

Л.В. Полищук, В.В. Лукьянчук

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Акад. Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ СВЯЗЕЙ ШТАММА *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-2

Цель работы – определить близкородственные связи штамма *Streptomyces globisporus* 1912-2 и установить систематическую группу низшего уровня (клада), к которой относится данный штамм. **Методы.** *In silico* анализ первичных структур геномов штамма *S. globisporus* 1912-2 и штаммов *Streptomyces spp.* из базы данных «Genome» сервера National Center for Biotechnology Information проводился с помощью программ пакета Basic Local Alignment Search Tool указанного сервера. **Результаты.** Определено близкое родство штамма *S. globisporus* 1912-2 со штаммами *S. griseus* клады. В результате *in silico* анализа суммарных первичных структур геномов стрептомицетов базы данных «Genome» и указанного штамма, как и в результате сравнения нуклеотидных последовательностей их 16S рРНК-генов, установлено наибольшее родство со штаммом *S. globisporus* C-1027. Однако анализ *in silico* последовательностей 6 генов штаммов стрептомицетов выявил наибольшее родство штамма *S. globisporus* 1912-2 со штаммом *S. griseus* NBRC13350. **Выводы.** Установлено, что изучаемый штамм *S. globisporus* 1912-2 является членом *S. griseus* клады.

Ключевые слова: клада, *in silico* анализ, *S. globisporus* 1912-2, первичная структура ДНК, ген.

При классификации актиномицетов принимают во внимание как генетические характеристики, так и фенотипические [1, 5, 25, 3, 6, 8, 9, 24]. Тем не менее близкородственные связи видов *Streptomyces* в пределах группы видов не полностью определены [6, 9, 23]. Молекулярная систематика, в отличие от традиционной феносистематики, оценивает генетическое сродство организмов исходя из идентичности нуклеотидных последовательностей как отдельных генов, так и целых геномов.

Сравнительный анализ нуклеотидного состава молекул ДНК разных организмов и возможность интерпретации его результатов с точки зрения эволюционного подхода дали начало новому направлению в биологии – молекулярной филогенетике, или геносистематике. Бурное развитие геносистематики, связанное с автоматизацией и компьютеризацией всего исследовательского процесса, отмечается в последние два десятилетия. При этом использование метода геносистематики позволяет решать не только фундаментальные вопросы филогенеза и таксономии разных групп организмов, но и прикладные микробиологические проблемы. Приоритетным направлением геносистематики стрептомицетов становится филогения и систематика таксонов более низкого ранга – порядков, семейств, родов, групп (клад) [3, 23, 24].

Применение подходов молекулярной систематики (особенно мультилокусного анализа) для изучения эволюции микроорганизмов выявило ее принципиальные преимущества по сравнению с подходами феноти-

пической систематики: оно открыло возможность определения сродства отдельных организмов, которые могут и не иметь общих фенотипических признаков [23].

Актуальность данного исследования состоит в том, что при определении принадлежности штамма *S. globisporus* 1912-2 к определенному таксону, например, кладе (группы в классификации низшего уровня), можно ожидать наличия у него – *S. globisporus* 1912-2 – кластеров биосинтетических генов, выявленных у других членов этой же группы. Как известно, в геномах стрептомицетов идентифицированы десятки кластеров, кодирующих синтез биологически активных веществ, но значительная часть из них находится в криптическом состоянии. Целью работы являлось определение близкородственных связей штамма *S. globisporus* 1912-2 и выявление систематической группы низшего уровня (клады), к которой относится данный штамм.

Материалы и методы. Объектом исследований была первичная структура хромосомной ДНК экспериментального варианта штамма *S. globisporus* 1912 (*S. globisporus* 1912-2), полученного под действием N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина на споры исходной культуры [14, 16].

Wild-type штамма *S. globisporus* 1912 первоначально был выделен из образца почвы Армении и хранится как штамм *S. globisporus* Ac-2098 в Украинской коллекции микроорганизмов ИМВ им. Д.К. Заболотного НАНУ [http://www.imv.kiev.ua/images/doc/catalog/UCM_catalog.pdf].

Определение нуклеотидной последовательности хромосомной ДНК *S. globisporus* 1912-2 было проведено аккредитированной компанией BaseClear B.V. (Leiden, Netherlands) в 2013 г. [15, 16]. Информация о первичной структуре генома штамма *S. globisporus* 1912-2 получена в виде 1438 фрагментов (контигов). Суммарный молекулярный размер контигов ДНК штамма *S. globisporus* 1912-2 составляет 7,125 М. п. н. [15, 16].

В экспериментах *in silico* были использованы нуклеотидные последовательности геномов стрептомицетов из баз данных «Nucleotide collection» и «Genome» (chromosome) сервера National Center of Biotechnological Information, Bethesda, MD, USA (NCBI) [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/puccore>].

In silico исследования нуклеотидных последовательностей геномов стрептомицетов осуществлялись с помощью программы BLAST (blastn, blast2sq; megablast, discontinuous megablast) сервера NCBI с установками по умолчанию.

