

А. А. Мельникова, Д. С. Волкова, Е. А. Храмцова

*Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь*

**ХАРАКТЕРИСТИКА *acdS*-ГЕНА БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PUTIDA* В-37  
И СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ЕГО ТРАНЗИЕНТНОЙ ЭКСПРЕССИИ В РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ  
*NICOTIANA BENTHAMIANA***

Продуктивное ведение мирового сельского хозяйства затруднено в связи с влиянием на растения широкого спектра факторов биотического и абиотического происхождения. Данные стрессовые воздействия вызывают в растении продукцию фитогормона этилена, накопление которого приводит к ускорению процессов старения, пожелтению и опаданию листьев и плодов. В настоящее время одним из наиболее перспективных подходов к снижению концентрации стрессового этилена является использование фермента 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат дезаминазы (АЦК-дезаминазы), который разлагает предшественник этилена, АЦК, до аммиака и  $\alpha$ -кетобутирата. Ген *acdS*, кодирующий данный фермент, представлен в геномах ризобактерий, в частности видов рода *Pseudomonas*. В настоящей работе ген *acdS* выделен из бактерий *Pseudomonas putida* В-37 и клонирован в составе вектора pBI121. Полученная векторная конструкция использована для проведения агробактериальной трансформации листьев растений *Nicotiana benthamiana* для установления временной экспрессии. Полученные данные об экспрессии *acdS*-гена в растительных клетках позволяют сделать вывод о том, что создание трансгенных растений, несущих бактериальный ген АЦК-дезаминазы, возможно и перспективно для народного хозяйства.

*Ключевые слова:* АЦК-дезаминаза, *acdS*-ген, временная экспрессия гена, *Nicotiana benthamiana*, *Pseudomonas putida*, *Agrobacterium tumefaciens*.

A. A. Melnikava, D. S. Volkava, E. A. Khramtsova

*Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus*

**CHARACTERISTICS OF BACTERIAL *acdS*-GENE FROM THE STRAIN *PSEUDOMONAS PUTIDA* В-37  
AND THE CREATION OF A GENETIC CONSTRUCT FOR DETERMINING ITS TRANSIENT EXPRESSION  
IN THE PLANT CELLS *NICOTIANA BENTHAMIANA***

Ethylene is an essential plant hormone also known as a stress hormone because its synthesis is accelerated by induction of a variety of biotic and abiotic stress. The plant growth promoting bacteria containing the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC-deaminase) enhances plant growth by decreasing ethylene level under stress conditions. The expression of ACC-deaminase (*acdS*) gene in transgenic plants is an alternative approach to overcome the ethylene-induced stress. Agrobacterium-mediated DNA transfer is currently the most facile and versatile method to deliver gene constructs into the nucleus for gene function analysis in diverse plant species. Transient gene expression via Agrobacterium-mediated DNA transfer in different plant tissues offers a simple and fast method to analyze transgene functions. In present work, the *acdS*-gene was amplified by PCR and then cloned into pBI121 vector under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35s promoter. *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 strain harboring pBI121-*acdS* vector jointly with the helper strain 19K were used for Agrobacterium-mediated leaf infiltration in *Nicotiana benthamiana* to infect 3-weeks-old plants. Monitoring of transient expression efficiency at 3 days post-infection was conducted by plant RNA extraction and RT-PCR. RNA was extracted from *Nicotiana's* infiltrated zones and an amount of 1  $\mu$ g total RNA was used to synthesize first-strand cDNA and then RT-PCR.

*Keywords:* ACC-deaminase, *acdS*-gene, transient expression, *Nicotiana benthamiana*, *Pseudomonas putida*, *Agrobacterium tumefaciens*.

**Введение.** В настоящее время одной из ключевых проблем растениеводства, требующих решения, является повышение устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды, количество которых год от года увеличивается вследствие активного антропогенного вмешательства в среду. К таким факторам относятся как биотические (патогенные организмы: бактерии, грибы, нематоды), так и абиотические (засоление почв и их загрязнение солями тяжелых металлов, засуха и затопление полей, температурные стрессы) [1]. Для борьбы с ними применяется целый спектр методов, однако в последние десятилетия предпочтение отдается созданию трансгенных

растений, устойчивых к стрессовым факторам среды. Одним из наиболее перспективных направлений является использование для подобных генно-инженерных манипуляций генов ризобактерий, стимулирующих рост растений (PGPR – Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Особый интерес представляют гены, отвечающие у ризобактерий за способность утилизировать этилен – гормон, выделяемый растениями в ответ на стресс и при накоплении в больших количествах угнетающий рост растительного организма. Препятствовать этому способен бактериальный фермент АЦК-дезаминаза, разлагающий предшественник этилена, АЦК, до аммиака и  $\alpha$ -кетобутирата. При этом уровень этилена снижается настолько, что растение уже не зависит от этиленового ингибирования роста [1, 2]. Ген *acdS*, кодирующий АЦК-дезаминазу, обнаружен у многих почвенных микроорганизмов (особенно широко он представлен у различных видов рода *Pseudomonas* [3, 4]) и используется для получения трансгенных растений, устойчивых к различным видам стрессов.

