

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНОМА И ПРОТЕОМА БАКТЕРИОФАГА ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Сутьдина Екатерина Владимировна, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Богданов Ильгизар Исмаилович, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Абдурахманов Ильнур Мынгалиевич, аспирант кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 8(8422)55-95-47

e-mail: feokna@yandex.ru

Ключевые слова: *Pseudomonas syringae*, бактериофаг, капсидные белки, молекулярная, масса, аминокислоты, протеом, ДНК

В статье представлены результаты исследований по изучению геномных и протеомных характеристик производственно-перспективного бактериофага Ps.s-27 УлГАУ, специфичного для фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae*. Результаты секвенирования позволили установить размер ДНК изучаемого бактериофага, составившего 24690 п.н. Эти данные соответствуют результатам, полученным при постановке электрофореза (относительная погрешность $\delta = 0.0383$). Анализ соответствия секвенсовых данных, аннотированным в GeneMark Prokaryotic V 3.26. протеомам, выявил 28 открытых рамок считывания. Проведен анализ локализации исследуемых протеинов и определено, что для бактериофага Ps.s-27 УлГАУ капсидные белки составляют 61,2%. Были систематизированы данные, характеризующие 28 белков изучаемого бактериофага, обобщающие информацию по количеству аминокислот, молекулярной массе, изоэлектрической точке и брутто-формуле. При проведении для Ps.s-27 УлГАУ выявлено три димера (*gene_3*, *gene_17* и *gene_23*) с молекулярной массой 45,0, 49,1 и 40,9 kDa, что может свидетельствовать об их потенциальной роли в структуре капсида изучаемого фага. Полученные данные позволяют продолжить составление паспорта биологических свойств производственно-перспективного бактериофага Ps.s-27 УлГАУ, который входит в состав биопрепарата, направленного действия.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Ульяновской области РФ в рамках научного проекта № 19-44-730014.

Введение

Бактерии *Pseudomonas syringae* считаются одной из десяти важнейших фитобактерий, имеющих и экономическое значение [1]. Бактерии *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* вызывают заболевания груш, айвы, сирени, сливы,

фасоли, капусты белокочанной, подсолнечника, томатов, земляники, сахарной свеклы, киви [2 - 4]. Для вышеназванных болезней основной стратегией защиты, используемой в Европе, является комплексный подход к борьбе с вредителями (IPM), основанный на передовых методах

ведения сельского хозяйства, устойчивых культур и обработках медью. Однако эффективность ИРМ может быть снижена из-за появления новых бактериальных штаммов [5], а сортов, устойчивых к наиболее патогенным штаммам *Pseudomonas syringae*, не существует [6]. Более того, обработка медью носит только профилактический характер и, как было доказано, вредна для киви и окружающей среды, а их интенсивное использование отвечает за отбор штаммов, устойчивых к меди [7].

Поэтому биоконтроль на основе бактериофагов следует изучать как устойчивую альтернативу. Разработка и применение биологического препарата на основе специфичных бактериофагов открывает перспективу контроля распространения фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae* [8]. Наличие подобного препарата в арсенале аграриев позволит в перспективе разработать экологически безопасную стратегию защиты растений, основанную на использовании стимуляторов роста растений биологического происхождения и специфических бактериофагов для деконтаминации семенного материала, профилактики и блокирования инфекций бактериального происхождения [9]. Для рекомендации использования фаговых биопрепаратов в растениеводстве необходимо провести исследования генома и протеома каждого кандидатного бактериофага [10].

Материалы и методы исследований

Исследуемый кандидатный бактериофаг Ps.s-27 УЛГАУ вирулентный (изолирован из пробы почвы) характеризовался следующими показателями: литическая активность - $1,0 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/

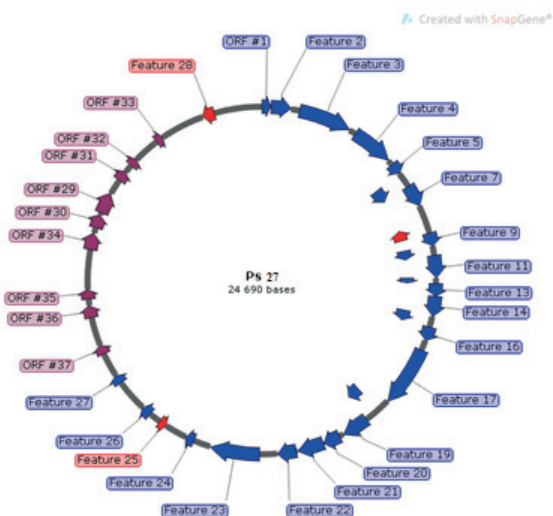


Рис. 1 - Круговая диаграмма ORF для бактериофага Ps.s-27 УЛГАУ

мл (установлено по методу Грацио), 10^{-8} (определено по методу Апельмана); специфичен для *Pseudomonas syringae*, не вызывает лизиса бактериальных культур *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Echerichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* [11].