Результаты. Длительное время нуклеотидная последовательность 16S рРНК была «золотым стандартом» филогенетики [1, 5, 9, 25, 27]. Идентичность структуры молекул из разных штаммов стрептомицетов выше 97,8 % считалась показателем принадлежности их к одной кладе [23]. Однако в 2002 г. Специальным комитетом (an ad hoc committee of the International Committee for the Systematics of Prokaryotes) было предложено одновременное использование нескольких генов (housekeeping genes) для мультилокусного анализа геномных ДНК [27].

На данный момент определены первичные структуры только не-

скольких отдельных биосинтетических кластеров *S. globisporus* 1912-2 (IndE-кластера, crt-кластера, рРНК-кластеров и gyr-кластеров) и генов (trpK^{фMet}-гена) [15, 16, 18 – 22]. Так, нами ранее было установлено, что последовательность 16S рРНК-гена *S. globisporus* 1912-2 локализована на контиге 207 (13655 п.н. – 15186 п.н.) [21]. Также нашим анализом *in silico* выявлена высокая идентичность первичной структуры 16S рРНК-генов *S. griseus* NBRC13350 (AP009493, GenBank) и *S. globisporus* 1912-2 (99,8% и 100% соответственно) с полным покрытием (100 %) их гомологичных последовательностей [21]. Как известно из литературы, штаммы стрептомицетов, имеющие степень идентичности нуклеотидных последовательностей их 16S рРНК-генов равную или выше 97,8%, составляют одну кладу [3]. Используя указанную степень идентичности первичных структур 16S рРНК-генов как критерий отбора, нами было выявлено более десятка штаммов стрептомицетов со степенью идентичности выше 97,8% последовательностей их 16S рРНК-генов аналогичному гену *S. globisporus* 1912-2 (рис. 1). В качестве примера можно в дополнение к вышеупомянутым привести штаммы *S. pratensis* ATCC 33331 (CP002475.1), *S. anulatus* ATCC11523 (CM003601.1), *S. fulvissimus* DSM 40593 (CP005080.1), *S. roseosporus* NRRL 11379 (ABUX02000001.1).

Для проведения анализа мультилокуса из 6 обязательных генов (housekeeping) необходимо было определить первичные структуры еще пяти генов штамма *S. globisporus* 1912-2, традиционно используемых для таксономических исследований. Идентификация первичной структуры housekeeping генов *S. globisporus* 1912-2 производилась с помощью программы BLASTN с использованием в качестве референсных последовательностей аналогичных генов штамма *S. griseus* NBRC13350 (табл. 1).

Таблица 1

Локусы шести housekeeping генов *S. globisporus* 1912.

Гены стрептомицетов и кодируемые ими продукты	Локализация гена на контиге <i>S. globisporus</i> 1912–2		Ген <i>S. griseus</i> NBRC13350 AP009493
	Контиг	Локус гена на контиге	
recA – рекомбиназа А	422	1 п.н. – 1052 п.н. (1052 п.н.)*	recA (SGR_1475) (1131 п.н.)
groV – ДНК-зависимая РНК-полимераза (β субъединица)	22	9420 п.н. – 12935 п.н. (3516 п.н.)	groV (SGR_2869) (3516 п.н.)
gyrB – ДНК-гираза (β субъединица)	7	2952 п.н. – 5000 п.н. (2046 п.н.)	gyrB (SGR_3705) (2046 п.н.)
atpB – АТФ-зависимая РНК-хеликаза	119	12341 п.н. – 13783 п.н. (1443 п.н.)	atpB (SGR_2163) (1443 п.н.)
trpB – триптофан синтаза (β субъединица)	757	272 п.н. – 1558 п.н. (1287 п.н.)	trpB (SGR_5471) (1287 п.н.)

Примечание: * – частичная последовательность (в связи с обрывом контига).

