

Влияние АЦК-деаминазной активности на конкурентоспособность эпифитного симбионта растений *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831

Екимова Г.А., Агафонова Н.В.

ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН»
(Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН)
г. Пушкино; ekimova_g@mail.ru

Изучение микробно-растительных взаимодействий — одно из быстро развивающихся направлений в современной биологии. Ранее исследования микрофлоры растений в основном были связаны с почвенными и ризосферными микроорганизмами-симбионтами растений. В настоящее время все больше внимания уделяется эпифитным микроорганизмам филлосферы (Vorholt, 2012). Постоянными ее обитателями филлосферы являются аэробные метилотрофные бактерии, использующие окисленные и замещенные производные метана в качестве источников углерода и энергии. Для них характерно чрезвычайное разнообразие заселяемых растений, что говорит о многочисленности экологических стратегий, реализуемых данными бактериями, а также их широких адаптационных возможностях. Особую роль в фитосимбиозе занимает способность бактерий к деградации 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) — предшественника в биосинтезе этилена. Этилен является одним из основных фитогормонов, сверхпродукция которого приводит к запуску программы старения растений, опаданию листьев и созреванию плодов. Соответственно, бактерии, обладающие ферментом АЦК-деаминазой, могут использовать АЦК в качестве дополнительного источника углерода и энергии при этом способствуя задержке старения и повышению устойчивости растений к различным стрессовым воздействиям (Glick, 2013).

При помощи гомологичной рекомбинации был получен мутант *Methylobacterium radiotolerans* с делецией в гене АЦК-деаминазы (*acdS*). Он был комплементирован как исходным вектором p7A-29, служившим отрицательным контролем, так и плазмидой p7A-36 несущей нокаутированный ген. Мутантов и их комплементированные варианты тестировали на наличие АЦК-деаминазной активности при росте либо в присутствии, либо без индуктора — 2-аминоизобутирата, аналога АЦК. Штамм *M. radiotolerans* Δ *acdS* не обладал активностью АЦК-деаминазы как с индуктором, так и без него, в отличие от исходного штамма, в котором активность фермента проявлялась в присутствии индуктора. Комплементированный исходным вектором мутант Δ *acdS*/p7A-29 не обладал активностью АЦК-деаминазы, аналогично бесплазмидному мутанту. Комплементированный мутант Δ *acdS*/p7A-36 проявлял очень высокую ферментативную активность независимо от индуктора, так как ген *acdS* в нём находится под контролем сильного конститутивного промотора метанолдегидрогеназы *mxhF*.

В дикие штаммы, делеционных мутантов, а также их комплементированные варианты был введен ген *gfp* под контролем промоторов P_{mxhF} с помощью вектора pUC18T-mini-Tn7T (Choi et al., 2005), в котором клонировали искусственный оперон, содержащий ген *gfp* под контролем промотора метанолдегидрогеназы. Вектор pUC18T-mini-Tn7T содержит минитранспозон Tn7, интегрирующийся в хромосому Грам-отрицательных бактерий в специфический сайт рядом с геном *glmS*, кодирующего глюкозамин-синтетазу. Транспозиция исключает элиминацию ДНК, содержащей ген *gfp* из клеток в отсутствие селективного давления.

Оценку конкурентоспособности различных штаммов *M. radiotolerans* проводили при росте в жидкой среде с метанолом и АЦК в качестве дополнительного источника углерода/азота и единственного источника азота. Мутант, не способный к синтезу АЦК-деаминазы, штамм дикого типа, а также сверх-продуцент АЦК-деаминазы, штамм комплементированный исходным вектором и их *gfp*-меченые варианты попарно были

культивированы совместно в соотношении один к одному. Далее путем серийных разведений и высева на агаризованную среду в ходе роста культуры было определено соотношение светящихся в УФ-излучении колоний к несветящимся. Показано, что наибольшим преимуществом над другими, в том числе штаммом дикого типа обладал комплементированный мутант с повышенным синтезом АЦК-деаминазы. Между штаммами *ΔacdS/p7A-36* и JCM2831 в отсутствие других источников азота наблюдался наибольший разрыв в соотношении числа КОЕ (2,53:1), при этом мутант с делецией в гене *acdS* был не способен к росту на этой среде. В контроле штамм *ΔacdS/p7A-36* также превалировал, но незначительно. Следует отметить, что в клетках комплементированного мутанта ген *acdS* находится под контролем промотора метанолдегидрогеназы и синтезируется конститутивно, что значительно ускоряет потребление АЦК в случае ее появления.

Для микроорганизмов растения являются средой обитания, которая заселяется на конкурентной основе, благодаря мобилизации адаптивных возможностей, выработанных в процессе эволюции. Полученные в экспериментах с мутантами *in vitro* данные указывают на то, что АЦК-деаминазная активность является значимым конкурентным преимуществом бактерий для роста в меняющихся условиях и при возможном дефиците питательных веществ. С помощью *gfp*-меченых штаммов возможно проведение в дальнейшем длительные экспериментов *in vivo* на растениях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00998 мол_а

Литература

1. Choi K.-H., Gaynor J.B., White K.G., Lopez C., Bosio C.M., Karkhoff-Schweizer R.R., Schweizer H.P. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system // Nat. Meth. 2005. V. 2. P. 443-448.
2. Vorholt J.A. Microbial life in the phyllosphere // Nat. Rev. Microbiol. 2012. V. 10. № 12. P. 828–840.
3. Glick B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world // Microbiological research. – 2014. – Т. 169. – №. 1. – С. 30-39.