

УДК: 571.27, 576.32

**Модификация вирулентных свойств *Pectobacterium atrosepticum*
конъюгативной плазмидой pPA21A**

**Modification virulent properties of *Pectobacterium atrosepticum* by conjugative
plasmid pPA21A**

Дюбо Ю.В., Николайчик Е.А.

Кафедра молекулярной биологии, биологический факультет, Белорусский государственный университет; г. Минск, ул. Курчатова 10, Республика Беларусь, 220045

Diubo Y.V., Nikolaichik Y.A.¹

¹ Department of Molecular Biology, The Faculty of Biology, Belarusian State University, Minsk, 10 Kurchatov st., Republic of Belarus, 220045

Ключевые слова: плазида, вирулентность, конъюгация, реакция гиперчувствительности.

Key words: plasmid, virulence, conjugation, hypersensitive reaction.

Аннотация

Криптическая плазида pPA21A *Pectobacterium atrosepticum* 21A является важным компонентом генома, нетипичным для представителей этого вида. Наиболее значимыми из обнаруженных генетических детерминант плазмиды являются *vir*-кластер, гены, кодирующие фосфолипазу D, H-NS-подобный и сиртуин-подобный белки. Для плазмиды так же показан конъюгативный перенос (частота от $2,1 \cdot 10^{-4}$ до $6,5 \cdot 10^{-5}$). Показано влияние индукции SOS-ответа на частоту переноса плазмиды и влияние исследуемой плазмиды на вирулентность несущих ее бактерий.

Abstract

Cryptic plasmid pPA21A is the important component of the genome of the *Pectobacterium atrosepticum* 21A. The most significant plasmid's genetic determinants are *vir*-cluster, coding genes of phospholipase D, H-NS-like & SIR-like proteins. We show conjugative transfer of this plasmid (from $2,1 \cdot 10^{-4}$ to $6,5 \cdot 10^{-5}$ per donor cell). We show that activation of SOS-response have influence on the rate of the conjugative transfer. The plasmid also have influence on the virulence of bacteria, who carry it.

Введение

Pectobacterium spp. являются повсеместно распространенными энтеробактериальными фитопатогенами, поражающими широкий круг растений. Это довольно разнообразная группа бактерий с не устоявшейся окончательно классификацией, что во многом определяется различиями между штаммами, выделенными из разных растений-хозяев. Как правило, конкретный штамм пектобактерий способен успешно заражать лишь ограниченный круг растений-хозяев, а попытка заражения большинства растений приводит к развитию реакции сверхчувствительности, ограничивающей распространение патогена.

Среди штаммов пектобактерий можно выделить достаточно однородную группу специализированных патогенов картофеля, классифицируемых как *P. atrosepticum*. В литературе не описаны случаи выделения штаммов этого вида из растений, отличных

от картофеля. Попытки искусственного заражения штаммами *P. atrosepticum* других растений обычно приводят к развитию реакции сверхчувствительности, однако по нашим наблюдениям для растений табака *Nicotiana tabacum* большинство штаммов *P. atrosepticum* являются относительно слабыми индукторами реакции сверхчувствительности. Исключением является выделенный в Беларуси штамм *P. atrosepticum* 21А, способный индуцировать у *N. tabacum* эту реакцию при использовании значительно более низких плотностей клеточных суспензий. Поскольку в настоящее время доступны полные геномные последовательности для нескольких штаммов *P. atrosepticum*, в том числе и для штамма 21А [1], мы попытались с помощью сравнительного геномного анализа выявить локусы, которые могут быть ответственными за особенности вирулентных свойств *P. atrosepticum* 21А.