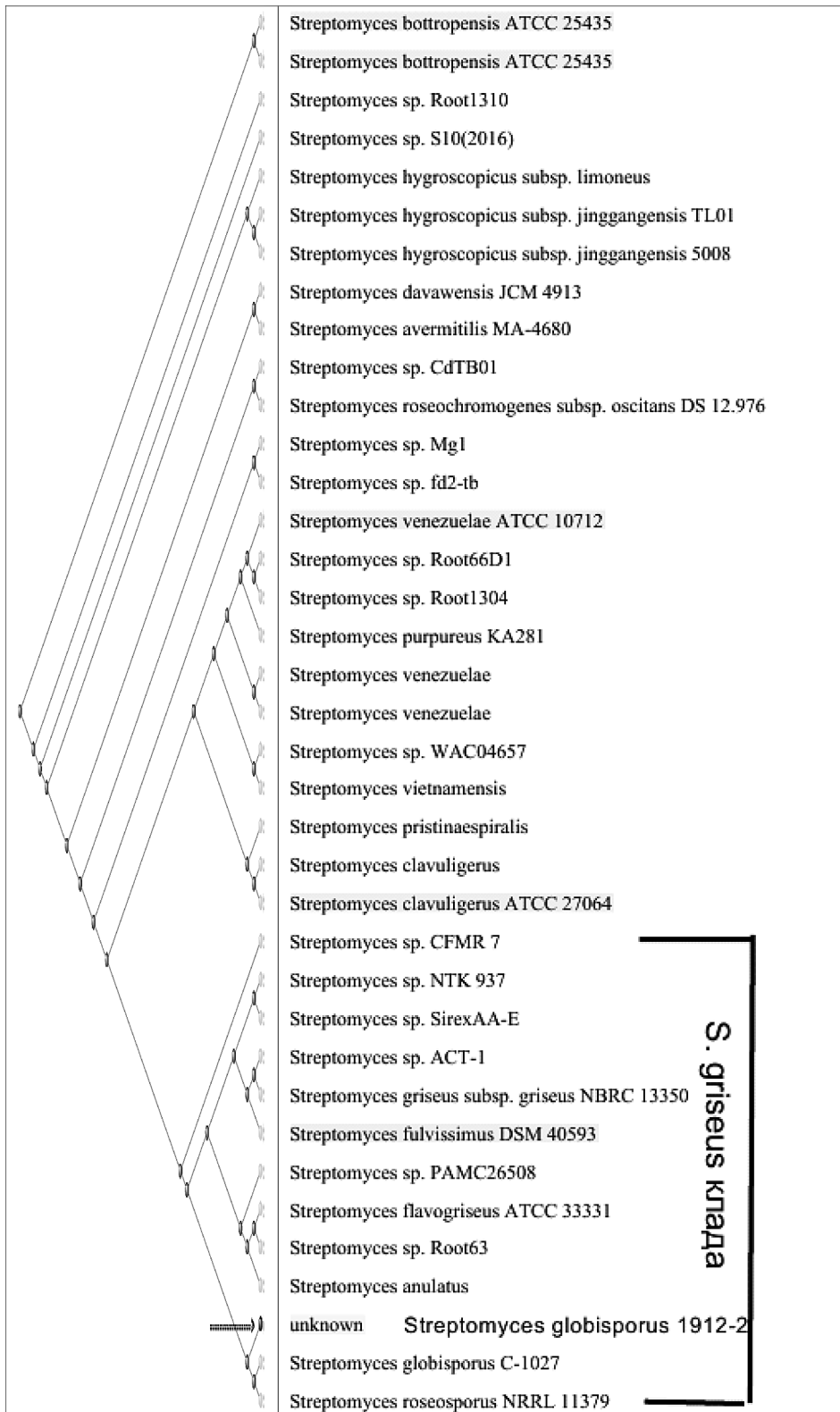


Рис. 1. Филогенетическое положение штамма *S. globisporus* 1912-2 в пределах рода *Streptomyces* на основе анализа первичной структуры 16S рРНК-генов

Анализ *in silico* базы данных NCBI «Genome» в таксиде *Streptomyces* показал наличие у множества штаммов стрептомицетов обязательных генов с показателями идентичности более 90% аналогичным генам *S. globisporus* 1912-2 (Рис. 2). Полученная информация представлена в виде дендрограммы, представляющей собой схему родства между 80 геномами.