На сегодняшний день агробактериальная трансформация растений – наиболее удобный и эффективный метод доставки целевого гена в ядро растительной клетки [5]. В свою очередь временная экспрессия гена, которая достигается путем инфильтрации листового материала клетками агробактерий с конструкцией, содержащей целевой ген, может являться простым и быстрым методом детекции экспрессии гена, что позволяет убедиться в целесообразности создания полноценного трансгенного растительного организма [6].

Цель настоящей работы – характеристика *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* В-37 и создание генетической конструкции для определения временной экспрессии данного гена в растительных клетках *Nicotiana benthamiana*.

**Объекты и методы исследования.** В данной работе использованы следующие бактериальные штаммы: *P. putida* В-37, *Escherichia coli* Х1-1 blue, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, *A. tumefaciens* 19К, полученные из коллекции НИЛ молекулярной генетики и биотехнологии биологического факультета БГУ. Бактериальные культуры хранили в столбиках с 0,7 %-ной агаризованной средой на основе полноценной среды LB под слоем вазелинового масла при температуре +4 °С. Культивирование бактерий проводили при 28 и 37 °С в колбах объемом 50 мл либо в колбах Эрленмейера (объемом 250 мл), содержащих необходимое количество жидкой среды (50 или 100 мл) при перемешивании и аэрации (140–160 об/мин).

**Аmplификация *acdS*-гена.** При постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали реактивы производства Fermentas (Литва): Taq-полимеразу, 10-кратный Taq-буфер для ПЦР, смесь дНТФ и деионизированную воду в концентрациях, предложенных производителем. Для амплификации гена *acdS* использовали хромосомную ДНК бактерий *P. putida* В-37. Выделение и очистку препаратов хромосомной ДНК осуществляли по стандартному методу Дж. Мармура [7], ПЦР – с использованием праймеров, разработанных согласно имеющимся нуклеотидным последовательностям различных *acdS*-генов в базе данных UniProt: Forward: (Fatg) 5'-tccggatccatg aacctgaatcgttttraacgttatc-3'; Reverse: (Rtga) 5'-tccggatcctcagccgttgccgraacargaag-3'. Параметры циклов амплификаций: первичная денатурация – 5 мин при 94 °С; затем 35 циклов по 30 с: денатурация – при 94 °С; отжиг – при 54 °С; элонгация – при 72 °С; заключительная достройка – при 72 °С. ПЦР осуществляли по заданной программе с использованием аппарата Thermo Hydaid. Реакцию проводили в объеме 10 мкл. Результаты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в агарозном геле с использованием буферной системы TAE согласно методическим указаниям, изложенным в руководстве [8]. Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли с помощью Gel Extraction Kit (производство Fermentas) согласно предложенной методике. Амплифицированный ген клонировали в составе вектора pTZ57R/T в клетках *E. coli* Х1-1 blue, после чего вырезали по BamHI-сайтам, встраивали в вектор pBI121 и трансформировали в клетки бактерий *E. coli* Х1-1 blue. Для подтверждения наличия в трансформированных клетках векторной конструкции, несущей целевой ген, выделяли рекомбинантную плазмидную ДНК и проводили ПЦР-анализ с использованием указанных выше праймеров. Бинарный вектор pBI121 трансформировали в клетки *A. tumefaciens* GV3101 согласно указаниям, изложенным в руководстве М. Хольстера [9].

**Сиквенс-анализ последовательности гена *acdS* бактерий *P. putida* В-37.** Секвенирование осуществляли на базе компании «СИНТОЛ» (Москва). Первичную нуклеотидную последователь-

ность *acdS*-гена бактерий *P. putida* В-37 строили с использованием программного обеспечения SQ (<http://www.bio.bsu.by/sq/files.html>) [10]. Поиск гомологичных последовательностей осуществляли в базе данных Национального центра биотехнологических данных (NCBI) с использованием программы BLAST по алгоритму nucleotide blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) [11]. В программе Translate на платформе ExPASy (<https://www.expasy.org/>) [12] определяли аминокислотную последовательность белка, кодируемого исследуемым геном, которую затем анализировали на наличие консервативных доменов с помощью ресурса Conserved Domains на портале NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) [13]. Выравнивание и построение филограммы осуществляли с помощью пакета функций программы MEGA6 (<http://www.megasoftware.net/>) [14]; выравнивание – с использованием статистического метода ClustalW, филогенетическое дерево строили по алгоритму Neighbor-joining.

**Инфильтрация растений *N. benthamiana*.** Растения выращивали в течение 3 недель в условиях закрытого грунта при 16-часовом искусственном освещении и температуре +23 °С в течение светового дня. Для трансформации растительных клеток *N. benthamiana* использовали метод транзиторной трансформации с помощью клеток *A. tumefaciens* GV3101 (pBI121-*acdS*) и *A. tumefaciens* 19К (вспомогательный штамм).

