

УДК 579.253.43+579.841.11

БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* S-1 С ДЕЛЕЦИЕЙ ГЕНОВ *hcnABC* УТРАЧИВАЮТ СПОСОБНОСТЬ ПОДАВЛЯТЬ РОСТ ПАТОГЕННОГО ГРИБА *COLLETOTRICHUM LUPINI* БИМ F-397

А. А. МУРАТОВА, Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
anya.muratova.93@mail.ru*

В результате анализа генома бактерий *Pseudomonas brassicacearum* S-1 определена локализация генетического кластера *hcnABC*, вероятно определяющего синтез цианида. Гены, входящие в состав данного кластера, являются консервативными и присутствуют в хромосомах ряда бактерий рода *Pseudomonas*. Проведена оптимизация метода направленной сайт-специфической рекомбинации для бактерий *P. brassicacearum* S-1, и с использованием данного метода получен штамм *P. brassicacearum* S-1-hcn с делецией *hcn*-кластера. Показано, что антагонистическая активность *P. brassicacearum* S-1-hcn в отношении фитопатогенного гриба *Colletotrichum lupini* БИМ F-397 отсутствовала в сравнении с исходным штаммом, что может свидетельствовать о ключевой роли циановодорода в подавлении роста данного фитопатогена.

Ключевые слова: псевдомонады, анализ генома, цианид, мутагенез, антагонистическая активность.

Введение. В настоящее время одной из наиболее актуальных задач растениеводства является обеспечение сельскохозяйственными продуктами постоянно растущего населения планеты. Однако для данной отрасли характерны значительные потери урожаев ввиду пагубного воздействия инфекционных заболеваний бактериальной и грибной этиологии [1]. Поэтому повышение устойчивости сельскохозяйственных культур к действию фитопатогенов и создание более безопасных и эффективных способов борьбы с фитопатогенными микроорганизмами является актуальной задачей [2]. Для решения данной задачи все чаще применяются биологические средства защиты растений на основе природных бактерий, обладающих ростстимулирующей и антагонистической активностью. Данные биопрепараты, в отличие от синтетических пестицидов, безвредны для окружающей среды и потребителя.

Разработкой биопестицидов для сельского хозяйства на основе почвенных бактерий рода *Pseudomonas* активно занимаются во многих странах [3]. В 2005 г. на базе лаборатории средств биологического контроля Института микробиологии НАН Беларуси был выделен штамм *P. brassicacearum* S-1 с выраженной антимикробной и фитостимулирующей активностью [4]. На основе данного штамма был разработан биопестицид «Экогрин», который применяется для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники [5].

В 2020 г. на базе лаборатории «Центр аналитических и геноинженерных исследований» Института микробиологии НАН Беларуси было проведено полногеномное секвенирование и последующий анализ нуклеотидной последовательности генома штамма *P. brassicacearum* S-1 для выявления генетических детерминант, определяющих его антагонистические свойства. Анализ позволил выявить ряд генетических детерминант, определяющих синтез 2,4-диацетилфлороглюцинола, пиовердина и цианида [6]. Данные соединения активны в отношении спектра бактериальных и грибных фитопатогенов.

Ранее нами был проведен молекулярно-генетический и функциональный анализ локусов, определяющих синтез 2,4-диацетилфлороглюцинола и пиовердина, установлена их роль в антимикробной активности бактерий *P. brassicacearum* S-1 [7, 8]. Однако не меньший интерес представляет изучение роли цианида в комплексной антимикробной активности штамма S-1. Согласно литературным данным, исследована роль цианида в отношении подавления роста нематод родов *Meloidogyne* и *Caenorhabditis*, паразитирующих на растениях томата, огурца, перца, картофеля и т. д. [9]. Показана способность цианида ингибировать рост фитопатогенов *Thielaviopsis basicola*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicalycopersici* и *Pythium ultimum*, которые вызывают корневые гнили табака, томата и огурца соответственно [10]. Помимо антагонистических свойств, для цианида показана ростстимулирующая активность. В частности, продемонстрировано, что цианид участвует в прорастании семян, развитии и иммунитете растений [11, 12].

Информация о бактериальной полногеномной последовательности позволяет изучить молекулярную структуру и организа-

цию множества открытых рамок считывания, но не определить их функциональную пригодность. Для установления связи между наличием в составе генома различных генетических детерминант и функциональной ролью белков, которые, предположительно, кодируются данными генами, используют различные виды мутагенеза [13]. Одним из таких методов является направленный мутагенез, который позволяет целенаправленно вносить мутации в выбранные места в пределах хромосомы и инактивировать различные локусы в составе генома изучаемого штамма, при этом не внося дополнительных генетических маркеров, например, генов антибиотикорезистентности [14].

Цель работы – безмаркерное удаление *hcn*-генов синтеза цианида в геноме штамма *P. brassicacearum* S-1 и изучение влияния данной мутации на его антимикробную активность.