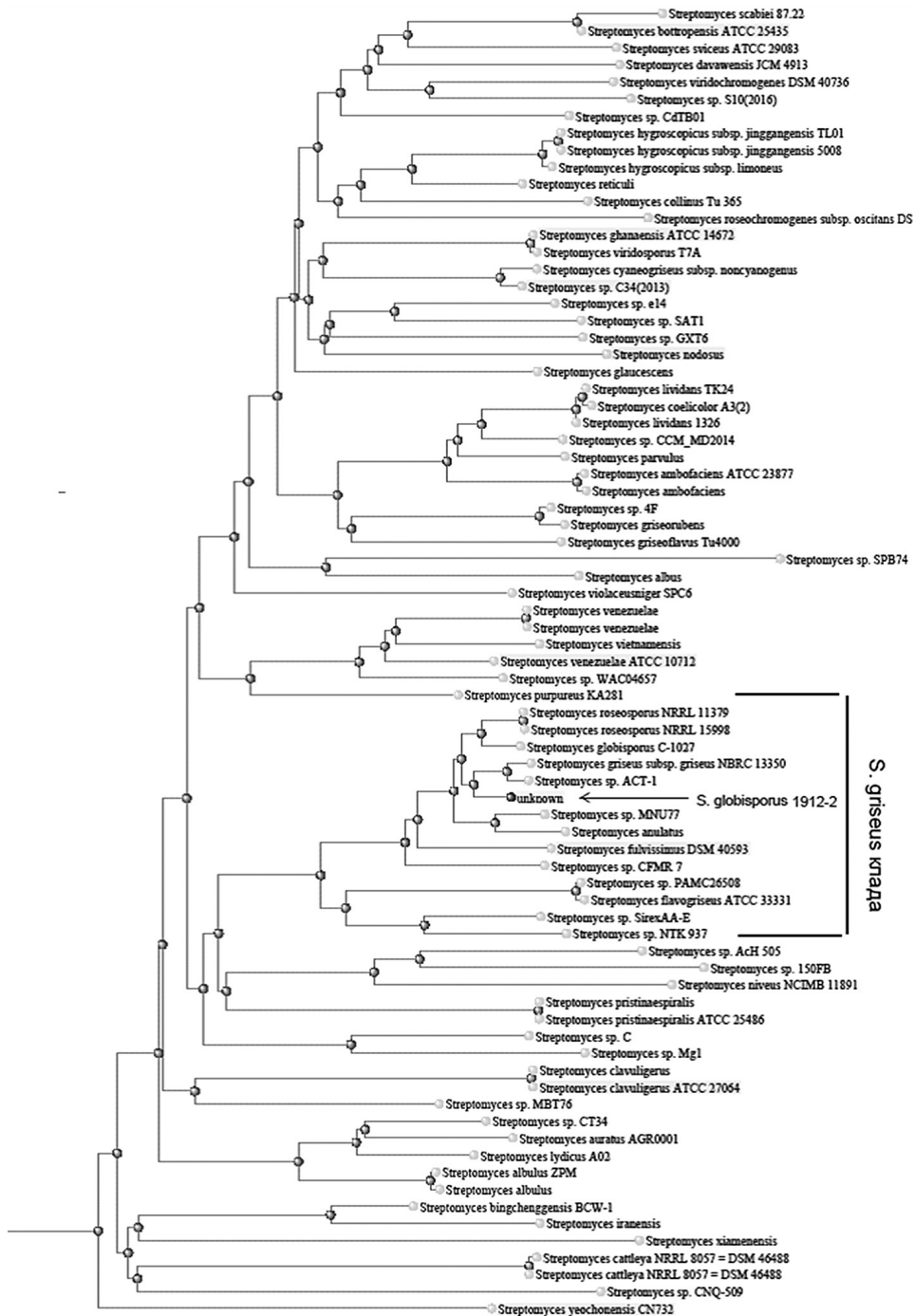


Рис. 2. Дендрограмма, демонстрирующая систематическую позицию штамма *S. globisporus* 1912-2, основанную на анализе первичной структуры мультилокуса из 6 обязательных генов

Проведен анализ *in silico* персональной гомологии первичной структуры каждого из 6 выбранных генов структурам аналогичных генов ряда других штаммов стрептомицетов. Для этого исследования отбирали штаммы, занимающие высшие позиции в подборке выравниваний: *S. griseus* NBRC13350 (AP009493), *S. griseus* ACT-1 (XylebKG-1) (ABYX02000001.1), *S. fulvissimus* DSM40593 (CP005080.1), *S. globisporus* C-1027 (CP013738.1), *S. roseosporus* NRRL 11379 (ABYX02000001.1) (табл. 2). Показатели гомологии мультилокусов штаммов составляли: покрытие – 98%, идентичность – 97%–95% при максимально возможных показателях достоверности выравниваний (0). Установлено, что показатели гомологии первичной структуры двух локусов вероятных генов *S. globisporus* 1912-2 (16S рPHK – контиг 207, groB – контиг 22) выше показателей идентичности локусов других аналогичных генов у всех 5 анализируемых штаммов стрептомицетов (табл. 2). Такая же тенденция в подобии тестируемых первичных структур выявлена и у генов с меньшей гомологичностью их структур. Показатели гомологии мультилокусов штаммов *S. nodosus* ATCC 14899 (CP009313.1), *S. collinus* Tu 365 (CP006259.1), *S. lincolnsensis* NRRL 2936 (CP016438.1) составляли: покрытие – 98%, идентичность – 90% при максимальных показателях покрытия и достоверности выравниваний.

Однако попарное выравнивание первичной структуры геномов *S. griseus* NBRC13350 и *S. globisporus* C-1027 с хромосомной ДНК *S. globisporus* 1912-2 выявило, что в целом геном *S. globisporus* 1912-2 имеет большее родство с геномом *S. globisporus* C-1027. Показатель идентичности штаммов *S. globisporus* 1912-2 и *S. griseus* NBRC13350 равен 96% (покрытие – 78%), а штаммов *S. globisporus* 1912-2 и *S. globisporus* C-1027 – 97% (покрытие – 82%) (данные не приведены).

Обсуждение результатов. В начале 60-х годов 20 века Э. Цукеркандлем и Л. Полингом было впервые заявлено о возможности использования анализа первичной структуры ДНК для филогенетической классификации организмов [1, 5, 25]. В настоящее время большинство исследований по молекулярной систематике – это классификация таксонов на основе анализа первичной структуры геномов [1, 3, 5, 6, 8, 9, 23, 26 – 27]. Это направление является ведущим в странах Европы и США [25]. Как правило, в таких исследованиях применяют мультилокусный анализ с использованием нескольких housekeeping генов [23, 27]. Долгое время «золотым стандартом» родства (рибосомной филогенетики) видов была нуклеотидная последовательность 16S рPHK. Идентичность структуры этой молекулы выше 97,8% считалась показателем принадлежности к одному кладу [23].