**Определение транзиторной экспрессии бактериального гена в геноме растительной клетки.** Через 3 дня после инфильтрации из инокулированного растительного материала выделена тотальная РНК [8]. В качестве матрицы для синтеза кДНК, который проводили согласно протоколу, представленному фирмой-изготовителем (Thermo Fisher Scientific), использовали 1 мкг РНК. Полученная кДНК служила матрицей при постановке ПЦР с праймерами к нативному *acdS*-гену бактерий *P. putida* В-37.

**Результаты и их обсуждение.** Используемые в данной работе бактерии *P. putida* В-37 являются ризосферными микроорганизмами, обладают противогрибковой и антибактериальной активностью за счет синтеза феназиновых пигментов и характеризуются выраженной ростостимулирующей активностью [15]. Для амплификации гена *acdS* использовали ПЦР со специально разработанными праймерами на основании анализа последовательностей, соответствующих *acdS*-генам, представленным среди бактерий рода *Pseudomonas*. Продукт ПЦР размером 1000 п. н., полученный при амплификации фрагмента, выделен из агарозного геля и лигирован с Т-вектором (pTZ57R/T из набора InsTAclone<sup>TM</sup> PCR Cloning Kit производства Fermentas). Генетическая конструкция pTacdSB37, несущая фрагмент, соответствующий *acdS*-гену *P. putida* В-37 (представлена на рис. 1), отсекували, что позволило установить первичную нуклеотидную последовательность *acdS*-гена:

**GGATCC**ATGAACCTGAATCGTTTTGAACGTTATCCGTTGACCTTCGGTCCTTCTCCCATC  
ACGCCCTTGAAGCGCCTCAGTGAACACCTGGGGGGCAAGGTCGAGTTGTATGCCAAACGTG  
AAGACTGCAACAGTGGCCTGGCCTTCGGCGGGAACAAAACGCGCAAGCTCGAATATTTGAT  
TCCCGAAGCGATCGAGCAAGGCTGCGATACCTTGGTTTTCCATCGGCGGCATCCAGTCGAACC  
AGACTCGCCAGGTGGCCGCCGTTGCCGCTCACCTGGGTATGAAGTGCGTGCTGGTGCAGGA  
AAACTGGGTGAACTACTCCGATGCGGTGTATGACCGCGTTGGCAATATCGAAATGTCTCGCA  
TCATGGGCGCCGACGTAATACTGAATGCCGCCGGGTTGACTTTGGCATCCGGCCCAGCTGG  
GAGAAGGCCATGGACGATGTGGTGGCGCGGGGCGGCAAGCCGTTCCCGATACCGGCGGGT  
TGTCCGAACACCCCTACGGCGGCCTGGGGTTCGTCCGGCTTTGCCGAGGAAGTGCAGAGAGC  
AGGAAAACAACCTGGGTTTCACGTTGACTACATCGTGGTGTGCTCTGTGACCGGCAGTACC  
CAGGCCGGCATGGTTCGCTCGGTTTCGCTGCTGACGGCCGTTCCGAAGAACGTTATCGGCATCGA  
TGCCTCGGCCAAGCCAGAGAAAACCAAGGCTCAGATCCTGCGTATCGCCCGGCATAACCGCA  
GAGTTGGTGGGACTGGGCCGTGAGATCACCGAAGACGACGTGGTGTGCTCGATACAGTTTTGC  
CTACCCGGAATACGGTTTTGCCCAACGACGGCACGTTGGTAGCCATTCGTCTGTGCGCAAGCC  
TTGAAGGTGTGCTGACCGATCCGGTGTACGAGGGCAAATCCATGCACGGGATGATTGAAAT  
GGTCCGCGGTGGTGGTTCGCCGAAGGCTCGAAAGTGCTGTATGCGCACCTGGGCGGGGCG  
CCTGCGCTGAATGCCTACAGTTCTTGTTCGCAACGGCTGAGGATCC.

Анализ первичной нуклеотидной последовательности позволил установить степень гомологии с генами АЦК-деаминазы бактерий рода *Pseudomonas* sp. (86–91 % идентичности).

