *P. brassicacearum* БІМ В-446 Д.

Вобласць выкарыстання: мікрабіялогія, біятэхналогія, раслінаводства.

Муратова Анна Алексеевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БАКТЕРИЙ
PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM БИМ В-446 Д
С АНТИМИКРОБНОЙ И ФИТОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ**

Ключевые слова: *Pseudomonas brassicacearum*, геном, секвенирование, вторичные метаболиты, биоконтроль, мутагенез, антимикробная активность.

Цель исследования: молекулярно-генетический и функциональный анализ генома бактерий *Pseudomonas brassicacearum* S-1 (номер в Белорусской коллекции непатогенных микроорганизмов – БИМ В-446 Д) и определение роли вторичных метаболитов в антагонистической и фитостимулирующей активности изучаемых бактерий.

Методы исследования: биоинформатические, микробиологические, физиолого-биохимические, генетические, молекулярно-биологические.

Использованная аппаратура: секвенаторы MinION (Oxford Nanopore Technologies), MiSeq (Illumina) и 4300 DNA Analyzer (Li-COR), хроматограф HPLC 1260 Infinity (Agilent Technologies), ДНК-амплификатор SureCycler 8800 (Agilent Technologies) и др.

Полученные результаты и их новизна. Определена последовательность генома бактерий *P. brassicacearum* S-1 и установлены особенности его молекулярно-генетической организации. Установлено наличие в геноме уникального гена *groEL2*, получен мутантный штамм *P. brassicacearum* S-1-*groEL2* – сверхпродуцент 2,4-диацетилфлороглюцинола, у которого концентрация данного антибиотика увеличена в 46 раз по сравнению с исходным штаммом. Исследованы кластеры генов, отвечающих за синтез пиовердина и циановодорода. Впервые у бактерий *P. brassicacearum* осуществлена безмаркерная инактивация генов, влияющих на практически важные свойства. Впервые определена роль генов *lysR3* и *mtfA* в антимикробной и фитостимулирующей активности штамма *P. brassicacearum* S-1.

Рекомендации по использованию: набор праймеров для идентификации генов биосинтеза вторичных метаболитов с антимикробной активностью; модифицированный метод безмаркерного мутагенеза бактерий *P. brassicacearum*; штаммоспецифичные праймеры для молекулярного типирования бактерий *P. brassicacearum* БИМ В-446 Д.

Область применения: микробиология, биотехнология, растениеводство.

SUMMARY

Muratova Anna

**MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF BACTERIA
PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM BIM B-446 D
WITH ANTIMICROBIAL AND PHYTOSTIMULATORY ACTIVITY**

Key words: *Pseudomonas brassicacearum*, genome, sequencing, secondary metabolites, biocontrol, mutagenesis, antimicrobial activity.

Aim of study: molecular genetic and functional analysis of the genome of *Pseudomonas brassicacearum* S-1 (number in the Belarusian Collection of Non-pathogenic Microorganisms – BIM B-446 D) and determination of the role of the secondary metabolites in the antagonistic and phytostimulatory activity of the studied bacteria.

Research methods: bioinformatic, microbiological, physiological and biochemical, genetic, molecular biological.

Applied equipment: sequencers MinION (Oxford Nanopore Technologies), MiSeq sequencer (Illumina), 4300 DNA Analyzer (Li-COR), HPLC 1260 Infinity high-pressure chromatograph (Agilent Technologies), DNA amplifier SureCycler 8800 (Agilent Technologies), etc.

Obtained results and their novelty. For the first time, the sequence of the *P. brassicacearum* S-1 genome was determined, and the characteristics of its molecular-genetic organization were determined. It was determined that a unique *groEL2* gene is located in the genome of *P. brassicacearum* S-1. A mutant strain *P. brassicacearum* S-1-*groEL2* was constructed; it is an overproducer of 2,4-diacetylphloroglucinol, and the concentration of this antibiotic produced by the strain is 46 times higher compared to the original strain. The clusters of genes which determine the synthesis of pyoverdine and hydrogen cyanide were investigated. For the first time, the marker-free inactivation of genes responsible for practically important properties was carried out in *P. brassicacearum*. For the first time, the role of the *lysR3* and *mtfA* genes in the antimicrobial and phytostimulatory activity of the *P. brassicacearum* S-1 strain was determined.

Recommendation for use: a set of primers for identification of genes responsible for the biosynthesis of secondary metabolites with antimicrobial activity; a modified method of marker-free mutagenesis in *P. brassicacearum*; strain-specific primers for molecular typing of the bacteria *P. brassicacearum* BIM B-446 D.

Application area: microbiology, biotechnology, plant cultivation/agriculture.

Подписано в печать 16.11.2021 Формат 60x84_{1/16} Бумага офсетная
Печать цифровая Усл.печ.л. 1,3 Уч.изд.л. 1,4 Тираж 60 экз. Заказ 4227
ИООО «Право и экономика» 220072 Минск Сурганова 1, корп. 2 Тел. 8 029 684 18 66
Отпечатано на издательской системе Gestetner в ИООО «Право и экономика»
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий, выданное
Министерством информации Республики Беларусь 17 февраля 2014 г.
в качестве издателя печатных изданий за № 1/185