Материалы и методы. Используемые в работе штаммы микроорганизмов и плазмиды перечислены в табл. 1. Глубинное культивирование пектобактерий (в среде LB [15]) и псевдомонад (в среде Мейнелла [16]) осуществляли с перемешиванием 200 об/мин при температуре 28–30 °С в течение 24–48 ч. Бактерии *Escherichia coli* выращивали при 37 °С в среде LB в течение 12–14 ч, с перемешиванием 120–160 об/мин. Грибы выращивали в картофельно-глюкозном бульоне [17] с перемешиванием 120–160 об/мин при температуре 22 °С.

Т а б л и ц а 1. Характеристика использованных штаммов микроорганизмов и плазмид

Штаммы, плазмиды	Характеристика	Источник
<i>Alternaria alternata</i> БИМ F-462	Возбудитель альтернариоза огурца	Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов
<i>Colletotrichum lupini</i> БИМ F-397	Возбудитель антракноза люпина	
<i>Pseudomonas syringae</i> БИМ B-280	Возбудитель бактериального ожога сои	
<i>Fusarium oxysporum</i> БИМ F-798	Возбудитель корневой гнили томата	
<i>Pectobacterium</i> <i>carotovorum</i> БИМ B-662	Возбудитель мокрых гнилей овощных культур	

Окончание табл. 1

Штаммы, плазмиды	Характеристика	Источник
<i>Escherichia coli</i>		
XL1-Blue	F'proAB lacI ^q lacZΔM15 Tn10(Tet ^R)/recA1 endA1 gyrA96(Nal ^R) thi-1 hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺) supE44 relA1 lac	[18]
S17-1	thi rspL (Str ^R) endA sbcB15 sbcC hsdR (r _k ⁻ m _k ⁻) Δ(lac-proAB) [F' traD36 lacI ^q Δ(lacZ)M15 proA ⁺ B ⁺] λ pir ⁺	[19]
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>		
S-1 (БИМ В-446 Д)	Ery ^R , содержит спонтанную хромо- сомную мутацию, определяющую устойчивость к эритромицину, по- лучен из штамма <i>P. brassicacearum</i> S	Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов
S-1-hcn	Ery ^R , в хромосоме делеция генов hcnABC с 3 919 373 по 3 922 093 п. н.	Получен в данной работе
Плазмиды		
pJET1.2	Ap ^R , P _{lacUV5} , eco47IR, oriV _{ColE1}	[20]
pJQ200KS	Gm ^R , lacZα, sacB, mob, oriV _{p15A}	[21]
pLS1648	Ap ^R , Km ^R , loxP-neo-loxP кассета, oriV _{R6K}	[14]
pLS3063	Tc ^R , xylS, Pm – λ Red (Gam, Beta, Exo), sacB, mekR, PMekA – cre, oriV _{RK2}	
pJET::hcn	pJET1.2 со вставкой кластера ге- нов hcnABC по сайту Eco32I	Получены в данной работе
pJET::hcn-loxP-neo-loxP	pJET::hcn со вставкой конструкции loxP-neo-loxP по сайтам Eco32I-SmaI	
pJQ200KS::hcn-loxP- neo-loxP	pJQ200KS со вставкой конструкции hcnABC-loxP-neo-loxP по сайту SmaI	

В работе использовали коммерческие препараты антибиотиков в конечных концентрациях: гентамицин – 10 мкг/мл; канамицин и эритромицин – 50 мкг/мл; ампициллин – 100 мкг/мл.

Тотальную ДНК выделяли с использованием набора реактивов «Bacteria DNA Preparation Kit» (PP-214L, Jena Bioscience), а плазмидную – «GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit» (K0503, Thermo Fisher Scientific).

Определение концентрации ДНК проводили на спектрофотометре «Implen NanoPhotometer P330». Концентрацию ДНК и степень очистки нуклеиновых кислот рассчитывали автоматически с помощью встроенного в спектрофотометр программного обеспечения.

Для проведения полимеразной цепной реакции использовали реактивы фирмы АртБиоТех (Республика Беларусь). Реакционная смесь (25 мкл) содержала ~ 10 нг ДНК-матрицы, 0,2 мМ каждого 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфата (дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ), 0,2 мкМ каждого праймера, 0,02 ед/мкл Flash ДНК-полимеразы в 1× буфере Flash. Проверку на наличие шпилечных структур в пределах праймеров и определение температуры отжига проводили с помощью программы Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) и онлайн-олигокалькулятора Олиго Кальк (<http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligocalc.html>). Используемые праймеры и режимы ПЦР приведены в табл. 2.