Для получения полноразмерных нуклеотидных последовательностей генома Ps.s-7 УЛГАУ применяли метод полупроводникового секвенирования на платформе IonTorrent (Thermo Fisher Scientific, США), используя набор реагентов Ion PI Sequencing 200 Kit v3 на чипе Ion PI ChipKit v2 секвенатора IonProton (ThermoFisherScientific, США) с учетом рекомендаций производителя. Оценку распределения длин фрагментов библиотек и их концентрацию проводили, используя Bioanalyzer 2100 и набор реагентов Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, США) по протоколам производителей. Клональную амплификацию библиотек, предварительно эквимоларно пулированных, осуществляли с применением набора Ion PI Template OT2 200 Kit v3 (Thermo Fisher Scientific, США) по рекомендациям производителя. Сборка фагового генома de novo осуществлялась с применением ридов (качество прочтения ну-

FASTA definition line: Pseudomonas phage Ps-27, complete genome
Predicted genes

Gene #	Strand	LeftEnd	RightEnd	Gene Length	Class
1	+	9	203	195	1
2	+	215	661	447	1
3	+	863	2068	1206	1
4	+	2227	3183	957	2
5	+	3309	3569	261	1
6	+	3570	3935	366	1
7	+	3932	4429	498	1
8	-	4826	5092	267	1
9	+	5092	5382	291	1
10	+	5379	5615	237	1
11	+	5612	6115	504	1
12	+	6112	6237	126	1
13	+	6248	6532	285	1
14	+	6535	6990	456	1
15	+	6983	7246	264	1
16	+	7243	7551	309	1
17	+	7792	9177	1386	1
18	+	9487	9822	336	1
19	+	9819	10427	609	1
20	+	10534	10914	381	1
21	+	10927	11529	603	1
22	+	11569	11991	423	2
23	+	12400	13524	1125	1
24	+	13917	14117	201	2
25	-	14633	14797	165	1
26	+	15073	15297	225	1
27	+	16044	16244	201	1
28	-	23335	23610	276	2

Рис. 2 - Анализ соответствия сиквенсовых данных бактериофага Ps.s-27 УЛГАУ аннотированным фаговым (вирусным) и бактериальным протеомам

клеотидов - не ниже Q20, длина - не менее 50 оснований).

Для сборки генома использовали программное обеспечение Newbler (Roche/454 GS-FLX). Анализ соответствия сиквенсовых данных аннотированным фаговым (вирусным) и бактериальным протеомам проводили, применяя программное обеспечение GeneMark Prokaryotic V 3.26. В исследовании использовалась информация, полученная из международных баз данных GeneBank, DDBJ, EMBL. Протеомный анализ проводили, применяя ресурсы систем SnapGene Viewer v.4.1.7, Expasy (<https://web.expasy.org>), BASys (Bacterial Annotation System; <https://www.basys.ca>).

Результаты исследований

В результате проведенного секвенирования и последующего биоинформационного анализа нами были определены нуклеотидные последовательности бактериофага Ps.s-27 УЛГАУ для последующего анализа in-silico. По данным секвенирования размер ДНК бактериофага Ps.s-

```
SeqID: Pseudomonas syringae phage Ps 27
Analysis Report:
CYSVM- CytoplasmicMembrane
CytoSVM- Unknown
ECSVM- Extracellular
ModHMM- CytoplasmicMembrane
Motif- Unknown
OMPmotif- Unknown
OMSVM- OuterMembrane
PPSVM- Periplasmic
Profile- Unknown
SCL-BLAST- Unknown
SCL-BLASTe- Unknown
Signal- Unknown
Localization Scores:
Extracellular 6.12
Periplasmic 3.01
CytoplasmicMembrane 0.28
OuterMembrane 0.59
Cytoplasmic 0.00
Final Prediction:
Unknown (This protein may have multiple localization sites.)
```

Рис. 3 - Анализ локализации исследуемых протеинов бактериофага Ps.s-27 УЛГАУ

27 УЛГАУ составила 24690 п.н., что также соответствует данным фореграммы (при относительной погрешности $\delta = 0.0383$). Определены аминокислотные последовательности аннотированных белков со стандартным генетическим кодом стартовых аминокислот ATG, GTG и TTG. Далее был проведен анализ соответствия сиквенсовых

