

of adaptive complex. In order to forecast the favorable periods dates for callusing, seasonal variations of the regeneration coefficient were compared. **Methods.** Variation of the regeneration coefficient was evaluated with respect to repair process efficiency of artificial incisions. **Results.** It was found that the general post-traumatic regenerative ability indirectly of sufficient adaptation of the studied species to seasonal variations, but the testifies regeneration effectiveness of *A. spicata* was higher than that of *A. ovalis*. **Conclusions.** It is supposed that according to regeneration coefficients the dates of the favorable periods for the vegetative propagation and working operations of attendance of shadberry plantations resulting in the injury of vegetative organs can be determined.

Key words: adaptive complex, callusing, incisions, regenerative potential, shadberry.

ПОЛИЩУК Л.В., ЛУКЬЯНЧУК В.В.

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.Л. Заболотного НАН Украины, Украина, Д03680, Киев МСП, ул. Акад. Заболотного, 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net

ПОИСК IN SILICO УАКТИНОМИЦЕТОВ ПАТТЕРНОВ, ГОМОЛОГИЧНЫХ LndJ-БЕЛКУ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912

В настоящее время полностью определено нуклеотидное строение и организация более 2300 бактериальных хромосом и продолжаются работы над последовательностями еще 4000 хромосом. Для многих штаммов продуцентов антибиотиков полностью определено нуклеотидное строение кластеров генов, детерминирующих синтез антибиотиков: например, *Streptomyces kanamyceticus* ATCC12853 (канамицин), *S. antibioticus* Tu 6040 (симоциклин), *Streptomyces* sp. JP95 (гризеоридин), *S. fradia* Tu 2717 (урдамицин) и многие другие. Составлены базы данных об аминокислотном строении бактериальных протеинов, в которые включены последовательности более 50000 соединений, выполняющих различные функции в клетках микроорганизмов (например NCBI Reference Sequence

project). Специалистами разработано ряд компьютерных программ позволяющих изучить in silico информацию, собранную в таких базах [1]. Особый интерес представляет возможность анализа имеющейся в базах данных информации о нуклеотидном строении микробных ДНК для выявления распространения и гомологии генов устойчивости к антибиотикам. Такое изучение имеет как практическое значение, так и теоретический интерес [1, 2]. Это связано с распространением у патогенных и условно патогенных микроорганизмов устойчивости к этой группе лекарственных средств, с наличием у микроорганизмов криптологических кластеров генов биосинтеза антибиотиков и с выявлением существования ортологичных генов резистентности у различных микроорганизмов [2].

Материалы и методы

Проводился in silico анализ доступных Интернет баз данных сервера NCBI (Draft genomes, GenBank, EMBL, DDBJ, PDB и др.) с использованием доступных технических возможностей программы BLAST (Cobalt, Alignmet и др.). Поиск ортологов осуществлялся с помощью программы BLAST с установками по умолчанию. Критерием выбора последовательностей служила гомология с аминокислотной последовательностью LndJ-белка *S. globisporus* 1912 (ABB84178.1, GenBank). Было отобрано 100 позиций, степень идентичности которых

была выше 40 %. При анализе учитывалась так же степень подобия данных аминокислотных последовательностей. Как известно, существует возможность замен одной аминокислоты другой сходной по химическому строению без изменения их вторичной и третичной структуры и нарушения функционирования. Учет возможности прохождения консервативных замен аминокислот повышает степень подобия белковых паттернов на 15–20 %. В работе рассматривались в основном паттерны со степенью подобия указанному паттерну более 70 %.

Результаты и обсуждение

В настоящее время исследователи во многих лабораториях мира (США, Япония, Германия и Украина) уделяют большое внимание все-

стороннему изучению семейства ангуациклиновых антибиотиков ландомицинов. Такое внимание к данной группе антибиотиков связано со

