

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 579.255:579.258

ИНАКТИВАЦИЯ ГЕНА, ОТВЕТСТВЕННОГО ЗА СИНТЕЗ ГЛЮКОНОВОЙ КИСЛОТЫ, В ГЕНОМЕ *PANTOEAE BRENNERI*

© 2025 г. А. Д. Сулейманова^{а, *}, Л. В. Сокольникова^а, Д. С. Бульмакова^а,
Е. А. Егорова^а, М. Р. Шарипова^а

^аФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, 420008, Россия

*e-mail: Aliya.kzn@gmail.com

Поступила в редакцию 15.10. 2024 г.

После доработки 19.11. 2024 г.

Принята к публикации 20.11.2024 г.

Для изучения вклада продукта гена глюкозодегидрогеназы (*gcd*) в развитие ISR-прайминга у растений получали штамм *Pantoea brenneri* 3.2 с делецией по гену *gcd*. С помощью системы рекомбинации фага Lambda Red (λ Red) нами получен безмаркерный мутантный штамм *P. brenneri* 3.2 Δ *gcd*. Инактивация гена глюкозодегидрогеназы *gcd* привела к снижению способности штамма солибилизировать трикальцийфосфат на твердой питательной среде NBRIP в 2.5 раза.

Ключевые слова: ISR-прайминг, солибилизация фосфатов, *Pantoea brenneri*

DOI: 10.31857/S0026365625020095

Почвенные бактерии *Pantoea brenneri* обладают многочисленными свойствами, стимулирующими рост растений: секреция гидролитических ферментов (фитазы, протеазы, целлюлазы), цианидов (HCN), производство ауксина и сидерофоров, антагонистическая активность против фитопатогенных микроорганизмов (Иткина и соавт., 2021; Бульмакова и соавт., 2023). Кроме того, штаммы *P. brenneri* обладают уникальной способностью гидролизировать органические почвенные соединения фосфора и широкий спектр неорганических труднорастворимых почвенных фосфатов (Suleimanova et al., 2023). Известно, что помимо прямых механизмов положительного воздействия на растения, ризобактерии опосредованно активируют иммунный ответ растения-хозяина, стимулируя индуцированную системную резистентность (ISR) (Kumar et al., 2018). Исследования молекулярных основ ISR-прайминга проводят давно, однако механизмы этого процесса изучены недостаточно.

Способность штаммов *P. brenneri* солибилизировать труднорастворимые соединения фосфора в ризосфере может быть вовлечена в ISR-прайминг растений. Секреция *P. brenneri* глюконовой кислоты является одним из механизмов мобилизации неорганических почвенных фосфатов бактериями. Ключевой фермент, ведущий этот процесс — глюкозодегидрогеназа (*gcd*), в качестве кофактора которой выступает пирролохинолинхинон (PQQ). Фермент, ведущий биосинтез пирролохинолинхинона, в свою

очередь кодируется геном *pqqE* (Rawat et al., 2020). В геноме штамма *P. brenneri* 3.2 нами идентифицированы оба гена — *gcd* и *pqqE*.

Целью настоящей работы явилось получение мутантного штамма *P. brenneri* 3.2 с делетированным геном глюкозодегидрогеназы *gcd* для оценки роли продукта данного гена в ISR-прайминге растений.

В работе использовали штамм *P. brenneri* 3.2, выделенный ранее из почвы республики Татарстан (Suleimanova et al., 2015). Культивирование бактерий проводили на среде LB (Sambrook et al., 1989). Культивирование микроорганизмов осуществляли при 30–37°C на качалке (180 об./мин). Способность штаммов солибилизировать фосфаты оценивали на среде NBRIP (Park et al., 2011) (г/л): глюкоза — 10; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ — 5; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.25; KCl — 0.2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0.1; pH 7.0. Агаризованная среда включала 1.5% агара. Посевы инкубировали в течение 5 сут при 30°C. Затем определяли индекс солибилизации фосфатов как отношение диаметра гало-зоны к диаметру колонии (Paul, Sinha, 2017).

Инактивацию гена глюкозодегидрогеназы *gcd* в геноме *P. brenneri* 3.2 осуществляли при помощи системы рекомбинации фага λ Red по модифицированной методике (Datsenko, Wanner, 2000) с использованием плазмид pKD4, pKD46-Gm, pCP20. Культивирование бактерий после трансформации проводили на среде SOC (Hanahan, 1983): триптон — 2%; дрожжевой экстракт — 0.5%;

NaCl – 10 mM; KCl – 2.5 mM; MgCl₂ – 10 mM; MgSO₄ – 10 mM; глюкоза – 20 mM; pH 7.0.