Таблица 1

Характеристика протеинов бактериофага *Pseudomonas syringae* Ps.s-27 УЛГАУ

условное название протеина	кол-во аминокислот	брутто-формула	молекулярная масса, Da	изоэлектрическая точка
gene_1 GeneMark.hmm 64_aa + 9 203	64	$C_{302}H_{506}N_{84}O_{92}S_1$	6817.86	10.06
gene_2 GeneMark.hmm 148_aa + 215 661	148	$C_{757}H_{1190}N_{212}O_{225}S_5$	17021.23	6.1
gene_3 GeneMark.hmm 401_aa + 863 2068	401	$C_{1998}H_{3195}N_{603}O_{567}S_9$	45024.24	10.37
gene_4 GeneMark.hmm 318_aa + 2227 3183	318	$C_{1566}H_{2579}N_{481}O_{478}S_5$	35953.65	10.08
gene_5 GeneMark.hmm 86_aa + 3309 3569	86	$C_{430}H_{684}N_{122}O_{121}S_5$	9659.13	9.17
gene_6 GeneMark.hmm 121_aa + 3570 3935	121	$C_{599}H_{976}N_{182}O_{172}S_6$	13671.71	10.53
gene_7 GeneMark.hmm 165_aa + 3932 4429	165	$C_{822}H_{1315}N_{253}O_{236}S_6$	18710.25	9.96
gene_8 GeneMark.hmm 88_aa - 4826 5092	88	$C_{454}H_{686}N_{132}O_{130}S_7$	10297.59	7.76
gene_9 GeneMark.hmm 96_aa + 5092 5382	96	$C_{426}H_{684}N_{126}O_{148}S_2$	10002.91	4.25
gene_10 GeneMark.hmm 78_aa + 5379 5615	78	$C_{372}H_{600}N_{108}O_{120}S_4$	8633.68	4.59
gene_11 GeneMark.hmm 167_aa + 5612 6115	167	$C_{814}H_{1299}N_{237}O_{238}S_7$	18437.99	10.1
gene_12 GeneMark.hmm 41_aa + 6112 6237	41	$C_{189}H_{309}N_{53}O_{63}S_2$	4395.94	5.32
gene_13 GeneMark.hmm 94_aa + 6248 6532	94	$C_{424}H_{678}N_{126}O_{131}S$	9829.1	7.74
gene_14 GeneMark.hmm 151_aa + 6535 6990	151	$C_{737}H_{1134}N_{214}O_{211}S_6$	16560.65	9.09
gene_15 GeneMark.hmm 87_aa + 6983 7246	87	$C_{394}H_{643}N_{115}O_{122}S_4$	9071.31	9.76
gene_16 GeneMark.hmm 102_aa + 7243 7551	102	$C_{531}H_{805}N_{141}O_{152}S_6$	11788.36	4.91
gene_17 GeneMark.hmm 461_aa + 7792 9177	461	$C_{2164}H_{3426}N_{634}O_{656}S_{10}$	49141.07	6.26
gene_18 GeneMark.hmm 111_aa + 9487 9822	111	$C_{519}H_{838}N_{162}O_{159}S_{11}$	12243.92	9.53
gene_19 GeneMark.hmm 202_aa + 9819 10427	202	$C_{964}H_{1549}N_{291}O_{284}S_{10}$	22080.11	9.44
gene_20 GeneMark.hmm 126_aa + 10534 10914	126	$C_{610}H_{942}N_{180}O_{189}S_9$	14109.71	5.14
gene_21 GeneMark.hmm 200_aa + 10927 11529	200	$C_{940}H_{1497}N_{255}O_{271}S_6$	20898.97	10.16
gene_22 GeneMark.hmm 140_aa + 11569 11991	140	$C_{622}H_{1032}N_{178}O_{189}S_5$	14188.3	9.89
gene_23 GeneMark.hmm 374_aa + 12400 13524	374	$C_{1804}H_{2886}N_{510}O_{554}S_{11}$	40936.17	4.75
gene_24 GeneMark.hmm 66_aa + 13917 14117	66	$C_{321}H_{520}N_{98}O_{93}S_1$	7272.27	10.41
gene_25 GeneMark.hmm 54_aa - 14633 14797	54	$C_{304}H_{506}N_{91}O_{90}S_4$	7162.21	8.62
gene_26 GeneMark.hmm 74_aa + 15073 15297	74	$C_{340}H_{558}N_{98}O_{112}S_2$	7874.82	4.19
gene_27 GeneMark.hmm 66_aa + 16044 16244	66	$C_{325}H_{543}N_{95}O_{94}S_3$	7381.59	9.51
gene_28 GeneMark.hmm 91_aa - 23335 23610	91	$C_{455}H_{718}N_{124}O_{141}$	10181.37	4.46

Аминокислотные последовательности аннотированных белков со стандартным генетическим кодом для бактериофага Ps.s-27 УлГАУ