значительной биоцидной активностью некоторых из них. Например установлено, что ландомицины А и Е имеют противораковое и антибактериальное действие. Доказана антиканцерная активность ландомицина Е на 50 линиях опухолевых клеток. На данный момент определен путь синтеза антибиотика ландомицина Е клетками *S. globisporus* 1912; установлены ферменты, обеспечивающие прохождение биосинтетических процессов; выявлено участие регуляторных веществ и изучаются их химические формулы. Установлено строение кластера генов детерминирующих производство ландомицина Е (Lnd-кластер) *S. globisporus* 1912 (34 тпн). Выявлено, что Lnd-кластер образуют более 30 генов, которые выполняют различные функции: регуляторные гены, гены кодирующие ферменты, принимающие участие в биосинтезе антибиотика и гены резистентности к нему. Показано наличие в Lnd-кластере 2 генов (LndJ-гена, 1706 пн и LndW-гена, 981 пн) детерминирующих устойчивость к синтезируемому антибиотику ландомицину Е (DQ275159 и EU128492, GenBank). Кодируемые ими LndJ и LndW белки обеспечивают активный транспорт собственного антибиотика из синтезирующей его клетки (ABB84178 и ABV56007, GenBank). In silico анализ аминокислотного строения LndJ-полипептида *S. globisporus* 1912 показал наличие 14 связывающих элементов и установлено гомологию с протон зависимыми транспортными белками семейства DHA2 суперсемейства основных переносчиков (Major Facilitator Superfamily). Изучение аминокислотной последовательности LndW-белка, кодированного LndW-геном *S. globisporus* 1912 было показано наличие домена АТФ-азы транспортера ABC-типа, обеспечивающего устойчивость к антибиотику.

В литературных источниках сообщается о синтезе различных ландомицинов несколькими культурами – *S. globisporus* 1912, *S. cyanogenus* 136 (исходными штаммами и их производными вариантами) и некультивируемым стрептомицетом, выделенным из почвы Аризоны, США. У данных стрептомицетов определено строение кластера генов синтеза антибиотиков и установлены нуклеотидные последовательности всех кластеров генов.

Особый интерес представляет наличие наибольшей степени идентичности (92 %) из выявленных in silico анализом гомологий ORF29-белка (520 ак - AEM44238, GenBank), микроорганизма с неопределенной таксономической принадлежностью аминокислотному

строению LndJ-белка *S. globisporus* 1912. Степень подобия данных паттернов составляла 95 %. Фрагменты хромосомной ДНК некультивируемого микроорганизма были клонированы в космиде pWEB и один из клонов (AZ97) содержал в составе гибридной конструкции cosAZ97 кластер генов синтеза ландомицина Е – в том числе и *orf29*-ген. Указанный белок ORF29 является ортологом LndJ-белка – он функционирует как трансмембранный антипортер антибиотика ландомицина Е.

Как известно, антрациклиновый антибиотик ландомицин А – это основной компонент комплекса антибиотиков, синтезированных штаммом *S. cyanogenus* S136. В настоящее время полностью определено строение lan-кластера генов, детерминирующего синтез антибиотика ландомицина А у *S. cyanogenus* S136 (AF080235, GenBank). Данный кластер включает 33 гена. В том числе и lanJ-ген (1553 пн), который детерминирует LanJ-белок, обеспечивающий устойчивость к собственным антибиотикам (AAD13557, GenBank). Аминокислотная последовательность LanJ-паттерна идентична на 74 % последовательности LndJ-белка *S. globisporus* 1912. Данный паттерн имел степень подобия 82 %. Как установлено, LanJ-белок так же осуществляет трансмембранный транспорт антибиотиков ландомицинов.

In silico анализ Интернет баз данных позволил определить наличие еще у многих (кроме представленных выше) микроорганизмов паттернов для первичного строения которых выявлена значительная степень гомологии LanJ-белку. Однако показатель их идентичности не превышает 57 %. При анализе учитывалась так же степень подобия данных аминокислотных последовательностей. Среди рассматриваемых микроорганизмов (84 культуры), имеющих гомологичные паттерны, преобладают представители типа *Actinobacteria*. Их обнаружено 82 вида, принадлежащих к 10 семействам актиномицетов. Большинство из них – представители семейства *Streptomycetaceae* – 45 культур. Выявлено и 2 вида рода *Pseudomonas* (*Pseudomonas dioxanivorans* CB1190 и *Pseudomonas* sp. GM84), принадлежащие к типу *Proteobacteria*. Паттерн штамма *Pseudomonas* sp. GM84 был идентичен на 42 % (степень подобия 64 %) по аминокислотному строению LndJ-белку *S. globisporus* 1912, в то время как у *Pseudomonas dioxanivorans* CB1190 был выявлен белок с большей гомологией (50 % / 70 %) (ZP_10602926 и AEA24819, соответственно). Оба белка являются ортологичными – они выполняют функцию трансмем-

бранных антипортеров и относятся к MFS.