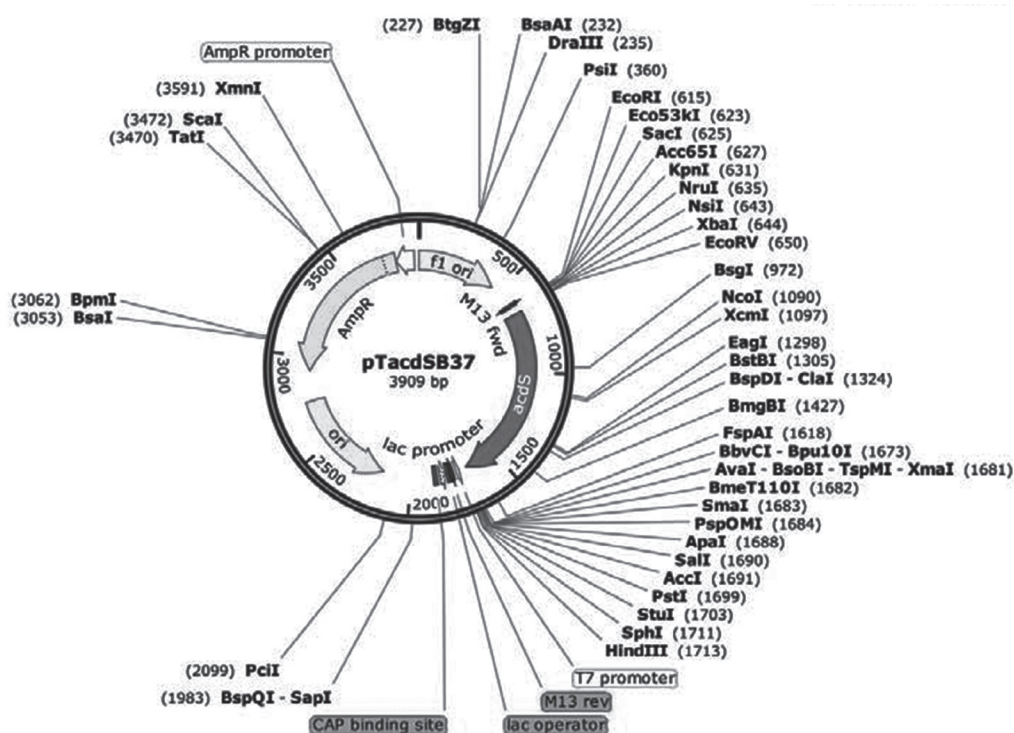


Рис. 1. Рестрикционная карта плазмиды pTacdSB37, построенная с использованием программы SnapGene [19]

Fig. 1. Restriction map of plasmid pTacdSB37, constructed using program SnapGene [19]

На сегодняшний день выделено и охарактеризовано как минимум 6 генов, которые кодируют АЦК-деаминазу у различных микроорганизмов. Большая часть из этих генов имеет структурные различия [16]. Показано, что бактериальные *acdS*-гены могут передаваться путем горизонтального переноса (как один из возможных вариантов – с помощью плазмид широкого круга хозяев) [17]. Подтверждением данного предположения является то, что АЦК-деаминазные гены у некоторых бактерий, например *R. leguminosarum*, *S. meliloti*, имеют экстрахромосомальную локализацию (на плаزمидах pRL10, pRtr514a и pSmeSM11) [18].

Фермент АЦК-деаминаза впервые выявлен в почвенных бактериях в 1978 г. [20], а кодирующий его ген выделен из *P. putida* UW4 в 1998 г. [21]. *AcdS*-ген обнаружен у большинства почвенных бактерий, таких как *E. cloacae* UW4 и *P. putida* UW4. Согласно литературным данным, АЦК-деаминаза представляет собой состоящий из мономеров молекулярной массой примерно 35–42 кДа мультимерный фермент [22], относящийся к группе ферментов, основным кофактором которых служит пиридоксаль-5-фосфат. Эти ферменты классифицируются на основе их трехмерной структуры на 4 типа: триптофан синтазы, аспартат аминотрансферазы, D-аминокислоты аминотрансферазы и аланин рацемазы. Согласно этой схеме, АЦК-деаминазы вписываются в семейство триптофан синтаз [23].

Для более детального изучения гомологии анализируемой вставки с *acdS*-геном нуклеотидную последовательность транслируемого белка конвертировали в аминокислотную, которую исследовали на наличие консервативного домена на портале NCBI. В белке, кодируемом открытой рамкой считывания данного гена, на интервале 16–324 а. о. выявлен ACCD-домен (Amipocyclopropane-1-carboxylate deaminase), относящийся к суперсемейству бета триптофан-синтаз II типа фолдинга.

Для анализа дивергенции и гомологии анализируемого белка с АЦК-деаминазами бактерий других родов и штаммов в данной работе построена филограмма по аминокислотным последовательностям (рис. 2). Известные последовательности белков АЦК-деаминазы различных бактерий рода *Pseudomonas* взяты из базы данных UniProt [24]. Полученные результаты позволяют судить о высокой степени гомологии и родства используемого в работе штамма *P. putida* B-37 с другими штаммами рода *Pseudomonas* на основании их принадлежности к одной *acdS*-группе [25].