Геномы пектобактерий имеют сходную структуру, представленную в большинстве случаев единственной кольцевой хромосомой размером около 5 млн. н. п. Лишь некоторые штаммы пектобактерий содержат плазмиды, причем роль этих плазмид в физиологии пектобактерий в большинстве случаев не показана [2]. В частности, на сегодня экспериментально не показана связь ни одной из плазмид пектобактерий, выявленных в более чем 50 геномных проектах, с вирулентными свойствами несущих их штаммов, хотя классические примеры плазмид фитопатогенных бактерий, абсолютно необходимых для заражения их носителями растений, хорошо известны [3–5]. Тем интереснее оказалось выявление в клетках штамма *P. atrosepticum* 21А крупной (32444 н.п.) плазмиды. Поскольку хромосомные последовательности разных штаммов *P. atrosepticum* имеют минимальные отличия, представляется обоснованным предположение о том, что именно уникальная плазмида обеспечивает особенности реакции растений *N. tabacum* на контакт с клетками штамма 21А. Проверка этого предположения и являлась основной целью настоящей работы. Исследование взаимодействий фитопатогенов и их хозяев представляется важной областью фундаментальных исследований биологии растений. Подобные исследования на данном этапе имеют тенденцию фокусироваться в большей степени на одном из участников процесса: хозяине или патогене. Варьирует и степень внимания к ответным реакциям второго участника, их регистрации и последующем анализе.

Материалы и методы

При проведении скрещиваний в качестве донора использовали *Escherichia coli* (штаммы XL-1 Blue, J62) или *Pectobacterium atrosepticum* (штамм 36А), несущую плазмиду рРА21А с геном гентамицинутоустойчивости. В качестве реципиентов в различных скрещиваниях использовали штаммы *E. coli* J62, *P. atrosepticum* (штамм SCRI1043, 36А). Характеристики использовавшихся в работе штаммов приведена в таблице ниже.

Таблица 1. Штаммы, использованные в работе.

Штаммы, плазмиды	Характеристика	Происхождение
<i>Escherichia coli</i> XL-1	F ⁻ <i>proAB lacI^q lacZ⁻ M15</i> Tn10(Tet ^r)/ <i>recA1 endA1</i> <i>gyrA96(Nal^r) thi-1 hsdR17(r^{-k} m^{+k})</i> <i>supE44 relA1 lac</i>	Коллекция кафедры молекулярной биологии БГУ
<i>Escherichia coli</i> J62	<i>str^r F⁻ lac pro his trp</i>	Коллекция кафедры

		молекулярной биологии БГУ
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> 21A	Природный изолят	Евтушенков А.Н.
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> 36A	Природный изолят	Евтушенков А.Н.
<i>Pectobacterium atrosepticum</i> SCRI1043	Природный изолят	Scottish Crop Research Institute

Культуры выращивались в среде LB (триптон – 8 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 10 г/л) при 28°C (для штаммов *P. atrosepticum*) или 37°C (для штаммов *E. coli*). Так же в работе были использованы селективные среды (минимальная среда: глюкоза – 10 г/л, NH₄Cl – 2 г/л, NH₄NO₃ – 0,4 г/л, Na₂SO₄ · 10H₂O – 0,8 г/л, K₂HPO₄ · 3H₂O – 1,57 г/л, KH₂PO₄ · 3H₂O – 0,56 г/л, MgSO₄ · 7H₂O – 0,04 г/л) с добавлениями антибиотиков (гентамицин, налидиксовая кислота, ампициллин, стрептомицин). Для получения твердых сред использовали бактериологический агар (15 г/л).

Скрещивание проводили на твердой среде LB. Смешивали свежие суточные культуры донора и реципиента в соотношении 1:1 и 50 мкл смеси переносили на стерильные фильтры (Владисарт, Ø ≈ 1 см), помещенные на поверхность среды. После инкубирования чашек при 37 °C или 28 °C в течении суток бактерии смывали физиологическим раствором (NaCl 8,5 г/л). Для отбора трансконъюгантов полученную суспензию и ее последовательные разведения высевали на селективную среду LB с гентамицином.

Идентификацию плазмид осуществляли рестрикционным анализом после выделения по модифицированной методике (добавлением в нейтрализующие буферы РНКазы А, обработкой протеиназой К и последующей фенольной экстракцией с добавлением стадии с фенолом) щелочного [6] лизиса (для *P. atrosepticum*) или по стандартной методике (для *E. coli*).