Определена первичная структура тотальной ДНК штамма *S. globisporus* 1912-2, суммарно составляющая 7,125 М. п. н. [15, 16]. Нами проведены поиски *in silico* в базе данных «Genome» штаммов стрептомицетов, последовательности геномов которых максимально гомологичны структуре ДНК *S. globisporus* 1912-2 и выявлены десятки *Streptomyces spp.* с высокими показателями идентичности нуклеотидной последовательности *S. globisporus* 1912-2. В этих экспериментах показана высокая степень идентичности первичной структуры хромосомной ДНК *S. globisporus* 1912-2

Гомологичность первичных структур 6 аналогичных генов 5 *Streptomyces ssp.*

Показатели гомологии локусов аналогичных генов стрептомицетов*				
Референсные гены <i>S. globisporus</i> 1912-2 (Query subrange)	Анализируемые геномы штаммов (Subject subrange)			
	<i>S. griseus</i> NBRC13350	<i>S. globisporus</i> C-1027	<i>S. fulvissimus</i> DSM 40593	<i>S. roseosporus</i> NRRL 11379
Контиг 207 13655 п.н. - 15186 п.н.	I=99,8% M/G=3/0	I=100% M/G=0/0	I=96,8% M/G=3/0	I=99,8% M/G=3/0
	16S рРНК-гены			
Контиг 119 12341 п.н. - 13783 п.н.	I=96,5% M/G=53/0	I=96,4% M/G=52/0	I=96,0% M/G=57/0	I=96,9% M/G=47/0
	atpB - АТФ-зависимая РНК-хеликаза			
Контиг 7 2952 п.н. - 5025 п.н.	I=96,8% M/G=64/2	I=97,8% M/G=45/0	I=92,5% M/G=99/24	I=97,8% M/G=63/2
	guyB - ДНК гираз (бета субъединица)			
Контиг 422 1 п.н. - 1053 п.н.	I=96,9% M/G=34/1	I=97,5% M/G=27/0	I=94,9% M/G=33/12	I=96,8% M/G=36/0
	гесА -рекомбиназа А			
Контиг 22 9450 п.н. - 12935 п.н.	I=99,1% M/G=31/0	I=99,5% M/G=16/0	I=94,9% M/G=85/52	I=99,1% M/G=31/0
	troB - ДНК-зависимая РНК-полимераза бета			
Контиг 757 272 п.н. - 1558 п.н.	I=96,4% M/G=46/0	I=97,3% M/G=35/0	I=90,7% M/G=73/11	I=96,7% M/G=43/0
	trpV - триптофан синтаза (бета субъединица)			

Примечание: показатели гомологии: I - идентичность, M/G - соотношение количества негомологичных оснований / количество разрывов

(выше 90%) с нуклеотидными последовательностями геномов штаммов, принадлежащих к *S. griseus* кладе: например, *S. globisporus* C-1027, *S. griseus* NBRC13350, *S. roseosporus* NRRL 15995, *S. anulatus* ATCC 11523, *S. fuvissimus* DSM 40593 и другие. Гомологичные фрагменты штаммов имели значительную степень покрытия (до 82%). Штаммы, принадлежащие к другим кладам (например, *S. albidoflavus* NRRL B-1271 (NZ_JOP00000000), *S. albus* SM254 (CP014485.1)), также имели значительные степени идентичности (до 95%) последовательности хромосомы *S. globisporus* 1912-2, но степень покрытия гомологичных фрагментов была значительно меньше (до 40%).

В 70-х – 80-х годах К. Везе и сотрудники разработали методы, которые легли в основу так называемой «рибосомной» филогенетики [25]. Принято считать, что штаммы стрептомицетов, имеющие степень идентичности нуклеотидных последовательностей их 16S рРНК-генов равных или выше 97,8%, составляют одну кладу [3, 23]. Ранее нами идентифицирована *in silico* нуклеотидная последовательность 16S рРНК-гена штамма *S. globisporus* 1912-2 и установлена ее высокая гомология с последовательностями аналогичных генов множества актиномицетов [21]. Было установлено, что более 30% выявленных с помощью BLASTN программы штаммов имели степень идентичности структур 16S рРНК-генов от 97,8% (при покрытии в 100%) (рис. 1). На основании результатов указанного анализа базы данных Genome было установлено, что штамм *S. globisporus* 1912-2 является возможным членом *S. griseus* клады. Показана полная идентичность первичной структуры локуса гена 16S рРНК штамма *S. globisporus* 1912-2 аналогичному гену штамма *S. globisporus* C-1027. Базируясь на этих данных, нами высказано предположение о вхождении штамма в *S. albovinaceus* субгруппу (как и штамма *S. globisporus* C-1027).

Как известно, *S. griseus* клада является наибольшей группой стрептомицетов, состав которой постоянно пополняется и уточняется. Такое внимание ученых связано с тем, что многие виды из этой группы являются продуцентами ценных биологически активных соединений [2, 4, 7, 15, 28].

Однако значительный опыт исследователей из различных лабораторий по практическому применению методов геносистематики различных организмов выявил, что нуклеотидная последовательность гена 16S рРНК не может быть «золотым стандартом» бактериального филогенеза для идентификации близкородственных видов, в частности стрептомицетов, в пределах клады [23, 26, 30]. Это связано с наличием в их геномах от 3 до 7 генов 16S рРНК, которые могут отличаться по первичной структуре локуса [23, 26].