Электрофоретический анализ ДНК осуществляли в 0,8%-ном агарозном геле с бромистым этидием (в конечной концентрации 0,1 %) при напряженности электрического поля 8–10 В/см. В качестве загрузочного буфера использовали 6× DNA Gel Loading Dye (R0611, Thermo Fisher Scientific), в качестве маркера молекулярной массы ДНК – GeneRuler 1 kb DNA Ladder (SM0311, Thermo Fisher Scientific). Результаты визуализировали с помощью системы цифровой фотодокументации ChemiDoc™ MP производства Bio-Rad.

Выделение фрагментов ДНК после электрофоретического разделения в агарозном геле проводили с помощью наборов «GeneJET Gel Extraction Kit» (K0691, Thermo Fisher Scientific) или «Monarch® DNA Gel Extraction Kit» (T1020S, New England Biolabs) в соответствии с протоколами производителей. Рестриктию плазмидной и тотальной ДНК, лигирование осуществляли с помощью ферментов фирмы Thermo Fisher Scientific.

Трансформацию бактерий *E. coli* осуществляли согласно методическим рекомендациям, изложенным в руководстве Дж. Сэмбрука с соавт. [22].

Для приготовления компетентных клеток бактерии *P. brassicaevarum* S-1 в качестве отмывочного буфера использовали раствор

Таблица 2. Характеристика праймеров, использованных в работе и режимы амплификации ДНК

Название	Последовательность (5'→3')	Режим ПЦР	Мишень
loxP-F	CCGAAGTTCCTATTCTTAG	96 °С – 30 с (1 цикл); 96 °С – 5 с, 53 °С – 10 с, 72 °С – 40 с (30 циклов); 72 °С – 5 мин (1 цикл).	Конструкция loxP-leo-loxP на плазмиде pLS1648
loxP-R	CGAAAAGTGCCACCTGCATCG		
hcn-F	CTTGGTCAAGTAATCGTGGCC	98 °С – 30 с (1 цикл); 98 °С – 5 с, 54 °С – 10 с, 72 °С – 1 мин (30 циклов); 72 °С – 5 мин (1 цикл).	Кластер генов <i>hcnABC</i>
hcn-R	STATGGAATGCTGGAAACAGGAG		

3 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (Хепес), что обеспечивало максимальную частоту трансформации при электропорации [23].

Элиминацию плазмиды pLS3063 из клеток бактерий *P. brassicacearum* проводили путем посева на среду с 5%-ной сахарозой. В составе данной плазмиды присутствует ген *sacB*, который экспрессируется в присутствии сахарозы, в результате чего образуется фермент левансахараза. Данный фермент обеспечивает превращение сахарозы в токсичное для клеток грамотрицательных бактерий вещество леван, и, таким образом, выживают только те клетки, которые утратили плазмиду [24].

Для безмаркерного мутагенеза использовали метод Cre/loxP сайт-специфической рекомбинации [14]. Перенос плазмидной конструкции pJQ200KS::*hcn-loxP-neo-loxP* в бактерии *P. brassicacearum* S-1 осуществляли методом конъюгации [25]. В качестве штамма-донора использовали *E. coli* S17-1. Клетки донора и реципиента, находящиеся в стационарной фазе роста, концентрировали в 5 раз, смешивали в соотношении 1:1 и смесь наносили 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 из соответствующих разведений высевали на селективные среды.

Определение антимикробной активности проводили в трех биологических повторностях с помощью метода отсроченного антагонизма [26], расчеты проводили с учетом среднеквадратического отклонения.

Визуализацию генетических карт осуществляли с помощью программы SnapGene Viewer 5.2. Сравнение аминокислотных и нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и баз данных Национального центра биотехнологической информации США (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Результаты и обсуждение. В результате анализа генома бактерий *P. brassicacearum* S-1 после автоматической аннотации программным конвейером PGAP (NCBI Prokaryotic Genome Annotation

Pipeline) были выявлены гены *hcnABC* (координаты области в геноме 3 919 148–3 922 129 п. н.), предсказанными продуктами которых являются цианидобразующие субъединицы глициндегидрогеназы (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Гены, определяющие продукцию цианида у штамма *P. brassicacearum* S-1

Номер локуса (ген)	Размер, п. н.	Продукт гена	Штаммы со схожими генами	Идентичность, %
GFU70_16390 (<i>hcnA</i>)	324	Цианидобразующая субъединица глициндегидрогеназы HcnA	<i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725) <i>P. brassicacearum</i> BS3663 (LT629713)	95,68 95,68
GFU70_16385 (<i>hcnB</i>)	1410	Цианидобразующая субъединица глициндегидрогеназы HcnB	<i>Pseudomonas</i> sp. B21-010 (CP087198) <i>P. brassicacearum</i> 3Re2-7 (CP034725)	95,04 94,96
GFU70_16380 (<i>hcnC</i>)	1260	Цианидобразующая субъединица глициндегидрогеназы HcnC	<i>P. ogarae</i> FR1 (CP025738) <i>P. zarinae</i> SWR1108 (CP077086)	94,84 94,84

Как видно из данных, представленных в табл. 3, исследуемые детерминанты являются достаточно консервативными и присутствуют в хромосомах ряда бактерий рода *Pseudomonas*. В литературных источниках достаточно подробно описан механизм синтеза цианида у псевдомонад, который обусловлен наличием генов, кодирующих три цианидобразующие субъединицы глициндегидрогеназы – HcnA, HcnB и HcnC. Данные генетические детерминанты сгруппированы в один оперон *hcnABC*, работа которого контролируется двухкомпонентной системой GacS/GacA [27]. Таким образом, наличие генов трех аналогичных цианидобразующих субъединиц глициндегидрогеназы в составе хромосомы штамма S-1 предполагает способность данных бактерий продуцировать цианид.