Большинство микроорганизмов, имеющих паттерны с идентичностью более 50 % – стрептомицеты (27 штаммов). Исключение – штамм *Micromonospora* sp. Tu 6368, у которого паттерн (ACP19369) идентичен на 54 %. Паттерны с высокой степенью гомологии выявлены только у ряда штаммов микроорганизмов продуцентов ангуациклиновых антибиотиков: *S. cyanogenus* S136 (ландомицин А), *Micromonospora* sp. Tu 6368 (саквоямицин), *S. fradiae* Tu2712 (урдамицин) и *S. cattleya* DSM 46488 (овьедомицин). У указанных 28 штаммов актиномицетов выявленные паттерны детерминируют трансмембранные антипортеры, относящиеся к семейству DHA2 суперсемейства основных переносчиков (MFS).

Широко известно наличие генов устойчи-

вости к антибиотикам у микроорганизмов, которые не продуцируют их. Высказываются предположения о приобретении указанных генов вследствие горизонтального их переноса от штаммов продуцентов. Среди выявленных культур микроорганизмов имеющих LndJ-ортологичные полипептиды многие не продуцируют антибиотики или же продуцируют антибиотики другой химической природы. Синтезируемые ими метаболиты принадлежат к различным классам химических соединений и демонстрируют биоцидную активность относительно разных организмов: бактерий, грибов, гельминтов и раковых клеток человека.

На данный момент выявлено более 10 кластеров генов синтеза ангуациклиновых антибиотиков (табл.).

Таблица. Трансмембранные антипортеры биосинтетических кластеров продуцентов ангуациклинов

Штаммы продуценты антибиотиков	Паттерны транспортных белков			
	№ паттерна, GenBank	Обозначение белка	Молекулярный размер, ак	Подобие LndJ-паттерну, %
<i>S. globisporus</i> 1912 (ландомицин Е)	ABB84178	LndJ	521	100 фрагменты
	ABV56007	LndW	601	
<i>S. fradiae</i> Tu2712 (урдамицин)	AAF00219	UrdJ	525	71
	AAF00207	UrdJ2	417	42
<i>S. antibioticus</i> Tu6040 (симоциклон)	AAK06799	SimEx	534	62 фрагменты
	AEU17895	SimEx2	412	
<i>Micromonospora</i> sp. Tu 6368 (саквоямицин)	ACP19362	SaqJ	469	48
	ACP19369	SaqJ1	518	74
<i>S. cyanogenus</i> S136 (ландомицин А)	AAD13557	LanJ	517	95
<i>S. cattleya</i> DSM 46488 (овьедомицин),	YP_004913786	OvmE	421	75
<i>S. murayamaensis</i> (кинамицин),	AA065354	KinJ	426	56
<i>S. aureofaciens</i> CCM 3239 (аурицин)	AAX57197	Aur1J	491	44
<i>Streptomyces</i> sp. SCC 2136 (Sch 47554),	CAH10123	SCC	527	61
<i>Streptomyces</i> sp. WP 4669 (PD116740)	AA065368	Pg2J	368	45
<i>Streptomyces</i> sp. PGA64 (PGA64)	AAK57531	PagJ	488	46
Некультивируемая бактерия	AEM44238	ORF29	520	95

Показано наличие 2 генов устойчивости только у четырех из них: *S. fradiae* Tu2712 (urdJ, urdJ2), *S. antibioticus* Tu6040 (simEx, simEx2), *S. globisporus* 1912 (lndJ, lndW) и *Micromonospora* sp. Tu 6368 (saqJ, saqJ1). Указанные гены детерминируют трансмембранные белки, принадле-

жащие (за исключением LndW и simEx2) к одному суперсемейству переносчиков – MFS, в то время как LndW – это антипортер ABC-семейства, а SimEx2 (AEU17895) – Na/H антипортер семейства переносчиков метаболитов KefB. Биосинтетические кластеры стрептомице-