В настоящее время принято одновременно использовать несколько обязательных генов (housekeeping genes) для мультилокусного анализа геномных последовательностей [23, 26]. Учитывая положительный опыт других исследователей, было решено использовать в наших дальнейших исследованиях еще 5 генов, которые в геноме микроорганизма присутствуют в одной копии и необходимы для его жизнедеятельности: например, функционирования наследственного аппарата (*gyrB*, *recA*, *atpA*) (табл. 2).

Построенная на анализе мультилокуса дендрограмма (рис. 2) отража-

ет родственные отношения между штаммами стрептомицетов и место в этой системе штамма *S. globisporus* 1912-2 на основе степени гомологии наборов из шести housekeeping генов. Подтверждено ранее высказанное предположение о вхождении штамма *S. globisporus* 1912-2 в *S. griseus* кладу. Интересным оказалось большее суммарное сродство нуклеотидных последовательностей 6 генов штамма *S. globisporus* 1912-2 с локусами аналогичных генов штамма *S. griseus* NBRC 13350, чем штамма *S. globisporus* C-1027.

Выявлено, что нуклеотидные последовательности двух (16S рРНК – контиг 207, groV – контиг 22) из 6 анализируемых генов *S. globisporus* 1912-2 имеют большее сродство к структуре локусов аналогичных генов 6 выбранных для сравнения штаммов стрептомицетов с разной степенью гомологии их первичных структур. По-видимому, это связано с тем, что, например, GroV-протеин выполняет наиболее важную функцию в голоэнзиме ДНК-зависимая РНК-полимераза и значительные изменения в ее структуре – летальны. В геномах стрептомицетов идентифицирован только один groV-ген. О важности функций 16S рРНК свидетельствует наличие в геномах нескольких копий (3 – 7 шт) генов, кодирующих эту молекулу [21, 26, 29].

Показано, что в целом первичная структура генома *S. globisporus* 1912-2 имеет большее сродство с геномом *S. globisporus* C-1027 (идентичность – 97%, покрытие – 82%), чем с геномом *S. griseus* NBRC13350 (96% / 78%) при показателях достоверности выравниваний равных 0. Что соответствует результатам анализа первичных структур 16S рРНК-генов стрептомицетов. Интересными являются полученные данные, свидетельствующие о том, что сродство, выявленное в результате *in silico* анализа суммарных первичных структур геномов стрептомицетов, больше соответствует результатам сравнения последовательностей их 16S рРНК-генов, чем мультилокусного анализа последовательностей их 6 генов.

Одной из основных задач систематики (кроме присвоения наименований; описания организмов и таксонов; определения их места в естественной системе организмов) является таксономическая экстраполяция. Типичная экстраполяция состоит в том, что, например, зная принадлежность организма к определенному таксону, можно ожидать у него наличия признаков, характерных для других членов этой группы [1, 8, 25, 26].

Как известно, в геномах стрептомицетов идентифицированы десятки кластеров, кодирующих синтез биологически активных веществ, но значительная часть из них находится в криптическом состоянии. Например, в геномах штаммов *S. fulvissimus*, *S. griseus*, *S. avermitilis* содержатся до 34 биосинтетических кластеров [17]. Установлено, что многие виды из *S. griseus* группы являются продуцентами ценных биологически активных соединений различной химической природы. В качестве примера можно привести синтез антибиотиков: штаммы видов *S. griseus* продуцируют стрептомицин, *S. fulvissimus* – валиномицин, *S. globisporus* C-1027 – эндеиновый антибиотик C-1027, *S. roseosporus (filamentosus)* – даптомицин [11 – 13, 17]. Кроме того, в геномах имеются биосинтетические кластеры в криптическом состоянии [17]. Примером могут служить молчащие crt-кластеры. Их наличие выявлено у штаммов видов *S. griseus*, *S. globisporus*, *S. fulvissimus*, *S. chrysomallus (anulatus)*, *S. setonii* [16, 17, 28].

Установленное таксономическое сродство организмов позволяет выявить новые возможные продуценты полезных метаболитов. Кроме того, это может быть использовано для экстраполяции наличия и функционирования регуляторных механизмов синтеза биологически активных соединений. Например, хорошо изучена регуляция А-фактор зависимым каскадом в клетках культур *S. griseus* синтеза десятков биологически активных метаболитов (например, антибиотиков различной природы, пигментов) [2, 4, 7, 15, 19, 22].

В настоящее время получен ряд данных об участии отдельных регуляторных соединений (например, продукта *bldA*–гена) вышеуказанного *AdpA*–регулона в регуляции синтеза антибиотика ландомицина Е культурой *S. globisporus* 1912 [4, 15, 18, 22]. Показано наличие в геноме *S. globisporus* 1912-2 нуклеотидных последовательностей, гомологичных генам *afsA*, *adpA* и *argA* *S. griseus* NBRC 13350 [15, 21]. Основываясь на вышеизложенных результатах исследований и используя таксономическую экстраполяцию, можно предположить, что биосинтетические кластеры, кодирующие продукцию штаммом *S. globisporus* 1912-2 ряда метаболитов различной химической природы, входят в А-фактор зависимый каскад. В соответствии с данными литературы *arg*-кластер может входить в *AdpA*–регулон [10].