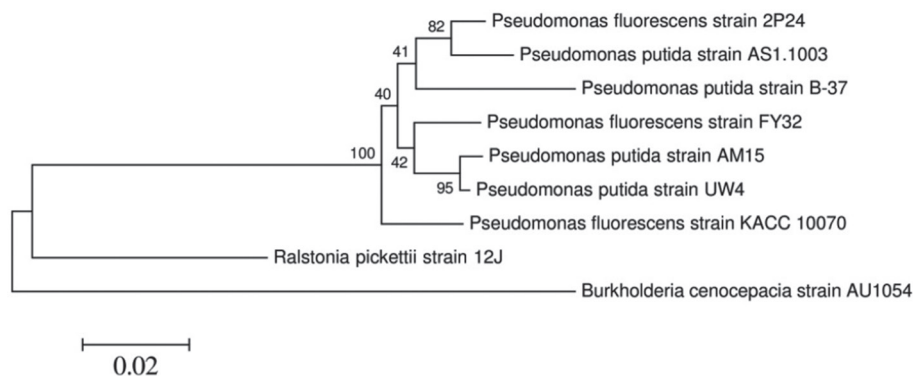


Рис. 2. Филограмма бактерий рода *Pseudomonas*, построенная с использованием программы MEGA6 [14]

Fig. 2. Phylogenetic tree of bacteria of *Pseudomonas* genus, constructed using program MEGA6 [14]

Таким образом, установленное сходство нуклеотидных последовательностей в 86–91 % и сходство полученных результатов относительно кодируемого белка с приведенными в литературе данными позволяет сделать вывод, что плазида, представленная на рис. 1, несет в своем составе *acdS*-ген бактерий *P. putida* B-37.

Следующим этапом нашей работы являлось получение рекомбинантных растительных клеток *N. benthamiana* с целью установления временной экспрессии исследуемого гена *acdS*. Для этого была создана генетическая конструкция, несущая ген *acdS* в составе бинарного вектора pBI121, который поддерживается в клетках бактерий и позволяет подстроить искомый ген под промотор 35S CaMV. Показано, что с его помощью возможно увеличение экспрессии гена как у однодольных, так и у двудольных растений [5]. Полученную плазмиду назвали pBI121*acdS* (представлена на рис. 3) и использовали для получения рекомбинантных клеток *A. tumefaciens* GV3101. В последующем с помощью данного штамма осуществляли инфильтрацию листовых пластин растений табака *N. benthamiana*, а штамм *A. tumefaciens* 19К, который способствовал переносу целевого гена в геном растительных клеток, использовали как вспомогательный.

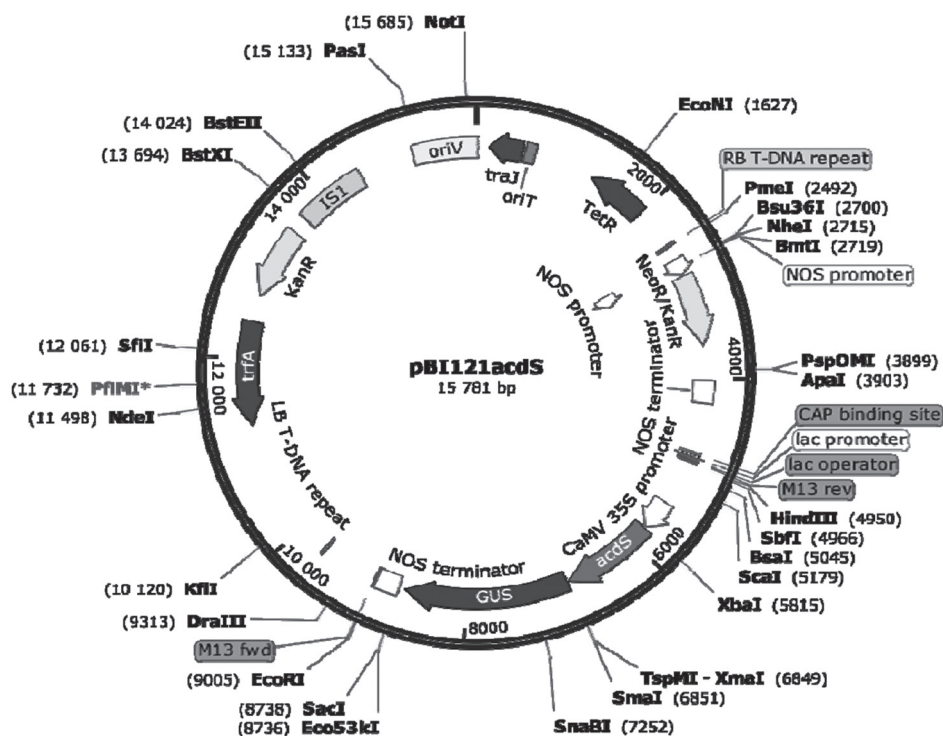


Рис. 3. Схема вектора pBI121*acdS*, несущего *acdS*-ген *P. putida* B-37 (построена с использованием программы SnapGene [19])

Fig. 3. Scheme of plasmid pTacdSB37, harboring *acdS* gene of *P. putida* B-37 (constructed using program SnapGene [19])

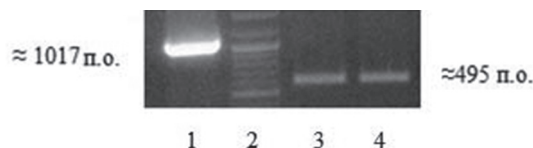


Рис. 4. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР: 1 – фрагмент около 1000 п. н., соответствующий *acdS*-гену *P. putida* B-37, что свидетельствует об экспрессии гена *acdS* в растительных клетках; 2 – маркерная ДНК Gene Ruler 1kb DNA Ladder; 3, 4 – положительный контроль кДНК

