ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО ПРОДУКЦИЮ 2,4-ДИАЦЕТИЛФЛОРОГЛЮЦИНОЛА, В ГЕНОМАХ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

А.М. Дмитриева[1], Н.Л. Белькова[2]

[1]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия, nastya.wss@mail.ru

[2]Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Лимнологический институт Сибирского отделения Российской академии наук СО РАН, Иркутск, Россия, *nlbelkova@gmail.com*

Аннотация. Микроорганизмы в процессе своей жизнедеятельности вырабатывают различные вещества, обладающие антибактериальной, антигрибковой или антивирусной активностью. Проведено изучение структуры генов *phl*, отвечающих за продукцию 2,4-диацетилфлороглюцинола (2,4-DAPG), в геномах бактерий рода *Pseudomonas*. 2,4-DAPG является высокоэффективным средством биоконтроля различных патогенов.

***Ключевые слова**: антибиотики, Pseudomonas, эндемичные губки, озеро Байкал*

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-268-272

Микроорганизмы в процессе своей жизнедеятельности вырабатывают различные химические соединения, среди которых особую роль играют вещества, обладающие антибактериальной, антигрибковой или антивирусной активностью [Netzker et al., 2018]. В сложном микробном консорциуме такие микроорганизмы называются антагонистами, так как способны замедлять или полностью подавлять рост других организмов. Наиболее полно изучены антагонистические отношения между почвенными бактериями, где показано, что увеличение плотности заселения почвы бактериями ведет к активной конкурентной борьбе за существование и тем выше продукция активных бактериальных метаболитов [Lanteigne et al., 2012]. Механизмы действия антибактериальных веществ различны, заключаются в подавлении определенных процессов в обмене веществ бактериальной клетки (разрушение клеточной оболочки, нарушение синтетических процессов, дыхания), размножения и др.

Среди флуоресцирующих представителей рода *Pseudomonas* наиболее изучены продуценты 2,4-диацетилфлороглюцинола (2,4-diacetylphloroglucinol, 2,4-DAPG) [Carroll et al., 1995], который является высокоэффективным средством биоконтроля различных фитопатогенов почвенного происхождения [Yang, Cao, 2012]. Продукция данного соединения отдельными представителями микробного сообщества обусловливает способность почв подавлять патогенные для растений организмы. Примером может служить защита томатов от бактериального рака, вызванного *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis rhizospheric*. В ассоциации с растениями *Pseudomonas* sp. LBUM300 способен значительно уменьшить развитие болезни и популяцию патогена, продуцируя как 2,4-DAPG, так и HCN [Lanteigne et al., 2012]. Другим важным свойством этого вторичного метаболита псевдомонад является усиление эффекта фитостимуляции, проявляемого ризобактериями, стимулирующими рост растений (PGPR). Это было доказано на примере совместной инокуляции пшеницы со штаммами *Azospirillum brasilense* sp. 245-Rif и *Pseudomonas fluorescens* F113. Оказалось, что 2,4-DAPG, продуцируемый псевдомонадами, усиливает экспрессию широкого спектра генов азоспирилл, включая гены, участвующие в фитостимуляции (продукция ауксина) [Combes-Meynet et al., 2011].