тов *S. cattleya* DSM 46488 (овьедомицин), *S. murayamaensis* (кинамицин), *S. aureofaciens* CCM 3239 (аурицин), *Streptomyces* sp. PGA64 (PGA64), *Streptomyces* sp. SCC 2136 (Sch 47554), *Streptomyces* sp. WP 4669 (PD116740) и *S. cyanogenus* S136 (ландомицин А) содержат по одному гену, детерминирующему трансмембранные белки, также принадлежащие к семейству MFS. Однако, необходимо иметь ввиду, что продолжают работы по изучению строения и организации ряда кластеров генов: например *Streptomyces* sp. WP 4669 (FJ670504), *S. cattleya* DSM 46488 (AJ632203) и др.

Дополнительный анализ in silico Интернет баз данных выявил ряд ортологичных паттернов, уровень идентичности которых ниже 45 %: AAF00207 (UrdJ2), ACP19369 (SaqJ1), AA065368 (Pg2J), SAN10123 (SCC), AAX57197 (Aur1J), AAK57531 (PgaJ), AAK06799 (SimEx), AEU17895 (SimEx2), AA065354 (KinJ), ACP19362 (SaqJ), YP_004913786 (OvmE). Наиболее гомологичными были паттерны SAN10123 (SCC) и AAK06799 (SimEx). Все вышеуказанные белки относятся к суперсемейству основных трансмембранных переносчиков (MFS).

Проведенное определение гомологии нуклеотидных последовательностей LndJ, LndW- и simEx2-генов показало только наличие у них нескольких коротких фрагментов (менее 40 пн),

Выводы

Выявлено широкое распространение среди микроорганизмов (особенно актиномицетов) антипортеров с различной степенью подобия аминокислотному строению LndJ-белка *S.*

гомологичных LndJ-гену со степенью подобия выше 40 %. Сравнение аминокислотного строения 2 последних паттернов LndW- и simEx2 (ABV56007 и AEU17895) не выявил даже незначительного их взаимного подобия.

Таким образом, проведенный in silico анализ Интернет баз данных выявил у множества микроорганизмов разных таксономических групп наличие паттернов, гомологичных аминокислотной последовательности LndJ антипортера *S. globisporus* 1912. Однако, необходимо отметить, что подавляющее большинство микроорганизмов (97,6 %) – это представители типа *Actinobacteria*.

Наличие ортологов LndJ паттерна с различной степенью гомологии (от 42 % до 95 %) было показано у 11 штаммов-продуцентов ангуациклиновых антибиотиков. У двух из них было выявлено по 2 паттерна LndJ-паралога (*S. fradiae* 2717 и *S. Micromonospora* sp. Tu6368). В то время, как у *S. antibioticus* Tu6040, так и у *S. globisporus* 1912 из 2 антипортеров только один – это ортолог LndJ паттерна.

Интересным, есть и выявленное наличие полной идентичности только 6,3 % аминокислотной последовательности LndJ-белка (521 ак) и всех рассматриваемых паттернов. Это свидетельствует о возможности существования у этих белков гомологичных центров активности.

globisporus 1912 как защита от собственного антибиотика, так и у не продуцирующих никаких биоцидов.

Литература

1. Choi W.S., Wu X., Choeng Y.H. et al. Genetic organization of the putative salbostatin biosynthetic gene cluster including the 2-epi-5-epi-valiolone synthase gene in *Streptomyces albus* ATCC 21838 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 80, №4. – P. 637–645.
2. Saier M.H. Jr. Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaned evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution // *Microbiol. Rev.* – 1994. – Vol. 58, №1. – P. 71–93.

POLISHCHUK L., LUKYANCHUK V.