Индукция SOS-ответа проводилась инкубацией клеток донора в жидкой питательной среде с аэрацией в течении 2 часов при концентрации митомицина С 1мкг/мл. Индукция SOS-ответа контролировалась по образованию филаментов клетками (окраска препарата водным фуксином).

Заражение растений осуществлялось методом инфильтрации бактериальных суспензий в листья растений *Nicotiana tabacum* линии Havana petit SR1. Плотности всех суспензий были приведены к OD₆₀₀ = 6 (суспензии меньшей плотности не индуцировали реакцию гиперчувствительности у этих растений). Оценка результата производилась через 2 дня в соответствии с 5-балльной шкалой.

Растения табака культивировались при 20°C и 16- часовом освещении.

В ходе компьютерного анализа плазмиды использовались следующие программные пакеты: BLAST [7] (в частности blastn и blastp), Progressive Mauve (версия snapshot_2015-02-13 build 0) [8], SigmID (2.0.0 build 234) [9], SQ (версия 2.0.0 beta 1 сборка 344) [10], Effective DB [11], базы данных GenBank, Swissprot и CDD [12–

14]. Показатель средней нуклеотидной идентичности (ANI) рассчитывался с помощью сервиса JSpeciesWS [15].

Результаты и обсуждение

Зачастую именно плазмиды штаммов определяют хозяйственно значимые свойства бактерий, их содержащих, как то способность к деградации определенных классов веществ, детерминанты резистентности к антибиотикам, вирулентные и патогенные свойства бактерий. Предметом данного исследования как раз является плазида, относимая нами к последней группе. Она резко отличает исследуемый штамм *P. atrosepticum* 21A от других штаммов вида *P. atrosepticum*. В целом для вида, особенно для штаммов происходящих из Беларуси, нетипично наличие плазмид, особенно таких крупных, как описанная в данном исследовании (32444 н.п.) [2]. Кроме того, это штамм обладает еще одним свойством, выделяющим его из группы близких штаммов: при инокуляции суспензии клеток *P. atrosepticum* 21A у растений табака развивается хорошо выраженная реакция гиперчувствительности. При инокуляции близкого исследуемому бесплазмидного штамма SCRI1043 (сходство нуклеотидной последовательности хромосом порядка 98%) подобная реакция не наблюдается. Кроме того, штамм 21A обладает значительно более выраженными вирулентными свойствами в отношении клубней картофеля в сравнении со сходным с ним штаммом *P. atrosepticum* 36A (для штамма *P. atrosepticum* SCRI1043 подобные исследования пока не проводились) Основываясь на этих наблюдениях, мы предположили, что данные отличия вирулентных свойств исследуемого штамма связаны именно с его плазмидой pPA21A.

Для планирования дальнейших экспериментов мы провели биоинформатический анализ имеющейся нуклеотидной последовательности плазмиды. Присутствующая в базе данных последовательность pPA21A аннотирована с использованием автоматического конвейера Prokka [16] и является малоинформативной. Во избежание ошибок при дальнейших манипуляциях с плазмидой в начале работы был выполнен тщательный анализ аннотации плазмиды с коррекцией ошибок и неточностей.

В первую очередь нами был проведен поиск сходных нуклеотидных последовательностей в базе данных GenBank с помощью программы Nucleotide BLAST [7]. В результате было обнаружено сходство с плазмидой p29930 *Yersinia enterocolitica* [17] и плазмидоподобным элементом в хромосоме штамма *P. atrosepticum* SCRI104 [18]. Обнаруженные сходные с pPA21A последовательности сравнивали друг с другом с помощью программы Mauve [8]. На рисунке 1 представлены результаты выравнивания плазмид pPA21A, p29930 и плазмидоподобного элемента, интегрированного в хромосому штамма SCRI1043 *P. atrosepticum* (хромосомные координаты 1857204–1877617).