С помощью системы рекомбинации фага λ Red получили безмаркерный мутантный штамм с делегированным геном глюкозодегидрогеназы *P. brenneri* 3.2 Δ*gcd*. На первом этапе с плазмиды pKD4 амплифицировали кассету устойчивости к канамицину *kan*, фланкированную FRT-сайтами. Для амплификации использовали составные праймеры (таблица), 5'-конец которых содержал фланкирующие участки целевого гена *gcd*, в результате амплифицированный ген *kan* был фланкирован 5'-и 3'-областями гена *gcd*. Полученный ПЦР-продукт имел размер 1472 п.н. (рис. 1а).

На втором этапе получали штаммы *P. brenneri* 3.2, несущие плазмиду pKD46-Gm, которые затем трансформировали ПЦР-продуктом, содержащим амплификат гена *kan*, фланкированный участками целевого гена *gcd*. Готовили первичные электрокомпетентные клетки штамма *P. brenneri*

по модифицированной методике: ночную культуру центрифугировали 10 мин при 7000 об./мин и 4°C, затем клетки отмывали 3 раза в 10% глицерине. Далее к 80 мкл электрокомпетентных клеток, предварительно охлажденных на льду, добавляли 200 нг плазмиды pKD46-Gm. Смесь переносили в стерильную холодную кювету с расстоянием между пластинами 2 мм. Параметры электропоратора: напряжение 2.5 кВ, емкость 25 мкФ, сопротивление 200 Ом. Сразу после трансформации к клеткам добавляли 800 мкл среды LB. Клетки инкубировали 2 ч на качалке при 37°C. После чего клетки осаждали центрифугированием в течение 1 мин (13000 об./мин), ресуспендировали в 100 мкл суспензии и осуществляли посев газонем. Отбор трансформантов проводили на среде LA с гентамицином. Посевы инкубировали при температуре 30°C в течение 24 ч. При индукции экспрессии рекомбиназы фага λ Red с плазмиды pKD46-Gm целевой ген был замещен

Таблица. Список праймеров для проведения ПЦР

Праймер	Нуклеотидная последовательность
Gcd_KM_fw	ATGTCACGGGTATCCCGAACACTCAATTTGTTAACGCTGCGTGTTAGGCTGGAGCTGCTTC
Gcd_KM_rev	TTACGGCAGCGCATAAGCGATAAGCGTATCGCCCATTTTAGTATGGGAATTAGCCATGGTCC
Gcd_up_fw2	AGCGCTTACACTTGCACTGA
Gcd_down_rv2	GACGGGGGCGTGATTTTACA
Gcd_KM_fw	ATGTCACGGGTATCCCGAACACTCAATTTGTTAACGCTGCGTGTTAGGCTGGAGCTGCTTC
Gcd_KM_rev	TTACGGCAGCGCATAAGCGATAAGCGTATCGCCCATTTTAGTATGGGAATTAGCCATGGTCC

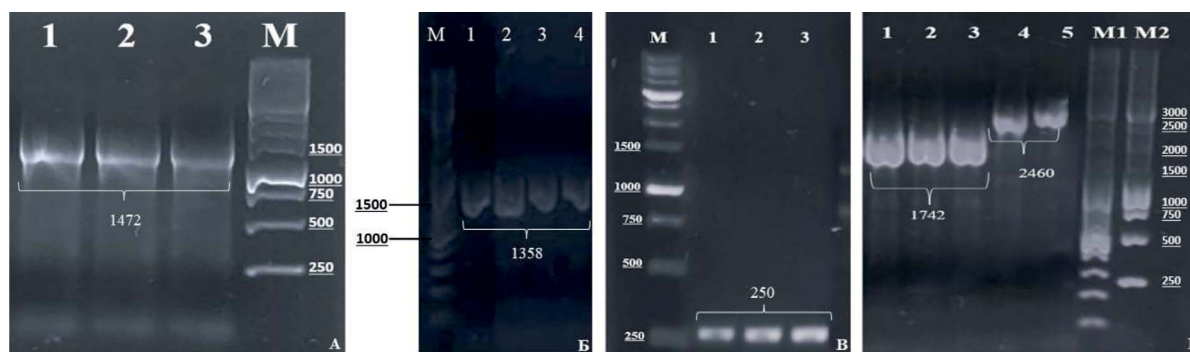


Рис. 1. Электрофорез ПЦР-продуктов на этапах получения мутантного штамма *P. brenneri* 3.2 Δ*gcd*: а – амплификаты гена *kan*, фланкированного участками целевого гена *gcd* (1–3), М – маркер Sky-High (“Biolabmix”, Россия); б – ПЦР-продукты с колоний трансформантов, устойчивых к канамицину (1–4) с использованием внутренних (к участку гена *kan*) и внешних (к участку гена *gcd*) праймеров, М – маркер DNA Ladder (“Biolabmix”, Россия); в – ПЦР-продукты с геномной ДНК безмаркерных делеционных штаммов (1–3) с использованием фланкирующих праймеров к целевому гену *gcd*, М – маркер Step 100 Long (“Biolabmix”, Россия); г – ПЦР-продукты с геномной ДНК канамицин-резистентных (1–3) и нативных (4–5) колоний с использованием фланкирующих праймеров к целевому гену *gcd*, М1 – маркер DNA Ladder, М2 – маркер Sky-High.