Поиск штаммов, продуцирующих активные вторичные метаболиты, ведется на озере Байкал давно [Иванова и др., 1992, Бакунина и др., 1994]. Однако акцент на изучение микроорганизмов, обладающих антагонистической активностью, и поиск потенциально активных штаммов в ассоциированных микробных сообществах был сделан в последние 10–15 лет [Теркина и др., 2006, Липко и др., 2012, Зименс и др., 2014, Shishlyannikova et al., 2017]. Наиболее изучены в этом отношении грамположительные бактерии – представители филы Actinobacteria, среди которых описаны как узкоспециализированные, так и штаммы с широким спектром антимикробной активности [Теркина и др., 2006]. В частности, изучение антагонистической активности актиномицетов из оз. Байкал показало, что бактерии родов *Streptomyces* и *Micromonospora* являются сильными антагонистами по отношению к некоторым гетеротрофным микроорганизмам [Теркина и др., 2006]. Анализ антагонистической активности штаммов, ассоциированных с биопленками, развивающимися на различных субстратах в озере, показал, что наиболее активны грамположительные бактерии *Kocuria* sp., *Bacillus* spp. и *Paenibacillus* spp. [Зименс и др., 2014]. Потенциальная активность грамотрицательных бактерий была показана молекулярно-генетической детекцией и идентификацией генов поликетидсинтаз (PKS) в геноме штамма *Pseudomonas fluorescens* 28bBb-06 из пресноводной губки *Baikalospongia bacillifera* [Липко и др., 2012]. Однако биоконтролирующая активность многих штаммов *P. fluorescens*, как и некоторых других флуоресцирующих псевдомонад, связана с продукцией 2,4-DAPG [Weller et al., 2007; Kim et al., 2012].

Таким образом, целью настоящего исследования стала детекция и идентификация гена *phl*, продуцирующего 2,4-DAPG, в геномах *Pseudomonas* spp., изолированных из ассоциированных микробных сообществ.

Материалы и методы. В работе использованы штаммы, изолированные с внешней поверхности байкальских губок и охарактеризованные рибосомной филогенией как *Pseudomonas* spp. Выделение геномной ДНК из клеточной суспензии проводили коммерческим набором ДНК-сорб-В (АмплиСенс, Москва). Амплификацию гена *phl* проводили на праймерах phl2a 5′-GAGGACGTCGAAGACCACCA-3′ и phl2b 5′-ACCGCAGCATCGTGTATGAG-3′ [Naik et al., 2008], продукты амплификации анализировали в агарозном гель-электрофорезе, целевые ампликоны вырезали и использовали для лигирования с вектором pJET^{TM} (CloneJET, Fermentas, Латвия) [Белькова, 2009]. Трансформацию клеток *Escherichia coli* вели по стандартной методике с $CaCl_2$ [Sambrook et al., 1989]. Скрининг колоний выполняли с помощью амплификации на плазмидных праймерах, рекомендованных фирмой-производителем. Все положительные ампликоны были секвенированы с набором BigDye® Terminator (Applied Biosystems, США) согласно протоколу фирмы-производителя. В реакцию брали 10–20 нг ампликона и 3–5 пмоль праймера. Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом капиллярном секвенаторе ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Редактирование нуклеотидных последовательностей производили вручную в соответствии с секвенограммой при помощи программы BioEdit v 7.1.3.0 [Hall, 1999]. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы BLASTx для анализа белок-кодирующих генов с международной базой генетических данных EMBL (http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html).

Результаты. Всего проанализировано 19 штаммов псевдомонад, ассоциированных с эндемичными байкальскими губками. В 17 штаммах детектирован ген *phl*, который ответственный за продукцию антибиотика 2,4-DAPG. Для каждого штамма определена нуклеотидная последовательность гена *phl*, размер ее варьировал от 486 до 558 п. н. Все последовательности были сгруппированы в пять групп на

основании идентичности их структур. Сравнительный анализ с гомологами белок-кодирующих генов из международной базы генетических данных EMBL позволил определить последовательности генов, ответственных за продукцию 2,4-диацетилфлороглюцинола, которые были получены из других штаммов псевдомонад: *Pseudomonas fluorescens* (99% гомологии), *Pseudomonas saponiphila* (99%), *Pseudomonas protegens* (97%), *Enterobacter ludwigii* (97%). Дополнительно выявлено сходство с генами поликетидсинтаз, которые идентифицированы в псевдомонадах молекулярными методами.

Таблица.