Fig. 4. Results of PCR assay: 1 – amplification of *acdS* gene (~1000 bp) of test isolate, which verifies *acdS* gene expression in plant cells; 2 – DNA ladder mix (Gene Ruler 1kb DNA Ladder); 3, 4 – positive control of cDNA synthesis

Далее необходимо было установить наличие вставки целевого гена в геном растительной клетки и установить его экспрессию. С целью установления наличия целевого гена *acdS* в геноме растительных клеток *N. benthamiana* была построена кДНК, где в качестве матрицы для проведения ОТ-ПЦР использовали тотальную РНК, выделенную из растительных клеток. С полученной кДНК осуществлена реакция ПЦР с праймерами к нативному гену *acdS*. Результаты реакции визуализировали с помощью электрофореза в агарозном геле (рис. 4). Получен фрагмент, соответствующий *acdS*-гену, что подтверждает наличие временной экспрессии данного гена в растительных клетках. В качестве положительного контроля синтеза кДНК использовали праймеры к гену альфа субъединицы фактора элонгации транскрипции EF-1a (фрагмент размером 495 п. н.). Как и ожидалось, в отсутствие обратной транскриптазы и матрицы фрагмент размером около 1000 п. н. не выявлен. Кроме того, при постановке реакции, где в качестве матрицы для синтеза кДНК использовали РНК, выделенную из нерекомбинантных листьев табака, положительного результата также не наблюдалось (данные на рисунке не представлены).

Полученный результат позволяет сделать вывод о наличии экспрессии данного гена под контролем промотора 35S CaMV в клетках эукариот.

**Заключение.** Установлено, что генетическая конструкция pBI121*acdS* способна встраиваться в растительный геном и экспрессироваться в нем. Полученную генетическую конструкцию можно использовать для создания трансгенных растений, обладающих повышенной устойчивостью к стрессовым факторам среды, таким как засоление почвы и ее загрязнение солями тяжелых металлов и ароматическими углеводородами. Создание трансгенных растений, несущих бактериальный ген, кодирующий фермент АЦК-деаминазу, является высокоперспективным подходом для защиты растений от стрессовых факторов среды (как биотических, так и абиотических) и стимуляции их роста. Кроме того, такие растения могут быть использованы в сельском хозяйстве и озеленении загрязненных территорий. Главным преимуществом использования трансгенных растений может быть тот фактор, что рекомбинантные растения могут конститутивно экспрессировать целевой ген при любых условиях окружающей среды, тогда как ризобактерии, синтезирующие АЦК-деаминазу, не всегда способны обеспечить необходимый уровень фермента из-за пагубного влияния условий среды на их рост и развитие. Таким образом, применение трансгенных растений для повышения качества урожая и озеленения промышленных территорий может стать одним из современных и технологичных подходов народного хозяйства в ближайшем будущем.

#### Список использованных источников

- Glick, B. R. Beneficial plant-bacterial interactions / B. R. Glick. – Waterloo : Springer International Publ., 2015. – 243 p.
- Glick, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world / B. R. Glick // Microbiology. – 2014. – Vol. 169, N 1. – P. 30–39.
- Ahmad, E. ACC deaminase producing *Pseudomonas putida* strain PSE3 and *Rhizobium leguminosarum* strain RP2 in synergism improves growth, nodulation and yield of pea grown in alluvial soils / E. Ahmad, M. S. Khan, A. Zaidi // Symbiosis. – 2013. – Vol. 61. – P. 93–104.
- Jacobson, C. B. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 / C. B. Jacobson, J. J. Pasternak, B. R. Glick // Can. J. Microbiol. – 1994. – Vol. 40, N 12. – P. 1019–1025.
- Глик, Б. Молекулярная биология: принципы и применение / Б. Глик ; пер. с англ. Баскаковой Н. В. [и др.] ; под ред. Янковского Н. К. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
- AGROBEST: an efficient Agrobacterium-mediated transient expression method for versatile gene function analyses in *Arabidopsis* seedlings / H. Wu [et al.] // Plant Methods. – 2014. – Vol. 10, N 19. – Mode of access: <http://www.plantmethods.com/content/10/1/19>. – Date of access: 06.08.2016.