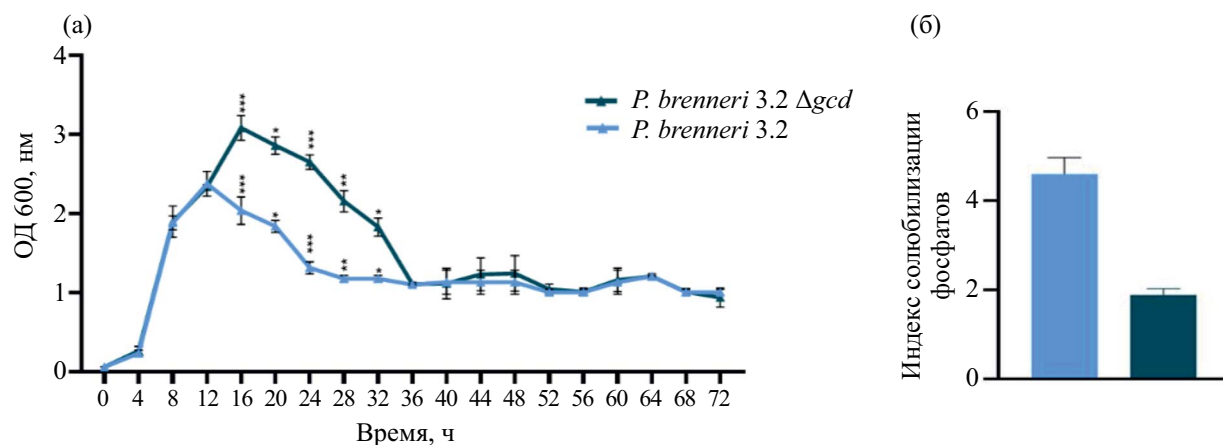


Рис. 2. а – Рост нативного штамма *P. brenneri* 3.2 и его мутанта по гену, вовлеченному в синтез глюконовой кислоты, на среде LB. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; б – способность нативного и мутантного штаммов солиubilизировать трикальцийфосфат.

на кассету устойчивости к канамицину в процессе гомологичной рекомбинации. Колонии мутантов, устойчивых к канамицину, верифицировали с помощью ПЦР с использованием внутренних (к участку гена *kan*) и внешних (к участку гена *gcd*) праймеров. Размер ПЦР-продуктов составил 1358 п.н. (рис. 16).

На последнем этапе получали безмаркерные мутантные штаммы *P. brenneri* 3.2 Δgcd . Полученные мутанты трансформировали хелперной плазмидой pCP20, кодирующей флиппазу. Флиппаза обеспечивала эксцизию гена *kan* из хромосомы, в результате на месте инактивированного гена оставался “шрам” с одним FRT-сайтом. Полученные мутанты генотипировали с использованием фланкирующих праймеров к гену *gcd*. При этом ПЦР-продукт с геномной ДНК безмаркерных мутантных колоний *P. brenneri* 3.2 Δgcd имел размер 250 п.н. (рис. 1в), с геномной ДНК колоний, устойчивых к канамицину *P. brenneri* 3.2 Δgcd KmR – 1742 п.н. и с геномной ДНК нативного штамма *P. brenneri* 3.2 WT – 2460 п.н. (рис. 1г). Получение безмаркерного делеционного штамма *P. brenneri* 3.2 Δgcd было подтверждено с помощью секвенирования.

Для элиминации плазмиды pCP20 колонии высевали на среду LB без антибиотиков, инкубировали на качалке при 30°C в течение 2 ч, а затем при 42°C в течение ночи. Далее культуру разводили в 10^6 раз и высевали 50 мкл суспензии на среду LA без антибиотиков. Инкубировали в течение ночи при 30°C. Затем колонии высевали на три среды: LA с канамицином, LA с ампициллином и LA без антибиотиков, чтобы убедиться, что плазида pCP20 удалась.

Мутантный штамм *P. brenneri* 3.2 Δgcd отличался по скорости роста от нативного штамма *P. brenneri* 3.2: максимальный прирост биомассы отмечен

на 16 и 12 ч культивирования соответственно, после чего наблюдали снижение накопления биомассы (рис 2а).