Для определения роли оперона *hcnABC* в антимикробной активности бактерий *P. brassicacearum* S-1 был применен метод безмаркерного нокаута генов. Для этого мы использовали набор плазмид pLS1648/pLS3063, любезно предоставленный нам коллегой

Гуандонгом Шангом из лаборатории микроорганизмов и функциональной геномики Нанкинского педагогического университета, провинция Цзянсу, Китай.

На первом этапе данного эксперимента был амплифицирован локус *hcnABC* размером 3846 п. н., который лигировали с плазмидой pJET1.2 по сайту Eco32I. Полученные гибридные конструкции отбирали в клетках *E. coli* XL1-Blue на среде с ампициллином. Затем из полученных трансформантов выделяли плазмиду pJET::*hcn* и обрабатывали рестриктазами Eco32I и SmaI. В результате была удалена большая часть *hcn*-оперона размером 2720 п. н., при этом остались области для последующей гомологичной рекомбинации размерами 619 п. н. и 507 п. н. Далее фрагмент pJET::*hcn* размером 4100 п. н. вырезали и очищали из геля. На следующем этапе амплифицировали фрагмент loxP-*neo*-loxP размером 1062 п. н. из вектора pLS1648, который лигировали с линейаризованным фрагментом pJET::*hcn*. Полученные конструкции pJET::*hcn*-loxP-*neo*-loxP отбирали в клетках *E. coli* XL1-Blue на среде с канамицином и ампициллином (рис. 1).

К сожалению, следуя напрямую оригинальной методике [14], нам не удалось получить мутантные варианты изучаемого штамма. Электропорация гибридной конструкцией pJET::*hcn*-loxP-*neo*-loxP или только ПЦР-продуктом *hcnA'*-loxP-*neo*-loxP-*hcnC* не позволила отобрать ни одного устойчивого к канамицину варианта бактерий *P. brassicacearum* S-1. Были высказаны предположения, что при проведении электропорации может быть ограничено время для гомологичной рекомбинации или же конструкция *hcn*-loxP-*neo*-loxP не успевает заменить исходную в пределах хромосомы бактерий *P. brassicacearum* S-1 ввиду воздействия эндогенных рестриктаз. Поэтому было решено провести безмаркерный мутагенез с использованием стадии конъюгации для увеличения времени переноса генетического материала в клетки штамма-реципиента. Для этого проводили амплификацию фрагмента *hcnA'*-loxP-*neo*-loxP-*hcnC* (2188 п. н.) с помощью праймеров *hcn*-F/*hcn*-R и последующее лигирование с линейаризованной по сайту SmaI конъюгативной плазмидой pJQ200KS. Данная плазида несет в своем составе гены *mob*, которые ответственны