*Zabolotny institute of Microbiology and Virology of the NAS of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, Acad. Zabolotnoho str., 154, e-mail: LVPolishchuk@ukr.net*

SEARCH IN SILICO FOR ACTINOMYCETES PATTERNS WHICH ARE HOMOLOGOUS TO LndJ-PROTEIN OF *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912

The *aim* – to identify distribution of LndJ-like proteins among microorganisms and homology of their patterns. *Method.* Available Internet databases of information about primary structure of microbial DNAs and proteins on server NCBI were used. In silico analysis of Internet bases was done using available technical possibilities of program BLAST. The criterion for patterns selection was amino acid sequence of LndJ-protein of *Streptomyces globisporus* 1912. *Results.* Wide spreading of LndJ-homologous patterns among

microorganisms of different taxonomic groups was detected, but the majority (97,6 %) is representatives of type *Actinobacteria*. The presence of LndJ-pattern orthologs with varying degree of homology (42 % to 95 %) was shown in 11 anguacyclines producing strains. Two of them each had two patterns for LndJ-paralogs (*S. fradiae* 2717 and *Micromonospora* sp. Tu6368). Strains *S. antibioticus* Tu6040 and *S. globisporus* 1912 each had (from 2 antiporters) only one ortholog of LndJ pattern. **Conclusion.** Antiporters with varying degrees of similarity to LndJ-protein are widespread among microorganisms as defense against their own antibiotics well as in ones that do not produce any biocides.

Key words: pattern, amino acid structure, homology, antiporter, resistance.

ПОЛЯКОВА Л.В., ГАМАЮНОВА С.Г., ЖУРОВА П.Т.

Украинский научно исследовательский институт лесного хозяйства и агролесомелиорации
Украина, 61034, г. Харьков, ул. Пушкинская, 86, e-mail: polyakova_lv@mail.ru

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МНОГОВЕКОВОГО НАСАЖДЕНИЯ И 55-ЛЕТНЕЙ КУЛЬТУРЫ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ЛИСТОГРЫЗУЩИМ НАСЕКОМЫМ

Деградация насаждений дуба черешчатого, отчетливо проявляющаяся не только в перестойных, но и относительно молодых насаждениях, наблюдается на территориях многих европейских стран. К возможным причинам этого явления относятся как климатические изменения, отмечаемые в последние десятилетия, так и сопровождающее их изменение активности филофагов, как по видовому разнообразию, так и по численности [3]. Несмотря на то, что во многих случаях усыхание охватывает, прежде всего, старые и перестойные насаждения дуба, нами встречена 55-летняя культура этого вида, в которой отмечается около 15–16 % деревьев,

крона которых усыхает на 50–80 %. Интерес к этой культуре вызван тем, что она создана из семян репродукции произрастающего рядом многовекового (200–300 лет) насаждения, которое составляет основу национального природного парка «Святые горы». Задача исследования свелась к сравнительному биохимическому анализу листьев деревьев усыхающей 55-летней культуры и многовековых деревьев, не имеющих признаков усыхания кроны. Деревья обоих насаждений изучали также по степени повреждения листьев кроны доминирующими в насаждении видами филофагов.

Материалы и методы

Листья для анализа собирали с нижних побегов южной экспозиции. С каждого дерева брали по 6 листьев для индивидуального анализа. После сбора образцов листья фиксировали в кипящем этаноле, высушивали до воздушно-сухого состояния. Содержание белка (Б) опреде-

ляли по [2]: Содержание флавонолов (ФЛ) определяли по реакции с AlCl₃, 415 нм [1]; конденсированные танины (КТ) определяли по реакции с ванилиновым реактивом [6], гидролизуемые танины (ГТ) определяли по реакции с ферроцианид комплексом [4].

Результаты и обсуждение

Энтомологический анализ побегов деревьев, выполненный в течение первых 2 дней после сбора образцов, позволил установить, что видовой состав листогрызущих насекомых практически одинаков в кроне многовековых деревьев и 55-летней культуры. Основные виды вредителей: дубовый блошак (*Altica quercetorum*

Foudr.(Salicete Wsa), пяденицы ранневесеннего комплекса – пяденица обдирало обычная (*Eranis defoliaria*), доминант, и пяденица зимняя (*Operoptera brumata* L.), субдоминант. Распространение доминирующих летом 2012 г. вредителей и инфекции дано в табл. 1.

Таблица 1. Степень повреждения листьев дуба черешчатого в насаждениях разного возраста (%)

Возраст насаждения	Дубовый блошак	Комплекс пядениц	Мучнистая роса
200–300 лет	6.56±1.26**	0.87±0.42**	2.05±1.11*
Культура 55 лет	13.46±2.18	5.37±1.24	4.63±2.90