7. Marmur, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms / J. A. Marmur // *J. Mol. Biol.* – 1961. – Vol. 3, N 2. – P. 208–218.
8. Маннитас, Т. Методы генетической инженерии : молекулярное клонирование / Т. Маннитас, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М. : Мир, 1984. – 479 с.
9. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* / M. Holsters [et al.] // *Mol. Gen. Genet.* – 1978. – Vol. 163. – P. 181–187.
10. SQ [Электронный ресурс] // Biosequence processor and molecular cloning aid = Процессор биологических последовательностей следующего поколения : [сайт] / SQ-project, [Минск, Респ. Беларусь]. – Mode of access: <http://www.bio.bsu.by/sq/files.html>. – Date of access: 02.04.2016.
11. BLAST. NCBI [Electronic resource]. – Mode of access: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. – Date of access: 02.04.2016.
12. ExPASy. Translate [Electronic resource]. – Mode of access: <http://web.expasy.org/translate/>. – Date of access: 02.04.2016.
13. NCBI. Conserved Protein Domain Family [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?hs1f=1&uid=cd00640&#seqhrch>. – Date of access: 02.04.2016.
14. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 [Electronic resource] / Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. // MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Publications. – Mode of access: <http://www.megasoftware.net/citations>. – Date of access: 02.04.2016.
15. Feklistova I. N. Effect of cultivation conditions on the production of phenazines in *Pseudomonas aurantiaca* B-162 // Biodiversity. Ecology. Evolution. Adaptation : Materials of Intern. Sci. Conf. in Odessa, March 28–April 1, 2005. – Odessa, 2005. – P. 159.
16. Evidence for horizontal gene transfer (HGT) of ACC deaminase genes / N. Hontzas [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2005. – Vol. 71, N 11. – P. 7556–7558.
17. Promotion of Plant Growth By Bacterial ACC Deaminase / B. R. Glick [et al.] // *Critical Rev. in Plant Sci.* – 2007. – Vol. 26. – P. 227–242.
18. Sequence analysis of the 144-kilobase accessory plasmid pSmeSM11a, isolated from a dominant *Sinorhizobium meliloti* strain identified during a long-term field release experiment / M. Stiens [et al.] // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 2006. – Vol. 72, N 5. – P. 3662–3672.
19. Snap Gene [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.snapgene.com/>. – Date of access: 07.03.2017.
20. Transcriptional regulation of ACC deaminase gene expression in *Pseudomonas putida* UW4 (aminocyclopropane-1-carboxylate) / Z. Cheng [et al.] // *Can. J. Microbiol.* – 2008. – Vol. 54, N 2. – P. 128–136.
21. Duan, J. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in Rhizobia: isolation and characterization [Electronic resource] : A thesis presented to the University of Waterloo in fulfillment of the thesis requirement for the degree of Master of Science in Biology / J. Duan. – Waterloo, 2007. – Mode of access: [https://uwspace.uwaterloo.ca/bitstream/handle/10012/3003/Thesis\\_4th\\_for%20submission.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://uwspace.uwaterloo.ca/bitstream/handle/10012/3003/Thesis_4th_for%20submission.pdf?sequence=1&isAllowed=y). – Date of access: 15.04.2017.
22. Glick, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase / B. R. Glick // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2005. – Vol. 251. – P. 1–7.
23. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria / B. R. Glick [et al.] // *Eur. J. of Plant Pathol.* – 2007. – Vol. 119. – P. 329–339.
24. UniProt [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.uniprot.org/>. – Date of access: 02.04.2016.
25. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phyto-beneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography / D. Blaha [et al.] // *FEMS Microbiol. Ecol.* – 2006. – Vol. 56. – P. 455–470.

## References

1. Glick B. R. *Beneficial plant-bacterial interactions*. Waterloo, Springer International Publ., 2015. 243 p.
2. Glick B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiology*, 2014, vol. 169, no. 1, pp. 30–39. doi:10.1016/j.micres.2013.09.009.
3. Ahmad E., Khan M. S., Zaidi A. ACC deaminase producing *Pseudomonas putida* strain PSE3 and *Rhizobium leguminosarum* strain RP2 in synergism improves growth, nodulation and yield of pea grown in alluvial soils. *Symbiosis*, 2013, vol. 61, pp. 93–104.
4. Jacobson C. B., Pasternak J. J., Glick B. R. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology*, 1994, vol. 40, no. 12, pp. 1019–1025.
5. Glick B. *Molecular biology: principles and applications*. Translation from English Baskakovi N. V. et al., in Iankovskii N. K. (ed.). Moscow, Mir, 2002. 589 p. (in Russian).
6. Wu H. Y., Liu K. H., Wang Y. H., Wu J. F., Chiu W. L., Chen C. Y., Wu S. H., Sheen J., Lai E. M. AGROBEST: an efficient *Agrobacterium*-mediated transient expression method for versatile gene function analyses in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Methods*, 2014, vol. 10, no. 19. Available at: <http://www.plantmethods.com/content/10/1/19> (accessed 06.08.2016). doi: 10.1186/1746-4811-10-19.
7. Marmur J. A. Procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology*, 1961, vol. 3 no. 2, pp. 208–218.
8. Маннитас Т., Фрич Е., Сембрук Д. *Methods of genetic engineering: molecular cloning*. Moscow, Mir, 1984. 479 p. (in Russian).