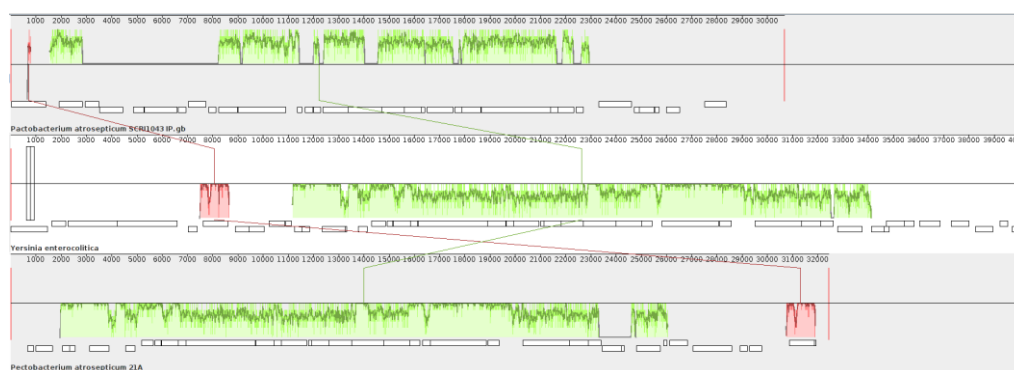


Рисунок 1. Результат проведения сравнительного анализа плазмидоподобного элемента хромосомы *P. atrosepticum* SCRI1043, плазмиды p29930 *Yersinia enterocolitica* и плазмиды pPA21A *Pectobacterium atrosepticum* 21A.

Как можно видеть на рисунке, сходство генов, кодирующих систему секреции IV типа плазмиды у pPA21A, p29930 и плазмидоподобного элемента в хромосоме *P. atrosepticum* SCRI1043 прослеживается достаточно четко (зеленый цвет). Кроме того, у плазмид pPA21A и p29930 имеется еще один участок сходства – ген *res* pPA21A и неохарактеризованный белок *orf6* p29930 (красный цвет), отсутствующий в хромосоме *P. atrosepticum* SCRI1043 [18]. Сходство с плазмидой p29930 *Yersinia enterocolitica* интересно еще так же тем, что для рода *Yersinia* показан вклад плазмид в вирулентность. Сходство же с интегрированным плазмидоподобным элементов в хромосоме SCRI1043 не менее любопытно и позволяет сделать предположение о том, что фенотипическое различие в реакции гиперчувствительности, вызываемой этими бактериями, обусловлено в первую очередь уникальными частями плазмиды, не имеющими сходства с плазмидоподобным элементом в хромосоме SCRI1043.

Далее был проведен сравнительный анализ предполагаемых продуктов генов плазмиды с уже аннотированными нуклеотидными последовательностями. Для этого использовалась геномный браузер SigmolD [9]. Как эталонные использовались последовательности, хранящиеся в базах данных GenBank, SwissProt и CDD [12–14]. По итогам анализа составлена отредактированная аннотация, которая и использовалась в данной работе для планирования экспериментов.

Наиболее важными, на наш взгляд, из обнаруженных генетических детерминант можно считать следующие.

В первую очередь обращает на себя внимание *vir*-область плазмиды, весьма сходная с таковой плазмиды *Y. enterocolitica* p29930 [17]. Идентичность областей плазмид pPA21A и p29930 составляет 70%. Данная область имеет в своем составе 12 генов (*virB1-virB11* и *eex*, координаты кластера 5968 — 15828). Гомология между белками *vir*-области pPA21A и *tri*-области p29930 *Y. enterocolitica* достаточно высока. Сходны между собой как сами белки, так и порядок расположения на плазмидах. Кроме того, продукты генов *vir*-области сходны с таковыми системы секреции IV типа Ti-плазмид *A. tumefaciens*. Наличие в pPA21A достаточных для построения функциональной системы секреции IV типа генов позволяет предположить её участие или в секреции факторов вирулентности, или в конъюгационном процессе. Это предположение подкрепляется данными по сходной плазмиде p29930 *Yersinia enterocolitica*, для которой показан конъюгативный перенос [17].