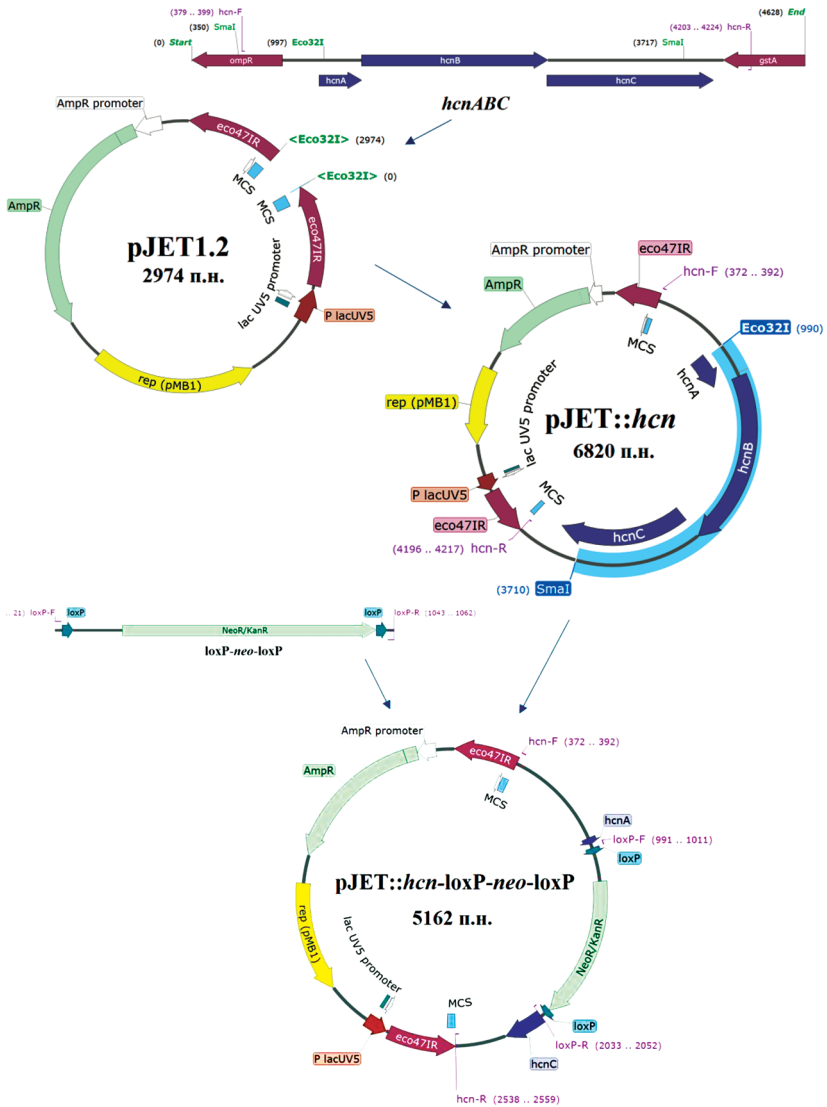


Рис. 1. Схема получения генетической конструкции pJET::hcn-loxP-neo-loxP

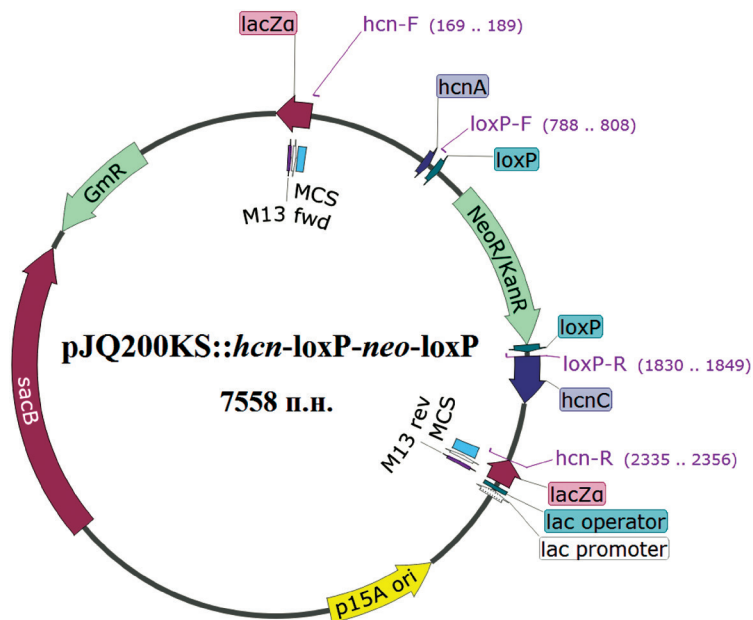
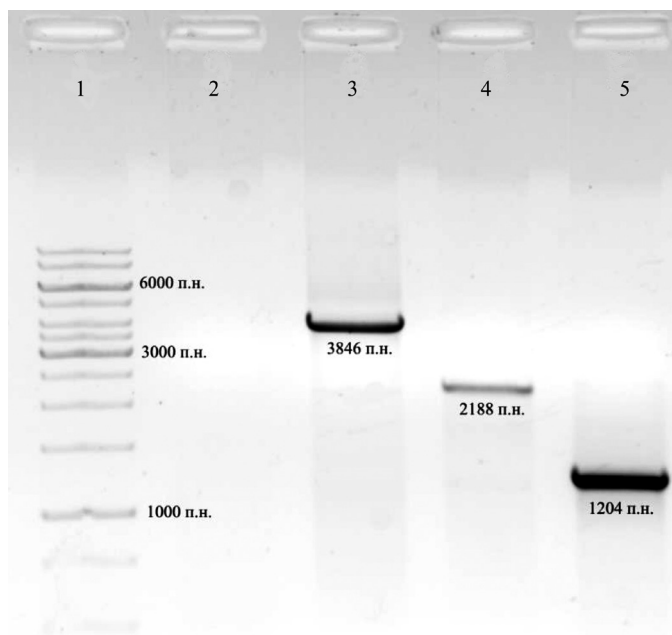


Рис. 2. Карта генетической конструкции pJQ200KS::hcn-loxP-neo-loxP

за мобилизационный перенос. Полученную векторную конструкцию pJQ200KS::hcn-loxP-neo-loxP (рис. 2) клонировали в клетках конъюгативного штамма *E. coli* S17-1 на питательной среде с гентамицином и канамицином. Штамм *E. coli* S17-1 широко используется в качестве штамма-донора для конъюгационного переноса плазмид в клетки грамотрицательных бактерий [28]. Данный штамм содержит интегрированную в хромосому плазмиду RP4, которая принадлежит к группе несовместимости IncP-1. На основе плазмид данной группы осуществляется конъюгация у многих видов бактерий [29].