9. Holsters M., de Waele D., Depicker A., Messens E., van Montagu M., Schell J. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Genetics and Genomics*, 1978, vol. 163, pp. 181–187.
10. SQ. Biosequence processor and molecular cloning aid, SQ-project (2016). Available at: <http://www.bio.bsu.by/sq/files.html> (accessed 02.04.2016). (in Russian).
11. BLAST. NCBI. (2016). Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed 02.04.2016).
12. ExPASy. Translate (2016). Available at: <http://web.expasy.org/translate/> (accessed 02.04.2016).
13. NCBI. Conserved Protein Domain Family (2016). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrvcgi?hslf=1&uid=cd00640&#seqhrch> (accessed 02.04.2016).
14. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Publications*. Available at: <http://www.megasoftware.net/citations> (accessed 02.04.2016).
15. Feklistova I. N. Effect of cultivation conditions on the production of phenazines in *Pseudomonas aurantiaca* B-162. *Materials of International Scientific Conference "Biodiversity. Ecology. Evolution. Adaptation"*. Odessa, 2005, p. 159.
16. Hontzas N., Richardson A.O., Belimov A., Safronova V., Abu-Omar M. M., Glick B. R. Evidence for horizontal gene transfer (HGT) of ACC deaminase genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, vol. 71, no. 11, pp. 7556–7558.
17. Glick B. R., Todorovic B., Czarny J., Cheng Z., Duan J., McConkey B. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2007, vol. 26, pp. 227–242.
18. Stiens M., Schneiker S., Keller M., Kuhn S., Pühler A., Schlüter A. Sequence analysis of the 144-kilobase accessory plasmid pSmeSM11a, isolated from a dominant *Sinorhizobium meliloti* strain identified during a long-term field release experiment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, vol. 72, no. 5, pp. 3662–3672.
19. Snap Gene (2016). Available at: <http://www.snapgene.com/> (accessed 02.04.2016).
20. Cheng Z., Duncker B., McConkey B., Glick B. R. Transcriptional regulation of ACC deaminase gene expression in *Pseudomonas putida* UW4 (aminocyclopropane-1-carboxylate). *Canadian Journal of Microbiology*, 2008, vol. 54, no. 2, pp. 128–136.
21. Duan, J. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in Rhizobia: isolation and characterization [Electronic resource] : A thesis presented to the University of Waterloo in fulfillment of the thesis requirement for the degree of Master of Science in Biology. Waterloo, 2007. Available at: [https://uwspace.uwaterloo.ca/bitstream/handle/10012/3003/Thesis\\_4th\\_for%20submission.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://uwspace.uwaterloo.ca/bitstream/handle/10012/3003/Thesis_4th_for%20submission.pdf?sequence=1&isAllowed=y) (accessed 15.04.2017).
22. Glick B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, vol. 251, pp. 1–7.
23. Glick B. R., Cheng Z., Czarny J., Duan J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 2007, vol. 119, pp. 329–339.
24. UniProt (2016). Available at: <http://www.uniprot.org/> (accessed 02.04.2016).
25. Blaha D., Prigent-Combaret C., Mirza M. S., Moënne-Loccoz Y. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic Proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, vol. 56, pp. 455–470.

### Информация об авторах

Мельникова Аlesia Андреевна – аспирант, мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный университет (пр-т Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [alesiamelnikava@gmail.com](mailto:alesiamelnikava@gmail.com).

Волкова Дарья Сергеевна – студент. Белорусский государственный университет (пр-т Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [95volkovads@gmail.com](mailto:95volkovads@gmail.com).

Храмцова Елена Аркадьевна – канд. биол. наук, доцент. Белорусский государственный университет (пр-т Независимости, 4, 220030, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: [elenakhramtsova@inbox.ru](mailto:elenakhramtsova@inbox.ru).

### Information about the authors

Alesia A. Melnikava – Postgraduate student, Junior researcher. Belarusian State University (Nezavisimosti Av., 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [alesiamelnikava@gmail.com](mailto:alesiamelnikava@gmail.com).

Darya S. Volkava – Student. Belarusian State University (Nezavisimosti Av., 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [95volkovads@gmail.com](mailto:95volkovads@gmail.com).

Elena A. Khramtsova – Ph. D. (Biol.), Assistant Professor. Belarusian State University (Nezavisimosti Av., 4, 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [elenakhramtsova@inbox.ru](mailto:elenakhramtsova@inbox.ru).

### Для цитирования

Мельникова, А. А. Характеристика *acdS*-гена бактерий *Pseudomonas putida* B-37 и создание генетической конструкции для определения его транзientной экспрессии в растительных клетках *Nicotiana benthamiana* / А. А. Мельникова, Д. С. Волкова, Е. А. Храмцова // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – № 3. – С. 61–68.

### For citation

Melnikava A. A., Volkava D. S., Khramtsova E. A. Characteristics of bacterial *acdS*-gene from the strain *Pseudomonas putida* B-37 and the creation of a genetic construct for determining its transient expression in the plant cells *Nicotiana benthamiana*. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnych navuk* [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series], 2017, no. 3, pp. 61–68.