условное название протеина	стандартный генетический код
gene_1 GeneMark.hmm 64_aa + 9 203	MTETSVKLHFQALAKIASPEALVTDVAFSGVGVKATQELAЕКVEQALEAPAKKTRKPRTPKAAQ
gene_2 GeneMark.hmm 148_aa + 215 661	MSKVESVILNTPFRPTDYNEKAMQAVLDESYLQVDVKKDGVRLNLCVSGRAPLVNVEWLSREGKRFALVQVQLOGDERWSKFYNPHLGEALFNDEG FMLDAELILLDDHGNKCKNTSGDLRRKDEPVLNRRVYVFDVSVGHLL
gene_3 GeneMark.hmm 401_aa + 863 2068	VPLSDTTIRTAКPRDKLYRLTDANGLCEVPTGSKLWRYRYRFGGAKMLALGAYPSVTLKARQLRDGARQLLEGTDPGEQKTKAQKQVGLTF ETLAREWFAYNAPRWADSTTYKAKLYLNDLVPVIGSRPVKAITRPDLVELVRKVEARGTLNAAGKIRQWLHQIFRYGLAKGVVDANPATDLSVVAAPP KAARHHPHVTFALPEMLAKSEAAANIHSRHAIRLLTAVRPGELRQAPWAEFDLERATWTIPAERMKARRPHVPLPRQAVAILRQLQKITGRYELV FAGANPQRPMSENTVNKALRHMGYEGRQGTGHGFRHLLSTELNGRGYNKDWERQLAHGDTDEIRGTYNHAAYVEQRREMMQAWADSIDALCAG ANVVSIRRA
gene_4 GeneMark.hmm 318_aa + 2227 3183	MLQPGEYIPLERAIVSLKRDPVLAIAKAINSVDPAEFNRITGTSKYGDSIPGFAITYGQLGSYLNATVTRVLSVLIETVEGVIESHVAVNREWLL KQREHAARQPEVREIELRSYASHGATVPIIQLVDDPKAARAELRKLNIERSLVIRPDDERDAEIERLIQLEASTAREKSIATVDASEKAIKMLT RENDQLRKERSSTQLPTASIAIATKPKSPKRLSNVEMRNEKARACQAVKVERATSLWRHADYAKHRTTDMVNVIRRLADSEPDWNLPKNDAAALR WISSAPEFAKRPGRPRKEK
gene_5 GeneMark.hmm 86_aa + 3309 3569	MTAITHIHTPAKQAVLAHGDNPPIRFIKRQAVEGITGLSCTEYIRRIAADNFKQVMLGPKCVVWVEAEIYSWMNDRIAESREVA
gene_6 GeneMark.hmm 121_aa + 3570 3935	MKKSQPLYQQTSPSQGDITTPAPASKAPSKIARVLEHMLYDGLIRFEAERLGDHCLHSTISSLANGYGLKFRQLERVPNHWGEPCTVTRYTLPASERR RARNVLLMLCKPLKQKQVAA
gene_7 GeneMark.hmm 165_aa + 3932 4429	MNAIVLIRSKGEARADSRVLAELQGVKAKNTLGLIERVIGKFERFVGVVPEFETEKPGAGTAGGRPERFALLNEDQCYFLLSLRNTDRVVELKADLIMAFRE ARYGHACQTLKARKMEASNGRRALHWRYDKPGVYAHVAHLREQLKPLGMEDARHDGYAHDRR
gene_8 GeneMark.hmm 88_aa - 4826 5092	LRTTKYCAQFDLGPQRVNAAGEWMAARRLHQWNNFMDQDAFLDQDGKTYQVAKQLFTAGADFWDQISGRIHCVPPTDSRERAMVMWCE
gene_9 GeneMark.hmm 96_aa + 5092 5382	MNNPVRTIQEIAHDALEDLGSQVVLGKLESLPYAALADNGTSQHVRLVDIAWNLAADGANTASGDFFAIGKALSGCASQNAQSENVARDESEKVP
gene_10 GeneMark.hmm 78_aa + 5379 5615	MTRSRELYNNIDAHLRVIRGLAVILMDNDCFKEATGHPAQLDAENEMSIHEAVHLLSDQAQHELIELVDLGGTPA
gene_11 GeneMark.hmm 167_aa + 5612 6115	MKTSIPKSRRLPKSKQIGLRSKPEGKWAWDRLPFVGDHGRQSFWDVPMLGHHGGIDAGRAMALVLYKYVRDHRSDIHNASGILSSILVAMDAK KPSTEDEAASLQGGQRTGFMNEICSWIKAAERLSTLDAIPERSFVQQAQNEGLVTRDAAFMASIESKVKP
gene_12 GeneMark.hmm 41_aa + 6112 6237	MTIAKFQDGGALMSEQGIVHLDIDEPETAKSPKHRTGALT
gene_13 GeneMark.hmm 94_aa + 6248 6532	MKIQNGASASTGSACLKAAELFYVTHPKVPKALLGPFLEADAECGRVVMRSADAQVTAACLEVAIDDITHWHGVNNGQVCRAFAGADRQGGGQ
gene_14 GeneMark.hmm 151_aa + 6535 6990	MVHHYTHEHHLLPLITSGSLRPNNAGAHEPPLVWFSKAQRWEGTATKMVMGADGPRLLTFAEQLAIEFGCARFSLPADDARLMSWVDACKYAGIT STTRRKLESVGRKRGASPINWFAIAGDVLADVRLQRFDDGAAWVGYSSAEGVTHG