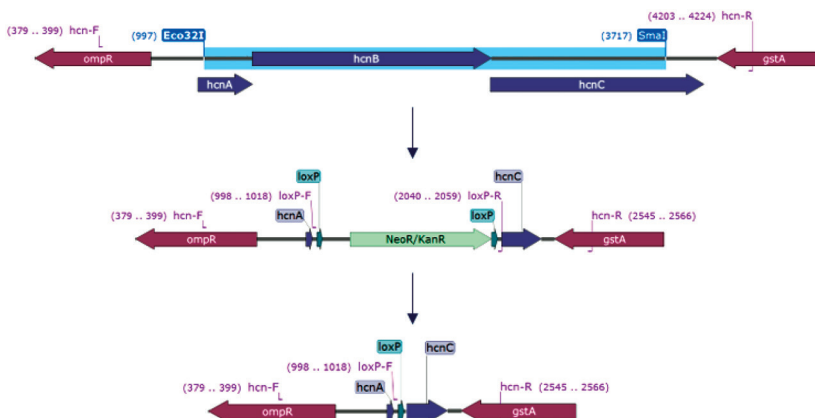
Полученный конъюгативный штамм *E. coli* S17-1 [pJQ200KS::hcn-loxP-neo-loxP] скрещивали со штаммом-реципиентом *P. brassicacearum* S-1, в результате чего был отобран мутантный штамм *P. brassicacearum* S-1::hcn-loxP-neo-loxP, у которого в составе хромосомы конструкция hcn-loxP-neo-loxP заменила исходный hcn-оперон, что было подтверждено методом ПЦР (рис. 3, дорожка 4).

На следующем этапе проводили электропорацию клеток *P. brassicacearum* S-1::*hcn-loxP-neo-loxP* плазмидой pLS3063, которая несет в своем составе ген Cre-рекомбиназы. В результате трансформации был отобран штамм *P. brassicacearum* S-1::*hcn-loxP-neo-loxP* [pLS3063]. Затем в результате ацетон-индуцированной экспрессии гена Cre-рекомбиназы произошло выщепление кассеты *loxP-neo-loxP* из состава геномной ДНК у полученного штамма. Таким образом, были отобраны мутантные безмаркерные варианты бактерий *P. brassicacearum* S-1-*hcn*, которые несли в составе хромосомы делецию оперона *hcnABC*. Нокаут *hcn*-кластера подтверждали методом ПЦР, в результате чего был получен ампликон размером 1204 п. н. (рис. 3, дорожка 5), что свидетельствует об успешной делеции в *hcn*-кластере у бактерий *P. brassicacearum* S-1 (рис. 3, 4).



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

Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации *hcn*-кластера



Праймеры, использованные для эксперимента, обозначены фиолетовым цветом

Рис. 4. Схема, отражающая процесс направленной инактивации *hcn*-кластера бактерий *P. brassicacearum* S-1

На заключительном этапе данного эксперимента определяли влияние делеции в *hcn*-кластере у мутантного штамма *P. brassicacearum* S-1-*hcn* на проявление антагонистической активности в отношении ряда бактериальных и грибных патогенов (табл. 4).

Показано, что при направленной инактивации *hcn*-кластера, гены которого, вероятно, отвечают за синтез цианида, антимикробная активность штамма *P. brassicacearum* S-1-*hcn* по отношению к патогенам *P. syringae* БИМ В-280, *Pec. carotovorum* БИМ В-662,

Т а б л и ц а 4. Антагонистическая активность штаммов *P. brassicacearum* S-1-*hcn* и *P. brassicacearum* S-1

Патоген	Диаметр зоны задержки роста фитопатогенов (мм)	
	<i>P. brassicacearum</i> S-1- <i>hcn</i>	<i>P. brassicacearum</i> S-1
<i>P. syringae</i> БИМ В-280	23,0 ± 2,5	22,3 ± 1,6
<i>Pec. carotovorum</i> БИМ В-662	25,0 ± 1,5	23,0 ± 2,0
<i>A. alternata</i> БИМ F-462	21,0 ± 1,8	19,0 ± 1,4
<i>F. oxysporum</i> БИМ F-798	20,0 ± 2,4	17,0 ± 1,4
<i>C. lupini</i> БИМ F-397	—	19,0 ± 1,0

П р и м е ч а н и е: после знака ± приводится среднеквадратическое отклонение.