Полученный делеционный мутант *P. brenneri* 3.2 Δgcd исследовали на способность мобилизовать труднорастворимый фосфор. Как нативный, так и мутантный штаммы были способны расти и образовывать гало-зоны на среде, содержащей трикальцийфосфат в качестве единственного источника фосфора. Однако индекс солиubilизации фосфатов у мутантного штамма *P. brenneri* 3.2 Δgcd был в 2.5 раза ниже, чем у нативного штамма *P. brenneri* 3.2 WT (рис 2б). Инактивация гена глюкозодегидрогеназы *gcd* в геноме штамма *P. brenneri* привела к снижению способности солиubilизировать фосфаты, но к неполному ингибированию. Вероятно, полученные результаты объясняются наличием в геноме *P. brenneri* альтернативных путей солиubilизации фосфатов, поскольку помимо глюконовой кислоты штамм *P. brenneri* 3.2 способен продуцировать щавелевую, яблочную, муравьиную и другие органические кислоты (Suleimanova et al., 2023).

Таким образом, нами получен безмаркерный мутантный штамм *P. brenneri* 3.2 Δgcd с делетированным геном глюкозодегидрогеназы, ответственным за продукцию глюконовой кислоты бактериями. Последующая оценка вклада гена *gcd* в ISR-прайминг будет исследована путем анализа взаимодействия нативных и модифицированных штаммов ризобактерий с растениями.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность к.б.н. Гиляевой А.Г. за предоставление плазмид для инактивации гена.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-16-00138, <https://rscf.ru/project/22-16-00138>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бульмакова Д. С., Шагиева Г. И., Иткина Д. Л., Ленина О. А., Шарипова М. Р., Сулейманова А. Д. Антагонистические штаммы *Pantoea brenneri* как средства защиты растений // Микология и фитопатология. 2023. Т. 57. С. 352–361.
- Иткина Д. Л., Сулейманова А. Д., Шарипова М. Р. *Pantoea brenneri* AS3 и *Bacillus ginsengihumi* M2.11 как потенциальные агенты биоконтроля и стимуляторы роста растений // Микробиология. 2021. Т. 90. С. 204–214.
- Itkina D. L., Suleimanova A. D., Sharipova M. R. *Pantoea brenneri* AS3 and *Bacillus ginsengihumi* M2.11 as potential biocontrol and plant growth-promoting agents // Microbiology (Moscow). 2021. V. 90. P. 210–218.
- Datsenko K. A., Wanner K. A. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 6640–6645.
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids // J. Mol. Biol. 1983. V. 166. P. 557–580.
- Kumar A., Verma J. Does plant-microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review // Microbiol. Res. 2018. V. 207. P. 41–52.
- Park J. H., Bolana N., Megharaj M., Naidua R. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil // J. Hazard. Mater. 2011. V. 185. P. 829–836.
- Paul D., Sinha S. N. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India // Ann. Agrar. Sci. 2017. V. 15. P. 130–136.
- Rawat P., Das S., Shankhdhar D., Shankhdhar S. C. Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake // J. Soil Sci. Plant Nutr. 2020. V. 21. P. 49–68.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Suleimanova A. D., Beinbauer A., Valeeva L. R., Chastukhina I. B., Balaban N. P., Shakhov E. V., Greiner R., Sharipova M. R. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1 // Appl. Environ. Microbiol. 2015. V. 81. P. 6790–6799.
- Suleimanova A., Bulmakova D., Sokolnikova L., Egorova E., Itkina D., Kuzminova O., Gizatullina A., Sharipova M. Phosphate solubilization and plant growth promotion by *Pantoea brenneri* soil isolates // Microorganisms. 2023. V. 11. Art. 1136. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051136>

Inactivation of the gene responsible for the synthesis of gluconic acid in the genome of *Pantoea brenneri*

A. D. Suleimanova*, L. V. Sokolnikova, D. S. Bulmakova,
E. A. Egorova, M. R. Sharipova

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan 420008, Russia
*e-mail: Aliya.kzn@gmail.com

Abstract. To study the contribution of the glucose dehydrogenase (*gcd*) gene product to the development of ISR priming in plants, a strain of *Pantoea brenneri* 3.2 with a deletion of the *gcd* gene was obtained. Using the Lambda Red (λ Red) phage recombination system, we obtained a marker-free mutant strain of *P. brenneri* 3.2 Δ *gcd*. Inactivation of the *gcd* glucose dehydrogenase gene resulted in a 2.5-fold decrease in the strain's ability to solubilize tricalcium phosphate on the solid nutrient medium NBRIP.

Keywords: ISR priming, phosphate solubilization, *Pantoea brenneri*