Не менее интересен и H-NS-подобный белок. Сходные с обнаруженной на исследуемой плазмиде генетические детерминанты встречаются у многих плазмид, влияющих на патогенность бактерий, [17]. Такие плазмиды часто кодируют белки, ассоциированные с нуклеоидом бактерий или их гомологи [19].

Следует отметить и рамку считывания, названная *pld*, продукт которой схож с фосфолипазой D. Этот белок (фосфолипаза D) может быть связан с реакцией гиперчувствительности [20]. Предполагается, что участие фосфолипазы D в реакции растений на контакт с патогеном может быть связано с тем, что реакция гиперчувствительности у резуховидки Таля на белки *Pseudomonas syringae* AvrRpm1 и AvrRpt2 индуцируется фосфатидной кислотой, являющейся продуктом расщепления клеточных липидов фосфолипазой D. При прямом введении фосфатидной кислоты в листья индуцируется защитная реакция растения и возникает проявление

гиперчувствительности [21; 22]. Возможно, кодируемая плазмидой pPA21A фосфолипаза D проявляет себя как один из факторов запуска реакции гиперчувствительности в листьях *Nicotiana tabacum*. Для некротрофного патогена *P. atrosepticum* отмершие клетки могут являться субстратом. Косвенным свидетельством участия фосфолипазы D в индукции реакции гиперчувствительности может являться еще и то, что этот белок (именно у *Pectobacterium atrosepticum* 21A) имеет в своем составе сигнал системы секреции II типа, что говорит о возможности ее секреции за пределы бактериальной клетки.

Не менее интересной является и рамка считывания, названная *sir2*, которая кодирует сиртуин-подобный белок. Данный белок сходен с сиртуинами класса II, главным образом присутствующими в цитоплазме. Однако они также могут транспортироваться в ядро [23]. Сиртуины обнаружены и у представителей семейства пасленовые – томатах, картошке и табаке [24–27]. Функция сиртуинов в растениях все еще плохо изучена, хотя, являясь деацетилазами гистонов, они участвуют в глобальной регуляции транскрипции. Кроме того, сиртуины участвуют в развитии реакции гиперчувствительности и клеточной смерти у растений [27].

Кроме того, были обнаружены сайты связывания транскрипционных регуляторов LexA и FNR. Данные глобальные регуляторы метаболизма клетки включают плазмиду в общий ансамбль генома клетки.

Для удобства дальнейшей работы изначально криптоическая плазида pPA21A была маркирована геном гентамицинустойчивости плазмиды pJQ200mp19 [28], что позволило контролировать ее наличие в клетках. Карта полученной конструкции приведена на рисунке 2.

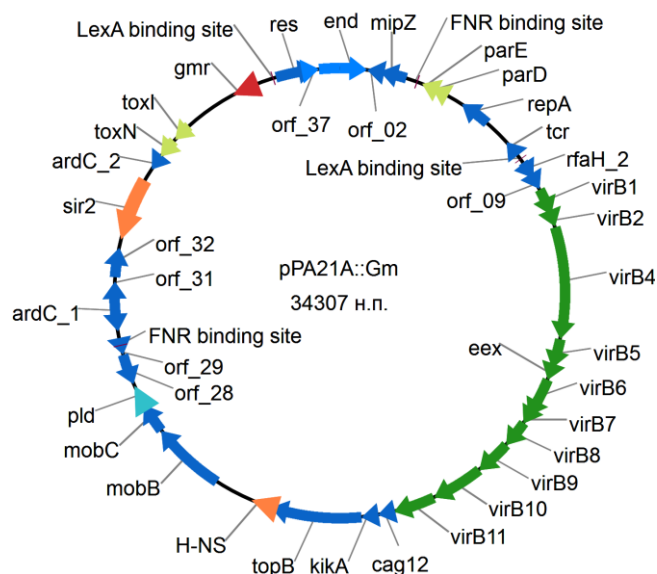


Рисунок 2. Карта плазмиды pPA21A::Gm.

Дальнейшая работа проводилась с использованием этого производного плазмиды (скрещивания, проверка реакции гиперчувствительности).