A. alternata БИМ F-462 и *F. oxysporum* БИМ F-798 остается на уровне исходного штамма, а в отношении подавления роста патогена *C. lupini* БИМ F-397 полностью пропадает. На настоящий момент в литературе отсутствуют данные о воздействии цианида на рост фитопатогенов, которые были выбраны для данного эксперимента. В частности, предполагаемое влияние циановодорода в отношении ингибирования фитопатогена *C. lupini* БИМ F-397 было показано впервые, что предположительно свидетельствует о ключевой роли цианида в подавлении роста данного грибного патогена.

Заключение. В результате проведенных исследований выявлен кластер генов *hcnABC*, продукты которых, согласно литературным данным, ответственны за синтез цианида и антимикробную активность бактерий *P. brassicacearum* S-1. Для определения роли цианида в антагонистической активности изучаемых бактерий оптимизирован метод направленного безмаркерного мутагенеза, в результате чего получен штамм *P. brassicacearum* S-1-*hcn*, у которого отсутствует часть *hcn*-кластера. Полученный штамм утрачивал антагонистическую активность в отношении патогенного гриба *C. lupini* БИМ F-397, что предположительно свидетельствовало о ключевой роли цианида в подавлении его роста.

Литература

1. Infectious Plant Diseases: Etiology, Current Status, Problems and Prospects in Plant Protection / P. A. Nazarov [et al.] // Acta Naturae. – 2020. – Vol. 12, № 3. – P. 46–59.
2. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture / D. Tilman [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2011. – Vol. 108, № 50. – P. 20260–20264.
3. An Overview of Some Biopesticides and Their Importance in Plant Protection for Commercial Acceptance / J. Kumar [et al.] // Plants. – 2021. – Vol. 10, № 6. – P. 1185.
4. Mandryk, M. N. Characterization of antimicrobial compounds produced by *Pseudomonas aurantiaca* S-1 / M. N. Mandryk, E. I. Kolomiets, E. S. Dey // Pol. J. Microbiol. – 2007. – Vol. 56, № 4. – P. 245–250.
5. Бактерии *Pseudomonas aurantiaca* БИМ В-446 – основа биопрепарата «Экогрин» для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники / Э. И. Коломиец [и др.] // Микробные биотехнологии: функциональные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. – 2012. – № 4. – С. 98–107.
6. Muratova, A. Genome analysis of *Pseudomonas brassicacearum* S-1 – an antagonist of crop pathogens / A. Muratova, A. Akhremchuk, L. Valentovich // Biotechnol. Acta. – 2021. – Т. 14. – С. 47–58.

7. Molecular genetic analysis of determinants defining synthesis of 2,4-diacetylphloroglucinol by *Pseudomonas brassicacearum* BIM B-446 bacteria / M. N. Mandryk-Litvinkovich [et al.] // Appl. Biochem. Microbiol. – 2017. – Vol. 53, № 1. – P. 31–39.

8. Молекулярно-генетический и функциональный анализ генов, влияющих на синтез пиовердина бактериями *Pseudomonas brassicacearum* S-1 / А. А. Муратова [и др.] // Молекулярная и прикладная генетика : сб. науч. тр. / Ин-т генетики и цитологии Нац. акад. наук Беларуси. – Минск, 2022. – Т. 33. – С. 83–94.

9. Role of cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the suppression of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* in tomato / I. A. Siddiqui [et al.] // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – Vol. 22, № 6. – P. 641–650.

10. Ramette, A. Prevalence of fluorescent pseudomonads producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot / A. Ramette, Y. Moëgne-Loccoz, G. Défago // FEMS Microbiol. Ecol. – 2003. – Vol. 44, № 1. – P. 35–43.

11. Blumer, C. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis / C. Blumer, D. Haas // Arch. Microbiol. – 2000. – Vol. 173, № 3. – P. 170–177.

12. New insights into the role of cyanide in the promotion of seed germination in tomato / L.-L. Yu [et al.] // BMC Plant Biol. – 2022. – Vol. 22, № 1. – P. 28.

13. Watford, S. Bacterial DNA Mutations [Electronic resource] / S. Watford, S. J. Warrington // StatPearls. – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459274/> Pate of access: 10.05.2023.

14. *Pseudomonas putida* KT2440 markerless gene deletion using a combination of λ Red recombineering and Cre/loxP site-specific recombination / X. Luo [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 2016. – Vol. 363, № 4. – Art. fnw014. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw014>

15. Bertani, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* / G. Bertani // J. Bacteriol. – 1951. – Vol. 62, № 3. – P. 293–300.

16. Мейнелл, Д. Экспериментальная микробиология / Д. Мейнелл, Э. Мейнелл. – М. : Мир, 1967. – 320 с.

17. Wongjirathiti, A. Utilisation of local crops as alternative media for fungal growth / A. Wongjirathiti, S. Yottakot // Pertanika J. Trop. Agric. Sci. – 2017. – Vol. 40. – P. 295–304.