Замены аминокислот — сравнение полученных последовательностей с гомологом AXX31621

Название последовательности	**Количество замен**	**Положение замены**	**АМК гомолог**	**АМК посл-ть**	**Нукл. гомолог**	**Нукл. Посл-ть**	**Коэф. по Сниту**	**Коэф. по Волькенштейну**	**Коэф. по Бачинскому**	**Характер**
67-R	1	32	A	G	GCG	GGC	0,659	0,63	29	CONS
	2	35	T	N	ACC	AAC	0,488	0,44	17	CONS
	3	36	S	P	AGC	CCG	0,321	2,56	2,56	**RAD**
	4	123	Y	F	TAT	TTT	0,729	0,22	28	CONS
	5	162	R	K	CGT	AAA	0,733	0,77	25	CONS
	6	166	E	D	GAA	GAT	0,840	0,01	31	CONS
68	1	32	A	G	GCG	GGC	0,659	0,63	29	CONS
	2	35	T	N	ACC	AAC	0,488	0,44	17	CONS
	3	123	Y	F	TAT	TTT	0,729	0,22	28	CONS
	4	162	R	K	CGT	AAA	0,733	0,77	25	CONS
	5	166	E	D	GAA	GAT	0,840	0,01	31	CONS
AAX31621 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic protein, partial [*Pseudomonas protegens*]	1	32	A	G	GCG	GGC	0,659	0,63	29	CONS
	2	35	T	N	ACC	AAC	0,488	0,44	17	CONS
	3	123	Y	F	TAT	TTT	0,729	0,22	28	CONS
	4	162	R	K	CGT	AAA	0,733	0,77	25	CONS
	5	166	E	D	GAA	GAT	0,840	0,01	31	CONS
AGT95946 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic protein, partial [*Pseudomonas* sp. MSSRFD865]	1	32	A	G	GCG	GGC	0,659	0,63	29	CONS
	2	62	R	S	CGT	AGC	0,317	0,69	12	**RAD**

Анализ аминокислотных последовательностей позволил выявить расхождения, среди которых отмечены преимущественно консервативные замены аминокислот (таблица). Число замен варьировало от двух до шести, при этом замена аминокислоты в 32 позиции определена во всех случаях. Дополнительно консервативные замены выявлены еще в четырех позициях: 35, 123, 162 и 166. Установлены только две радикальные замены в позициях 36 и 62, при этом происходила смена заряженной положительно аминокислоты (аргинин) на незаряженную полярную (серин).

Несомненно, это говорит о незначительной степени вариаций конечного продукта экспрессии представленных генов и близких свойствах данных белков.

Работа выполнена в рамках темы VI.50.1.4. «Молекулярная экология и эволюция живых систем Центральной Азии в условиях глобальных экологических изменений» (0345-2016-0002).

Литература

Бакунина И.Ю., Иванова Е.П., Михайлова В.В., Недашковская О.И., Горшкова Н.М., Парфенова В.В. Распространение a-N-ацетилгалактозаминидаз среди морских и пресноводных микроорганизмов // Микробиология. – 1994. – Т. 63, № 5. – С. 847–853.

Белькова Н.Л. Молекулярно-генетические методы анализа микробных сообществ // Разнообразие микробных сообществ внутренних водоемов России: Учебно-методическое пособие. Ярославль: Изд-во ООО «Принтхаус», 2009. – С. 53–63.

Зименс Е.А., Суханова Е.В., Штыкова Ю.Р., Парфенова В.В., Белькова Н.Л. Антагонистическая активность гетеротрофных микроорганизмов из биопленок на твердых субстратах литоральной зоны озера Байкал // Известия ИГУ. Серия 'Биология. Экология'. – 2014. – Т. 7. – С. 91 –98.

Иванова Е.П., Бакунина И.Ю., Горшкова Н.М., Романенко Л.А., Михайлов В.В., Елякова Л.А., Парфенова В.В. Распространение хитинразлагающих ферментов у морских и пресноводных микроорганизмов // Биол. моря. – 1992. – № 3-4. – С. 69–75.

Липко (Теркина) И.А., Калюжная О.В., Кравченко О.С., Парфенова В.В. Идентификация генов поликетидсинтаз (PKS) в геноме штамма *Pseudomonas fluorescens* 28bBb-06 из пресноводной губки *Baikalospongia bacillifera* // Молекулярная биология. – 2012. – Т. 46, № 4. – С. 677–679.