В результате проведенного мультилокусного анализа *in silico* баз данных сервера NCBI было уточнено систематическое положение изучаемого штамма *S. globisporus* 1912-2 до таксона низшего уровня – клады. Установлено, что штамм *S. globisporus* 1912-2 является членом *S. griseus* группы (клады). Используя таксономическую экстраполяцию, сделано предположение о наличии и функционировании у штамма *S. globisporus* 1912-2 *AdpA*–регулона, в который, кроме *lnd*–кластера, входит ряд других биосинтетических кластеров.

Л.В. Поліщук, В.В. Лук'яничук

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
бул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна*

ВИЗНАЧЕННЯ БЛИЗЬКОСПОРІДНЕНИХ ЗВ'ЯЗКІВ ШТАМУ *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-2

Резюме

Мета роботи – встановити близькоспоріднені зв'язки штаму *Streptomyces globisporus* 1912-2 і визначити систематичну групу нижчого рівня (клади), до якої належить даний штам. **Методи.** *In silico* аналіз первинних структур геномів штаму *S. globisporus* 1912-2 і штамів *Streptomyces spp.* з бази даних «Genome» сервера National Center for Biotechnology Information проводився за допомогою програм пакету Basic Local Alignment Search Tool вказаного серверу. **Результати.** Визначені близькоспоріднені зв'язки штаму *S. globisporus* 1912-2 з штаммами *S. griseus* клади. У результаті *in silico* аналізу сумарних первинних структур геномів стрептоміцетів бази даних «Genome» і вищевказаного штаму, як і в результаті порівняння послідовностей їх 16S рРНК-генів, встановлено найбільшу спорідненість зі штамом *S. globisporus* C-1027. У той час як аналіз *in silico* послідовностей 6 генів штамів стрептоміцетів

виявив найбільшу спорідненість штаму *S. globisporus* 1912-2 зі штамом *S. griseus* NBRC13350. **Висновки.** Встановлено, що штам *S. globisporus* 1912-2 є членом *S. griseus* клади.

Ключові слова: клада, *in silico* аналіз, *S. globisporus* 1912-2, первинна структура, ген.

L.V. Polishchuk, V.V. Lukyanchuk

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine,
154 Zabolotnogo str., Kyiv, 03143, Ukraine*

IDENTIFICATION OF CONSANGUINITY OF THE STRAIN *STREPTOMYCES GLOBISPORUS* 1912-2

Summary

The purpose of this reseach was to clarify close relation of the strain *S. globisporus* 1912-2 and to define the lowest level taxonomic group (clade), to which this strain belonged. **Methods.** *In silico* comparative tests of primary structures of genomes of the strain *S. globisporus* 1912-2 and number of strains of *Streptomyces spp.* on the database “Genome” of the server of the National Center for Biotechnology Information were conducted using the software package of the Basic Local Alignment Search Tool of the above mentioned server. **Results.** The closely relationship of the strain *S. globisporus* 1912-2 with strains of the *S. griseus* clade was defined. The greatest affinity with a strain of *S. globisporus* C-1027 were equally the results of *in silico* analysis of the primary structures of *Streptomyces* genomes from the database “Genome” and the said strain or comparative tests *in silico* of the sequences only of their 16S rRNA genes. While the analysis *in silico* of nucleotide sequences of 6 genes of *Streptomyces* strains showed the greatest affinity of the strain *S. globisporus* 1912-2 with the strain *S. griseus* NBRC13350. **Conclusions.** It was approved that the strain of *S. globisporus* 1912-2 was a member of the *S. griseus* clade.

Keywords: a clade, *in silico* analysis, *S. globisporus* 1912-2, a primary structure of DNA, a gene.

1. Blokhina I.N., Levanova G.F. [Genosystematics of Bacteria]. – Moscow: Nauka. 1976. 149 p. Russian.
2. Efremenkova O.V., Gruzina V.D., Sumarukova I.G., Kuznetsov V.D. [Search for A factor-dependent variants in actinomycete population] Mikrobiologiya. 2003; 72(6): 766–769. Russian.
3. Goodfellow M., Kumar Y., Labeda D.P., Sembiring L. The *Streptomyces violaceusniger* clade: a home for *Streptomyces* with rugose ornamented spores // Antonie Van Leeuwenhoek. 2007; 92 (2): 173–199.
4. Hackl S., Bechthold A. The gene *bldA*, a regulator of morphological differentiation and antibiotic production in *Streptomyces* // Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 2015; 348 (7): 1–8.
5. Inge-Vechtov S.G. [Genetics with the basics of breeding]. Moscow: High school. 1989. 591 p.
6. Kampfer P. The Family *Streptomycetaceae*. Part I: Taxonomy. P. 538–604 // The Pro-