gene_15 GeneMark.hmm 87_aa + 6983 7246	MGNVTPIKPKSGGPPTAGAHIDSASYVLLVETLVGFLELRISGEGDQGRHCDSEGTKRPVASTSSGVSQVGVVWTVARFMSARLTLR
gene_16 GeneMark.hmm 102_aa + 7243 7551	LNFLQSGAIAICKWVVEVERILMEEHGLYHGWYKDDGTPGDFCYMAWVHDELQIAARTPEIAEIAKVAQQAIREVGEFSQFRCLDQTDYKIGATW RECH
gene_17 GeneMark.hmm 461_aa + 7792 9177	MEYLLDQHPAEVFAATSRPWHESGAFVLPGRITGSANVRYQASNAQVLFSSRRGELTWQSEVAACKAGNPVTLAIGCSLAGPLLSLVGLGGGVHL VGDSSSGKSLAQIGSSVWGDGPFVFAASWDMTKGGLEIEASSRNDILPLDEIKRADPKRVQEMAYSLANGQKGTMTREREGRAKLSWRLLTSSGE RSLSEHAASGNAHAGAELRMVDVNAAGTRTHRAFDELHGLEGADFHRQLTAVAGAHGHLGPAFVERLVAADDPKGLLSDFDGIRAQFVEDNAQA GRVADRFAVIALAGEMAIAIYGLLPWEPGTALSDCRLLYGEWLSRVGGGNAEDRQLAGIIDFKHGSSRFSDVDAAEVDAKVFNRAGYVWELVAGKRLY LFNKALIEAAHGFGLTRVVKALEVGGALAKRDTDRSRKTKKYRIPAGGSARLYVIDPEAMDSEGGGA
gene_18 GeneMark.hmm 111_aa + 9487 9822	MEQSGRGNAMSLLSGLDHMPAIASTDPKMDSRPRRLVLANPVERTPRLLTSPHASAATATPEWRQTRDQYLTHIMVCRSCYAPTGRHCMVGA DLRACYDATPMEAHQ
gene_19 GeneMark.hmm 202_aa + 9819 10427	MTPSLITRLCNIGMKPGISAATQLITTRRICRAIDQLDVIERGERRRQAGKLAFLPFRQTIAELEERAQEHEQATRSAGAWSALAGFGQSLMFDRE GLAQLGFDQMCDLLSNVPHRHRAIADGDTSLRGVAYLSQLEDSADKRGDEWGAGGPLYRACHAAMIRIFIRECPEDQLPDPFAPGAPFGPKLPPA LSIVGN
gene_20 GeneMark.hmm 126_aa + 10534 10914	MTDQDSNTTGQAPTYRERFAECKIMDFAVAPNMNGGYLVWEVQHVDRDQKVTIDGPFTEDEGGISADLLRGTFRGARAYQAIHCWAWNPDP REKAIRDDAMASRMMLAMQGAEVPTATNDK
gene_21 GeneMark.hmm 200_aa + 10927 11529	MAASVIEYTPVINFKLRGALRQFGKSYPLAVRTPAEAVKALCVQIPGFERVLSNAKSRGLEFAVFRDKNIGESELSFSGTGDITAPVITGSKRGGSLQTHIG SVLIAAAFVLSFTFAAASPLYQVGAAMAIGGIIQMLSPQAGGLKTSAPENTPGYAFGSARNTTASGNPVPCLCYGKRRVGGAAISAAIYAEDQM
gene_22 GeneMark.hmm 140_aa + 11569 11991	MRRIATLFAALLAGCATSPVPIKNNAVPPERVLAYQKDAPGTGTLSTVTRDSGHTGSLCSVGLFVDGKVAALLKPGERVALHVPAQSVVVAAYQGG GICGMGAERQERETIVTGGKVKSYRISTSGDGLDILPTTL
gene_23 GeneMark.hmm 374_aa + 12400 13524	MRLPDFILENLEPILQAWEDFARTIETPGADLSEALRDHAEQMLLAIVSRLTRKQTKREQAASQQAAPLDDDEATAEIHAMTRLMAGFTIDQMVSE YRALRTSVVSWMRQVKDGTPIVNDMTRFHEAIDQALAESVASYRAVEASRNVFLGILGHLRTPLAGAILLADVLRLEGTGARATKVANQIYTSV RRASQIVGDLDLTRCQMGPGIPVKPANIDSLPCERVVEIRAFHPEARILFEAKAPVNGQFDGARVEQVFSNIISNAVHHGNNQLPIKVELETFECAI FTVLNDGPEPIEDVLPFIPLGRFSQRAAIDHGPTLEGLGLFIAEIVASHNGSIDVSSNADQGTVFVVKLPIA
gene_24 GeneMark.hmm 66_aa + 13917 14117	MKTLRSPSEAKTWLRAHGISVQEFARQHDLDPATTYQVLSGAKKGYRGAHRAAIALGIKAEPDLQ
gene_25 GeneMark.hmm 54_aa - 14633 14797	LDLTKPDRESTEVKRANGGFVVIHGVFREGGQVASGNHCKTLETTVETSAWQP
gene_26 GeneMark.hmm 74_aa + 15073 15297	MTDTKLIASLFDRLNQNQLALGAAVEGLSCWVEQRGSADIANNVRALETLDENLVFIRQGIALTAVAGSLGQS
gene_27 GeneMark.hmm 66_aa + 16044 16244	VSVIDCDYLPADKVVFPPELALLIVRKASAMAAAFEEQALDQLTKDARRALSRAEPRRVIEMRL
gene_28 GeneMark.hmm 91_aa - 23335 23610	VGVAVSGEEEPDFRFPVTELADLHEPTYRDSAVALLDIEVAVFVERGGEIEREKGRRVSAKRVRLTQSLPEDWVAVFSQLLPKLEGTGT