18. Metcalf, W.W. 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 / W. W. Metcalf, W. Jiang, B.L. Wanner // Gene. – 1994. – Vol. 138, № 1. – P. 1–7.

19. Lorenzo, V. de. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons / V. de Lorenzo, K. N. Timmis // Methods Enzymol. – 1994. – Vol. 235. – P. 386–405.

20. CloneJET PCR Cloning Kit [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231>. – Date of access: 18.02.2021.

21. Quandt, J. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria / J. Quandt, M. F. Hynes // Gene. – 1993. – Vol. 127, № 1. – P. 15–21.

22. Sambrook, J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* / J. Sambrook, D. Russell. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000. – 2344 p.

23. 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.

24. Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans* / W. Jäger [et al.] // *J. Bacteriol.* – 1992. – Vol. 174, № 16. – P. 5462–5465.

25. Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level / C. Virolle [et al.] // *Genes.* – 2020. – Vol. 11, № 11. – P. 1239.

26. Сэги, Й. Методы почвенной микробиологии / Й. Сэги. – М. : Колос, 1983. – 296 с.

27. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase / C. Reimann [et al.] // *Mol. Microbiol.* – 1997. – Vol. 24, № 2. – P. 309-319.

28. Simon, R. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria / R. Simon, U. Priefer, A. Pühler // *Bio Technology.* – 1983. – Vol. 1, № 9. – P. 784–791.

29. Burkardt, H. J. Relationship of group P1 plasmids revealed by heteroduplex experiments: RP1, RP4, R68 and RK2 are identical / H. J. Burkardt, G. Riess, A. Pühler // *J. Gen. Microbiol.* – 1979. – Vol. 114, № 2. – P. 341–348.

**BACTERIA *PSEUDOMONAS BRASSICACEARUM* S-1
WITH DELETION OF *hcnABC* GENES LOSE THE ABILITY
TO SUPPRESS THE GROWTH OF PATHOGENIC FUNGI
COLLETOTRICHUM LUPINI BIM F-397**

A. A. MURATOVA, L. N. VALENTOVICH

*Institute of Microbiology, NAS of Belarus, Minsk, Belarus,
anya.muratova.93@mail.ru*

As a result of the analysis of the genome sequence of *Pseudomonas brassicacearum* strain S-1, the localization of the genetic cluster *hcnABC* was determined. The cluster probably affects the synthesis of cyanide in *P. brassicacearum* strain S-1. The genes that make up this cluster are conservative and are present in the chromosomes of a number of bacteria of the *Pseudomonas* genus. Optimization of the site-specific recombination method for *P. brassicacearum* S-1 was carried out, and using this method, the *P. brassicacearum* S-1-*hcn* strain with a deletion of the *hcn* cluster was obtained. It was shown that the antagonistic activity of *P. brassicacearum* S-1-*hcn* against the phytopathogenic fungi *Colletotrichum lupini* BIM F-397 was absent

in comparison with the original strain, which indicates the key role of hydrogen cyanide in suppressing the growth of this phytopathogen.

Keywords: pseudomonads, genome analysis, cyanide, mutagenesis, antagonistic activity.

Поступила в редакцию 10.05.2023

УДК 579.258+579.252.5

РЕПОРТЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МАРКИРОВАНИЯ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ

*А. Э. ОХРЕМЧУК, О. В. ЕВДОКИМОВА,
Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ*

*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
akhremchuk@bio.bsu.by*

В ходе работы получены репортерные конструкции, состоящие из природных и синтетических промоторных последовательностей (P_{adc} , P_{43} , P_{CP8} , P_{CP41} , P_{CP44} , P_{ES} , P_{TC} , P_{repN} , P_{32}), сайтов связывания рибосом, кодирующей нуклеотидной последовательности гена зеленого флуоресцентного белка и терминатора. Полученные репортерные конструкции клонированы в составе челночного вектора proViH1. Проведена оценка интенсивности флуоресценции суспензий клеток бактерий *Escherichia coli* XL1-Blue, *Bacillus subtilis* 168 и *Lactococcus lactis* NZ3900, несущих репортерные конструкции в составе вектора proViH1. На основании полученных данных отобран ряд промоторных последовательностей, пригодных для мечения клеток бактерий различных филогенетических групп.

Ключевые слова: промотор, зеленый флуоресцентный белок, репортерная кассета, флуоресценция клеток, маркирование бактерий.

Введение. Флуоресцентные белки широко применяются для мечения клеток бактерий. Наличие легко фиксируемого флуоресцентного сигнала позволяет оценить выживаемость и распространение клеток в модельных и природных биотопах. В качестве примера можно привести ряд работ, описывающих использование репортерных кассет на основе гена зеленого флуоресцентного белка для отслеживания ризосферных бактерий [1, 2], бактерий – деструкторов ксенобиотиков в загрязненной почве [3] и молочно-