Теркина И.А., Парфенова В.В., Ан Т.С. Антагонистическая активность актиномицетов озера Байкал // Прикл. биох. микроб. – 2006. – Т. 42, № 2. – С. 195–199.

Carroll H., Moenne-Loccoz Y., Dowling D.N., O'gara F. Mutational disruption of the biosynthesis genes coding for the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol does not influence the ecological fitness of *Pseudomonas fluorescens* F113 in the rhizosphere of sugarbeets // Appl. Environ. Microbiol. – 1995. – V. 61, No. 8. – P. 3002–3007.

Combes-Meynet E., Pothier J.F., Moënne-Loccoz Y., Prigent-Combaret C. The Pseudomonas secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of Azospirillum genes involved in plant-growth promotion // Mol. Plant Microbe Interact. – 2011. – V. 24, No. 2. – P. 271–284.

Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids. Symp. Ser. – 1999. – V. 41. – P. 95–98.

Kim S.D., Fuente L.de L., Weller D.M. Colonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* 2112, among collections of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* spp. in pea rhizosphere // J. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – V. 22, No. 6. – P. 763–770.

Lanteigne C., Gadkar V. J., Wallon T., Novinscak A., Filion M. Production of DAPG and HCN by *Pseudomonas* sp. LBUM300 contributes to the biological control of bacterial canker of tomato // Phytopathology. – 2012. – V. 102, No. 10. – P. 967–973.

Naik P.R., Sahoo N., Goswami D., Ayyadurai N., Sakthivel N. Genetic and functional diversity among fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of banana // Microb. Ecol. – 2008. – V. 56. – P. 492–504.

Netzker T., Flak M., Krespach M.K., Stroe M.C., Weber J., Schroeckh V., Brakhage A.A. Microbial interactions trigger the production of antibiotics // Curr. Opin. Microbiol. – 2018. – V. 45. – P. 117–123.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. A laboratory Manual. – Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1989. – V. 1, 2, 3.

Shishlyannikova T.A., Kuzmin A.V., Fedorova G.A., Shishlyannikov S.M., Lipko I.A., Suhanova E.V., Belkova N.L. Ionofore antibiotic polynactin produced by Streptomyces sp. 156A isolated from Lake Baikal // Nat. Prod. Res. – 2017. – V. 31, Iss. 6. – P. 639–644.

Weller D.M., Landa B.B., Mavrodi O.V., Schroeder K.L., De La Fuente L., Blouin Bankhead S., Allende Molar R., Bonsall R.F., Mavrodi D.V., Thomashow L.S. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots // Plant Biol. (Stuttg). – 2007. – V. 9, No. 1. – P. 4–20.

Yang F., Cao Y. Biosynthesis of phloroglucinol compounds in microorganisms--review. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2012. – V. 93, No. 2. – P. 487–495.

IDENTIFICATION OF THE GENE CONTAINING THE PRODUCTION OF ANTIBIOTICS OF 2,4-DIAGETYL FLOROGLUCINOL IN THE GENES OF BACTERIA OF THE GENUS *PSEUDOMONAS*

A.M. Dmitrieva[1], N.L. Belkova[2]

[1]Irkutsk State University, Irkutsk, Russia, *nastya.wss@mail.ru*
[2]Limnological Institute SB RAS, Irkutsk, Russia, *nlbelkova@gmail.com*

Abstract. Microorganisms during their vital activity produce various substances revealing antibacterial, antifungal or antiviral activity. A study was done of the structure of the *phl* genes responsible for the production of 2,4-diacetylfluoroglucinol (2,4-DAPG) in the genomes of bacteria of the genus *Pseudomonas*. 2,4-DAPG is a highly effective biocontrol of various pathogens.

Keywords*: antibiotics, Pseudomonas, endemic sponges, Lake Baikal*