данных аннотированным фаговым (вирусным) и бактериальным протеомам. Полученные результаты для бактериофага Ps.s-27 УлГАУ представлены на рис. 1. Системой было выявлено 28 открытых рамок считывания при использовании стандартного генетического кода.

Далее нами был проведен анализ локализации исследуемых протеинов бактериофага Ps.s-27 УлГАУ (рис. 3)

В результате проведенных исследований было определено, что для бактериофага Ps.s-27 УлГАУ капсидные белки составляют 61,2%. Были проведены исследования по анализу сиквенсовой последовательности бактериофага Ps.s-27 УлГАУ с аннотированными в системе NCBI данными. В системе Swiss-Model данные белки были смоделированы для целей определения димерных и полимерных структур, которые могут составлять капсид бактериофага.

В таблице 1 представлены данные, характеризующие количество аминокислот, молекулярную массу с учетом естественного содержания изотопов, изоэлектрическую точку и брутто-формулу, 28 протеинов бактериофага *Pseudomonas syringae* Ps.s-27 УлГАУ.

В таблице 2 представлены аминокислотные последовательности аннотированных белков со стандартным генетическим кодом для бактериофага Ps.s-27 УлГАУ.

В системе Swiss-Model протеины, описанные в таблицах 1и 2, были смоделированы для целей определения димерных и полимерных структур, которые могут составлять капсид бактериофага Ps.s-27 УлГАУ.

По данным проведенного анализа, протеины gene_3, gene_17 и gene_23 являются димерами, что может свидетельствовать об их потенциальной роли в структуре капсида бактериофага Ps.s-27 УлГАУ. Их молекулярная масса 45,0, 49,1 и 40,9 kDa, что также соответствует литературным данным [12-13].

Обсуждение

По данным некоторых исследователей, капсид, например, бактериофага T4 содержит

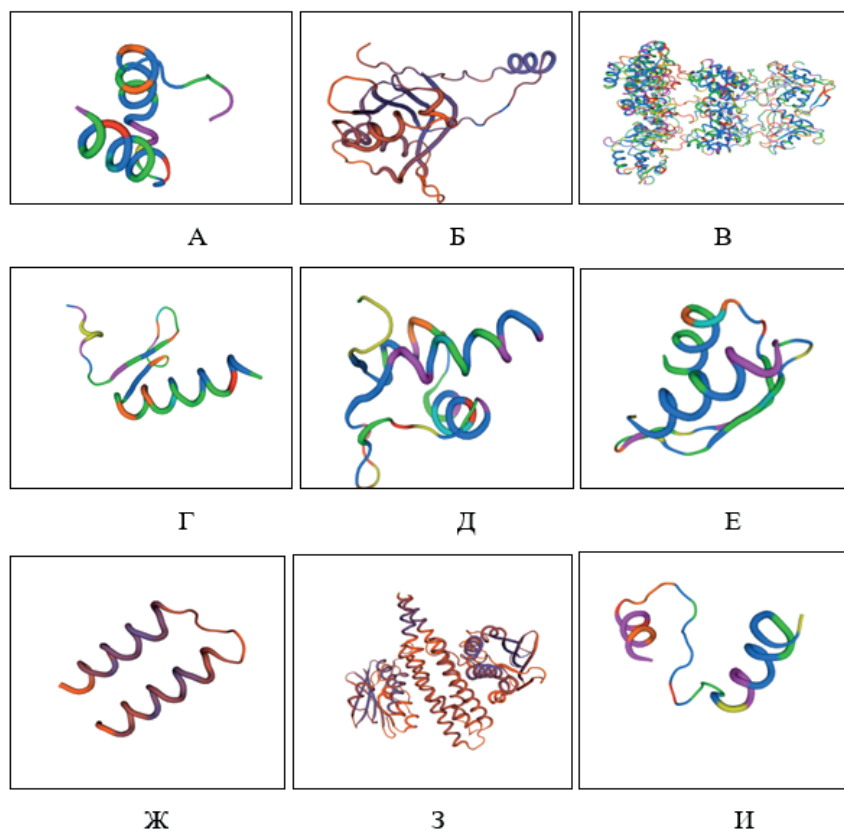


Рис. 4 - 3D модель протеина бактериофага *Pseudomonas syringae* Ps.s-27 УлГАУ (Swiss-Model) А) gene_1; Б) gene_2; В) gene_3; Г) gene_4; Д) gene_5; Е) gene_6; Ж) gene_17; 3) gene_23; И) gene_28

около 580 копий каркасного белка 75 кДа, а портальные субъединицы фагов ф29 и P22 имеют молекулярную массу 36 и 83 кДа соответственно. Кроме того, капсид T4 содержит более 1000 молекул 3 небольших внутренних белков (8–20 кДа) [13-15]. По данным Мирошникова К.А. [16], структурные белки PφI-подобных фагов имеют молекулярную массу – 14-20 кДа. Размер основных белковых последовательностей фага φIBV-PF7A (*Pseudomonas fluorescens*) находится в пределах 16–140 кДа. В состав капсида бактериофага ФЕа2809 (*E. amylovora*) входит довольно большое количество белков – около 10 (масса колеблется в пределах 17–120 кДа) [17]. Таким образом, белки, которые могут являться потенциальными структурными компонентами капсида бактериофага, имеют молекулярную массу от 8 до 140 кДа.

Заключение

По данным проведенного секвенирования бактериофага Ps.s-27 УлГАУ размер ДНК составил 24690 п.н., что соответствует данным электрофореза (при относительной погрешности $\delta=0.0383$). Определены аминокислотные последовательности аннотированных белков

со стандартным генетическим кодом стартовых аминокислот ATG, GTG и TTG. В системе Swiss-Model данные белки были смоделированы для целей определения димерных и полимерных структур, которые могут составлять капсиды бактериофагов. Для Ps.s-27 УлГАУ выявлены три димера - gene_3, gene_17 и gene_23 с молекулярной массой 45, 49,1 и 40,9 kDa.