- karyotes. V. 3 (ed: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K-H.). Springer-Verlag (New York). 2006. 1051p. Russian.
7. Kato J.Y., Funa N., Watanabe H., et al. Biosynthesis of gamma-butyrolactone auto-regulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces* // Proc. Natl. Acad. Sci U S A. 2007; 104 (7): 2378–2383.
 8. Labeda D. P., Goodfellow M., Brown R. Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae* // Antonie Van Leeuwenhoek. 2012; 101(1): 73–104.
 9. Lanoot B., Vancanneyt M., Hoste B., et al. Grouping of *Streptomyces* using 16S-ITS RFLP fingerprinting // Res. Microbiol. 2005; 156 (5–6): 755–762.
 10. Lee H.S., Ohnishi Y., Horinouchi S. A sigma Beta-like factor responsible for carotenoid biosynthesis in *Streptomyces griseus* // J Mol Microbiol Biotechnol. 2001; 3 (1): 95–101.
 11. Li X., Lei X., Zhang C., et al. Complete genome sequence of *Streptomyces globisporus* C-1027, the producer of an enediyne antibiotic lidamycin // J. Biotechnol. 2016; 222: 9–10.
 12. Makarasin A., Yoza K., Isobe M. Higher structure of cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*, and special comparison with valinomycin, an antibiotic from *Streptomyces fulvissimus*. Chem Asian J. 2009; 4 (5): 688–698.
 13. Mao X.M., Luo S., Zhou R.C., et al. Transcriptional regulation of the daptomycin gene cluster in *Streptomyces roseosporus* by an autoregulator, AtrA. J. Biol Chem. 2015; 290 (12): 7992–8001.
 14. Matselyukh B., Lavrinchuk V.Ya. [Generation and characteristics of *Streptomyces globisporus* 1912 mutants, defective in biosynthesis of landomycin E]. Microbiol Zhurn. 1999; 61 (4): 22–27. Ukrainian.
 15. Matselyukh B., Mohammadipannah F., Laatsch H., et al. N-methylphenylalanyl-dehydrobutyrine diketopiperazine, an A-factor mimic that restores antibiotic biosynthesis and morphogenesis in *Streptomyces globisporus* 1912-B2 and *Streptomyces griseus* 1439. J. Antibiot. (Tokyo). 2015; 68 (1): 9–14.
 16. Matselyukh B.P., Polishchuk L.V., Lukyanchuk V. V. et al. Molecular mechanism of the carotenoid biosynthesis activation in the producer *Streptomyces globisporus* 1912. Biotechnologia Acta. 2014; 7 (6): 69 – 74.
 17. Myronovskiy M., Tokovenko B., Manderscheid N., et al. Complete genome sequence of *Streptomyces fulvissimus*. J Biotechnol. 2013; 168 (1): 117–118.
 18. Polishchuk L.V. [Chromosomal fragment from *Streptomyces globisporus* 1912-2 homologous to afsA-gene of *S. griseus* NBRC 13350.] The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine. 2015; 13 (1): 68–72. Ukrainian.
 19. Polishchuk L.V. [In silico searching of *Streptomyces globisporus* 1912-2 gvp-cluster] Factors of experimental evolution of organisms. 2015; 17: 325–329. Ukrainian.
 20. Polishchuk L. Nucleotide sequences of tRNA-methionine genes of *Streptomyces globisporus* 1912, identified in silico. The Bulletin of Vavilov Society of Geneticists and Breeders of Ukraine. 2016; 14: 58–62.
 21. Polishchuk L.V., Matselyukh B.P. [rRNA-genes of actinomycetes, which are homologous to *Streptomyces globisporus* 1912-2 rRNA-cluster]. Factors of experimental evolution of organisms. 2015; 14: 129–133. Ukrainian.
 22. Rebets Y. V., Ostash B. O., Fukuhara M., et al. Expression of the regulatory protein LndI for landomycin E production in *Streptomyces globisporus* 1912 is controlled by

- the availability of tRNA for the rare UUA codon. FEMS Microbiology Letters. 2006; 256 (1): 30–37.
23. Rong X., Huang Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species. Intern. J. Systematic and Evolutionary Microbiology. 2010; 60 (3): 696–703.
 24. Schmitt M. Willi Hennig and the Rise of Cladistics. Annual Review of Ecology and Systematics. 1984; 15: 1–24.
 25. Shipunov A. B. [Basics of the theory of systematics]. Moscow: University Press. 1999. 56 p. Russian.
 26. Smith A. W. Phylogenetics and homology modeling. New Brunswick: New Jersey. 2008. 475 p.
 27. Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M. et al. Report of the ad hoc committee for the re–evaluation of the species definition in bacteriology. Intern. J. Systematic and Evolutionary Microbiology. 2002; 52 (3): 1043–1047.
 28. Takano H., Asker D., Beppu T., Ueda K. Genetic control for light–induced carotenoid production in non–phototrophic bacteria. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2006; 33 (2): 88–93.
 29. Tourova T.P., Kuznetsov B.B., Novikova E.V., et al. [Heterogeneity of nucleotide sequences of 16S ribosomal RNA genes from the *Desulfotomaculum kuznetsovii* type strain]. Mikrobiologiya. 2001; 70 (6): 788–795. Russian.
 30. Vandamme P., Pot B., Gillis M. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiology Reviews. 1996; 60 (2): 407–438.

Отримано 1.12.2016