В результате экспериментов удалось установить, что частота переноса в внутривидовом (*E. coli*) скрещивании составила $2,1 \cdot 10^{-4}$ на клетку донора, частота переноса в межродовом (*E. coli* и *P. atrosepticum*) скрещивании составила $6,5 \cdot 10^{-5}$ на клетку донора.

Поскольку один из сайтов связывания транскрипционного регулятора LexA находится перед *vir*-кластером, мы предположили, что индукция SOS-ответа у донора может увеличивать частоту конъюгативного переноса плазмиды. При проверки этой гипотезы мы выяснили, что при внутривидовом скрещивании *E. coli* частота переноса

возрастала с $3,7 \cdot 10^{-4}$ (при нормальных условиях культивирования донора) до $2,8 \cdot 10^{-3}$ (при индукции у донора SOS-ответа митомицином C).

Для проверки влияния плазмиды pPA21A на вирулентность несущих ее бактерий, было проведено заражение растений табака различными штаммами *P. atrosepticum*: бесплазмидным SCRI1043, клонами SCRI1043, содержащими плазмиду pPA21A::Gm, и штаммами 21A. На рисунке 3 – фотография типичного фенотипического проявления реакции.



Рисунок 3. Результаты заражения табака *P. atrosepticum*

1 – Бесплазмидный штамм SCRI1043; 2, 3 – Клоны SCRI1043, содержащие pPA21A::Gm; 4, 5 – Клоны 21A.

На приведенных выше фотографиях можно ясно видеть, что версии штамма SCRI1043, несущие плазмиду pPA21A, вызывают более выраженную реакцию гиперчувствительности, чем тот же штамм, не несущий плазмиду. Тем не менее, реакция, вызываемая штаммом 21A, безусловно, более выражена. Это, предположительно, можно объяснить тем, что плазида pPA21A находится под контролем регуляторной системы клетки и функционирует в ней в составе единого ансамбля генома бактерии.

Заключение

Таким образом, исходя из данных, полученных в ходе проделанной работы, можно сделать следующие выводы:

1. Плазида pPA21A::Gm способна к конъюгативному переносу с частотой от $6,5 \cdot 10^{-5}$ до $2,1 \cdot 10^{-4}$.
2. Индукция SOS-ответа увеличивает частоту конъюгативного переноса плазмиды.
3. Плазида pPA21A связана с вирулентностью несущих ее бактерий. Она усиливает фенотипическое проявление реакции гиперчувствительности у несущих ее клонов по сравнению с бесплазмидными вариантами того же штамма *P. atrosepticum*.

Список литературы.

1. Genome Sequence of *Pectobacterium atrosepticum* Strain 21A / Y. Nikolaichik [et al.] // Genome Announcements. – 2014. – Vol. 2. – № 5. – P. e00935-14-e00935-14.
2. Сергеева Ж.Ю. Распространение внехромосомных кольцевых ДНК у *Erwinia carotovora* / Ж.Ю. Сергеева, Ф.И. Товкач // Доповіді Національної академії наук України. – 2008. – № 12. – P. 149–153.
3. Vergunst A.C. VirB/D4-Dependent Protein Translocation from *Agrobacterium* into Plant Cells / A.C. Vergunst // Science. – 2000. – Vol. 290. – № 5493. – P. 979-982.
4. Distribution and Replication of the Pathogenicity Plasmid pPATH in Diverse Populations of the Gall-Forming Bacterium *Pantoea agglomerans* / D.M. Weinthal [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2007. – Vol. 73. – № 23. – P. 7552-7561.
5. Stachel S.E. virA and virG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of *A. tumefaciens* / S.E. Stachel, P.C. Zambryski // Cell. – 1986. – Vol. 46. – № 3. – P. 325-333.
6. Евтушенков А.Н. Генетическая инженерия. Методически рекомендации к лабораторным занятиям. / А.Н. Евтушенков, Е.А. Николайчик. – Минск, 2003.
7. Basic local alignment search tool / S.F. Altschul [et al.] // Journal of Molecular Biology. – 1990. – Vol. 215. – № 3. – P. 403-410.
8. Darling A.C.E. Mauve: Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements / A.C.E. Darling // Genome Research. – 2004. – Vol. 14. – Mauve. – № 7. – P. 1394-1403.
9. Nikolaichik Y. Sigmoid: a user-friendly tool for improving bacterial genome annotation through analysis of transcription control signals / Y. Nikolaichik, A.U. Damienikan // PeerJ. – 2016. – Vol. 4. – Sigmoid. – P. e2056.
10. Николайчик Е.А. SQ - компьютерная программа для редактирования и анализа биологических последовательностей / Е.А. Николайчик, Л.Н. Валентович // Труды БГУ. – 2010. – Vol. 5. – № 1. – P. 154-162.
11. EffectiveDB—updates and novel features for a better annotation of bacterial secreted proteins and Type III, IV, VI secretion systems / V. Eichinger [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2016. – Vol. 44. – № D1. – P. D669-D674.
12. Bairoch A. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000 / A. Bairoch, R. Apweiler // Nucleic Acids Research. – 2000. – Vol. 28. – № 1. – P. 45-48.
13. CDD: NCBI's conserved domain database / A. Marchler-Bauer [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2015. – Vol. 43. – CDD. – № D1. – P. D222-D226.
14. GenBank / D.A. Benson [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2013. – Vol. 41. – № D1. – P. D36-D42.

15. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison / M. Richter [et al.] // Bioinformatics. – 2016. – Vol. 32. – JSpeciesWS. – № 6. – P. 929-931.
16. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation / T. Seemann // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 30. – Prokka. – № 14. – P. 2068-2069.
17. Strauch E. A cryptic plasmid of *Yersinia enterocolitica* encodes a conjugative transfer system related to the regions of CloDF13 Mob and IncX Pil / E. Strauch // Microbiology. – 2003. – Vol. 149. – № 10. – P. 2829-2845.
18. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors / K.S. Bell [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – Vol. 101. – № 30. – P. 11105-11110.
19. Distribution of Genes Encoding Nucleoid-Associated Protein Homologs in Plasmids / T. Takeda [et al.] // International Journal of Evolutionary Biology. – 2011. – Vol. 2011. – P. 1-30.
20. Wang X. Plant phospholipases / X. Wang // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. – 2001. – Vol. 52. – P. 211-231.
21. Park J. Phosphatidic Acid Induces Leaf Cell Death in Arabidopsis by Activating the Rho-Related Small G Protein GTPase-Mediated Pathway of Reactive Oxygen Species Generation / J. Park // Plant Physiology. – 2004. – Vol. 134. – № 1. – P. 129-136.
22. Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1- and AvrRpt2-induced disease resistance responses in *Arabidopsis thaliana* / M.X. Andersson [et al.] // The Plant Journal. – 2006. – Vol. 47. – № 6. – P. 947-959.
23. The role of sirtuins in cellular homeostasis / W. Kupis [et al.] // Journal of Physiology and Biochemistry. – 2016. – Vol. 72. – № 3. – P. 371-380.
24. Identification and characterization of histone deacetylases in tomato (*Solanum lycopersicum*) / L. Zhao [et al.] // Frontiers in Plant Science. – 2015. – Vol. 5.
25. Fertilization induces strong accumulation of a histone deacetylase (HD2) and of other chromatin-remodeling proteins in restricted areas of the ovules / M. Lagacé [et al.] // Plant Molecular Biology. – 2003. – Vol. 53. – № 6. – P. 759-769.
26. Genome-wide analysis of histone modifiers in tomato: gaining an insight into their developmental roles / R. Aiese Cigliano [et al.] // BMC Genomics. – 2013. – Vol. 14. – Genome-wide analysis of histone modifiers in tomato. – № 1. – P. 57.
27. Type-2 histone deacetylases as new regulators of elicitor-induced cell death in plants / S. Bourque [et al.] // New Phytologist. – 2011. – Vol. 192. – № 1. – P. 127-139.
28. Quandt J. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria / J. Quandt, M.F. Hynes // Gene. – 1993. – Vol. 127. – № 1. – P. 15-21.