Полученные данные позволяют продолжить составление паспорта биологических свойств производственно-перспективного бактериофага Ps.s-27 УлГАУ, который входит в состав биопрепарата, направленного действия, активного в отношении фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae*.

Библиографический список

1. Potential of Berry Extracts to Control Foodborne Pathogens / Q. Das, M. R. Islam, M. F. Marcone, K. Warriner, M. S. Diarra // Food Control. – 2017. – V. 73. – P. 650–662.
2. Ferrante, P. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy / P. Ferrante, M. Scortichini // Journal of Phytopathology. – 2009. – V. 157. – P. 768–770.
3. An in vitro *Actinidia* bioassay to evaluate the resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* / F. Wang, J. Li, K.Ye, P. Liu, H. Gong, Q. Jiang, B. Qi, Q. Mo // The Plant Pathology Journal. – 2019. – V. 35. – P. 372.
4. Outbreak of bacterial canker on Hort16A (*Actinidia chinensis* Planchon) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Korea / Y. Koh, G. Kim, J. Jung, Y. Lee, J. N. Hur // New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. – 2010. – V. 38. – P. 275–282.
5. New insights on the bacterial canker of kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) / I. Donati, G. Buriani, A. Cellini, S. Mauri, G. Costa, F. Spinelli // Journal of Berry Research. – 2014. - № 4. – P. 53–67.
6. Young, J. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand / J. Young // The Plant Pathology Journal. – 2012. – V. 94. – P. 5–10.
7. Characterization of Novel Bacteriophages for Biocontrol of Bacterial Blight in Leek Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri* / S. Rombouts, A. Volckaert, S. Venneman, B. Declercq, D. Vandenhuevel, C. N. Allonsius, C. Van Malderghem, H. B. Jang, Y. Briers, J. P. Noben // Frontiers in Microbiology. – 2016. – V. 7. – P. 279.
8. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: Ecology, infection dynamics and disease epidemiology / I. Donati, A. Cellini, D. Sangiorgio, J. L.Vanneste, M. Scortichini, G. M. Balestra, F. Spinelli // Microbial Ecology. – 2020. – V. 80. – P. 81–102.
9. Isolation and characterisation of phages against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* / Y. Yin, P. E. Ni, B. Deng, S. Wang, W. Xu, D. Wang // Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science. – 2019. - № 3 (69). – P. 199–208.
10. Xin, X. F. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen / X. F. Xin, B. Kvitko, S.Y. He // Nature Reviews Microbiology. – 2018. - № 5 (16). – P. 316.
11. Конструирование бактериофагового препарата для биоконтроля *Pseudomonas syringae* в растениеводстве / Д. А. Васильев, А. К. Беккалиева, Н. А. Феоктистова, Е. В. Сульдина // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2020. - № 2 (50). - С. 130-137.
12. Летаров, А. В. Современные концепции биологии бактериофагов / А. В. Летаров. - Москва : Дели, 2020. – 384 с. – ISBN 978-5-604271-24-7.
13. Identification of bacteriophages for biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* / R. A. Frampton, C. Taylor, A. V. H. Moreno, S. B. Visnovsky, N. K. Petty, A. R. Pitman, P. C. Fineran // Applied and Environmental Microbiology. – 2014. – V. 80(7). – P. 2216–2228.
14. Kutter, E. Bacteriophages: biology and applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton, FL : CRC Press, 2005. – 510p.
15. Genome, proteome and structure of a T7-like bacteriophage of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* / R. Frampton, E. Acedo, V. Young, D. Chen, B. Tong, C. Taylo, P. Fineran // Viruses. – 2015. – V. 7. – P. 3361–3379.
16. Molecular biological and genetic principles of selection of therapeutic bacteriophages of bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Staphylococcus* / K. A. Miroshnikov, E. E. Kulikov, O. S. Darbeva, K. A. Lysko, G. M. Ignatiev // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2014. - № 50 (3). – P. 338.
17. Gerasimovich, A. D. Characteristics of bacteriophages of phytopathogenic bacteria / A. D. Gerasimovich, G. I. Novik, E. I. Kolomiets // Microbial technologies: fundamental and applied aspects. – 2012. - № 4. – P. 140–153.

BACTERIOPHAGE GENOME AND PROTEOME STUDY OF PHYTOPATHOGENIC PSEUDOMONAS SYRINGAE BACTERIA

Feoktistova N.A., Suldina E.V., Bogdanov I.I., Abdurakhmanov I.M.
Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ulyanovsk State Agrarian University
432017, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, 1; 8(8422)55-95-47
e-mail: feokna@yandex.ru

Keywords: *Pseudomonas syringae*, bacteriophage, capsid proteins, molecular weight, amino acids, proteome, DNA

The article describes results of the study of genomic and proteomic characteristics of the production-promising *Ps.s-27* bacteriophage of the Ural State Agrarian University, specific for phytopathogenic *Pseudomonas syringae* bacteria. The sequencing results allowed to determine the DNA size of the studied bacteriophage, which amounted to 24690 bp. These data correspond to the results obtained during electrophoresis (relative error $\delta = 0.0383$). Analysis of correspondence of sequence data to annotated proteomes in GeneMark Prokaryotic V 3.26. identified 28 open reading frames. The localization analysis of the studied proteins was carried out and it was determined that capsid proteins accounted for 61.2% for *Ps.s-27* of UIGAU bacteriophage. Data which characterize 28 proteins of the studied bacteriophage were systematized, these data generalize information on the number of amino acids, molecular weight, isoelectric point and gross formula. When performing analysis for *Ps.s-27* UIGAU, three dimers were revealed (gene_3, gene_17, and gene_23) with molecular weights of 45.0, 49.1, and 40.9 kDa, which may indicate their potential role in the capsid structure of the studied phage. The obtained data allow us to continue compiling a passport of biological properties of the production-promising *Ps.s-27* UIGAU bacteriophage, which is a part of a biopreparation with direct effect.

Bibliography:

1. Potential of Berry Extracts to Control Foodborne Pathogens / Q. Das, M. R. Islam, M. F. Marccone, K. Warriner, M. S. Diarra // *Food Control*. – 2017. – V. 73. – P. 650–662.
2. Ferrante, P. Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* as causal agent of bacterial canker of yellow kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) in central Italy / P. Ferrante, M. Scortichini // *Journal of Phytopathology*. – 2009. – V. 157. – P. 768–770.
3. An in vitro *Actinidia* bioassay to evaluate the resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* / F. Wang, J. Li, K.Ye, P. Liu, H. Gong, Q. Jiang, B. Qi, Q. Mo // *The Plant Pathology Journal*. – 2019. – V. 35. – P. 372.
4. Outbreak of bacterial canker on Hort16A (*Actinidia chinensis* Planchon) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Korea / Y. Koh, G. Kim, J. Jung, Y. Lee, J. N. Hur // *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. – 2010. – V. 38. – P. 275–282.
5. New insights on the bacterial canker of kiwifruit (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*) / I. Donati, G. Buriani, A. Cellini, S. Mauri, G. Costa, F. Spinelli // *Journal of Berry Research*. – 2014. - № 4. – P. 53–67.
6. Young, J. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in New Zealand / J. Young // *The Plant Pathology Journal*. – 2012. – V. 94. – P. 5–10.
7. Characterization of Novel Bacteriophages for Biocontrol of Bacterial Blight in Leek Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri* / S. Rombouts, A. Volckaert, S. Venneman, B. Declercq, D. Vandeneuvel, C. N. Allonsius, C. Van Malderghem, H. B. Jang, Y. Briers, J. P. Noben // *Frontiers in Microbiology*. – 2016. – V. 7. – P. 279.
8. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: Ecology, infection dynamics and disease epidemiology / I. Donati, A. Cellini, D. Sangiorgio, J. L.Vanneste, M. Scortichini, G. M. Balestra, F. Spinelli // *Microbial Ecology*. – 2020. – V. 80. – P. 81–102.
9. Isolation and characterisation of phages against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* / Y. Yin, P. E. Ni, B. Deng, S. Wang, W. Xu, D. Wang // *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science*. – 2019. - № 3 (69). – P. 199–208.
10. Xin, X. F. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen / X. F. Xin, B. Kvitko, S.Y. He // *Nature Reviews Microbiology*. – 2018. - № 5 (16). – P. 316.
11. Design of a bacteriophage preparation for biocontrol of *Pseudomonas syringae* in crop production / D. A. Vasiliev, A. K. Bekkalieva, N. A. Feoktistova, E. V. Suldina // *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. – 2020. - № 2 (50). - P. 130–137.
12. Letarov, A. V. *Modern concepts of bacteriophage biology* / A. V. Letarov. - Moscow: DeLi, 2020. - 384 p. – ISBN 978-5-604271-24-7.
13. Identification of bacteriophages for biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* / R. A. Frampton, C. Taylor, A. V. H. Moreno, S. B. Visnovsky, N. K. Petty, A. R. Pitman, P. C. Fineran // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2014. – V. 80(7). – P. 2216–2228.
14. Kutter, E. *Bacteriophages: biology and applications* / E. Kutter, A. Sulakvelidze. - Boca Raton, FL : CRC Press, 2005. – 510p.
15. Genome, proteome and structure of a T7-like bacteriophage of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* / R. Frampton, E. Acedo, V. Young, D. Chen, B. Tong, C. Taylo, P. Fineran // *Viruses*. – 2015. – V. 7. – P. 3361–3379.
16. Molecular biological and genetic principles of selection of therapeutic bacteriophages of bacteria of the genera *Pseudomonas* and *Staphylococcus* / K. A. Miroshnikov, E. E. Kulikov, O. S. Darbeeva, K. A. Lysko, G. M. Ignatiev // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2014. - № 50 (3). – P. 338.
17. Gerasimovich, A. D. *Characteristics of bacteriophages of phytopathogenic bacteria* / A. D. Gerasimovich, G. I. Novik, E. I. Kolomiets // *Microbial technologies: fundamental and applied aspects*. – 2012. - № 4. – P. 140–153.