

Министерство образования и науки
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
Пушкинский государственный естественно-научный институт

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г. К. Скрыбина РАН

На правах рукописи

ЕКИМОВА ГАЛИНА АЛЕКСАНДРОВНА

Филогенетическая и биохимическая характеристика
1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминаз и
D-цистеиндесульфогидаз у представителей рода *Methylobacterium*

(03.02.03 – Микробиология)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
д.б.н., в.н.с. Н. В. Доронина

Пушино
2018

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1. Влияние бактерий-фитосимбионтов на уровень фитогормонов	7
1.1 Синтез ауксинов	8
1.2 Синтез цитокининов	11
1.3 Синтез гиббереллинов	13
1.4 Снижение уровня «стрессового этилена»	15
1.5 Образование сероводорода	22
2. Особенности метаболизма аэробных метилотрофных бактерий	25
2.1 Пути окисления C1-соединений	26
2.2 Пути ассимиляции C1-соединений	27
2.3 Центральный метаболизм	29
3. Аэробные метилотрофные бактерии как фитосимбионты	30
3.1 Разнообразие, распространение и роль метилотрофных фитосимбионтов	30
3.2 Синтез фитогормонов аэробными метилотрофными бактериями	33
3.3 Влияние метилотрофных бактерий на уровень этилена	35
3.4 D-цистеиндесульфогидраза у метилотрофных бактерий	36
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	37
4. Материалы и методы	37
4.1 Объекты исследований	37
4.2 Условия культивирования	40
4.3 Основные молекулярно-генетические методы	40
4.3.1 Выделение геномной ДНК	40
4.3.2 Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции	41
4.3.3 Очистка фрагментов ДНК	41
4.3.4 Лигирование фрагментов ДНК	41
4.3.5 Получение компетентных клеток и их трансформация	42
4.3.6 Выделение плазмид из рекомбинантных клонов.	42
4.4 Конструирование и подбор праймеров для ПЦР-скрининга генов <i>acdS</i> и <i>dcyD</i> у представителей рода <i>Methylobacterium</i>	43
4.5 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	46

4.6 Секвенирование ДНК	46
4.7 Филогенетический анализ	46
4.8 Получение мутантов <i>M. radiotolerans</i> с делециями в генах <i>acdS</i> и <i>acdR</i>	47
4.9 Получение комплементированных мутантов <i>M. radiotolerans</i> по генам <i>acdS</i> и <i>acdR</i>	49
4.10 Определение активности АЦК-деаминазы у различных штаммов <i>M. radiotolerans</i>	50
4.11 Создание векторов для сверхэкспрессии рекомбинантных белков	51
4.12 Основные биохимические методы	51
4.12.1 Экспрессия и очистка рекомбинантных белков His ₆ -AcdS и His ₆ -AcdR	51
4.12.2 Определение физико-химических свойств ферментов	52
4.12.3 Статистическая обработка данных	52
4.12.4 Гельпроникающая хроматография	52
4.12.5 Нативный ПААГ-электрофорез	53
4.13 Анализ образования комплексов AcdR - ДНК методом задержки в геле	53
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	54
5. Обсуждение полученных результатов	54
5.1 ПЦР-скрининг генов АЦК-деаминазы и D-цистеиндесульфогидразы у аэробных метилотрофных бактерий	54
5.2 Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов	58
5.3 Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей АЦК-деаминаз и D-цистеиндесульфогидраз	60
5.4 Клонирование и характеристика 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминаз из <i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060 и <i>Amycolatopsis methanolica</i> 239	68
5.5 Филогенетический анализ аминокислотной последовательности регуляторного белка AcdR <i>M. radiotolerans</i>	75
5.6 Клонирование гена и очистка белка-регулятора экспрессии АЦК-деаминазы из <i>M. radiotolerans</i> JCM2831	78
5.7 Описание условий связывания AcdR с ДНК-фрагментом	78
5.8 Получение и характеристика мутантов <i>M. radiotolerans</i> по генам <i>acdS</i> и <i>acdR</i>	81
5.9 Определение функциональной активности AcdR в клетках <i>E. coli</i>	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	86
ВЫВОДЫ	88
Список сокращений и условных обозначений	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	90

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Аэробные метилотрофные бактерии – обширная группа метилотрофных прокариот, использующих окисленные и замещенные производные метана в качестве источников углерода и энергии. В настоящее время известно, что многие аэробные метиловобактерии симбиотически связаны с растениями, колонизируя с высокой плотностью листовую поверхность, присутствуют в ризосфере и в семенах (Corpe, Rheem 1989; Holland 1997; Доронина 1999; Доронина с соавт., 2004; Троценко с соавт., 2010; Федоров с соавт., 2011; Vorholt, 2012). Взаимосвязь растений с метилотрофами обусловлена, с одной стороны, тем, что растения выделяют в окружающую среду метанол, формальдегид, формиат, метилированные амины, метилсернистые соединения и галометаны (Galbally, Kirstine, 2002; Keppler et al., 2006), которые активно потребляют метилотрофы. С другой стороны, метилотрофные бактерии стимулируют рост и развитие растений за счет биосинтеза фитогормонов (ауксинов, цитокининов, гиббереллинов), витаминов, повышают фотосинтетическую активность и устойчивость к фитопатогенам и тяжелым металлам, а также фиксируют молекулярный азот (Sy et al., 2001; Иванова с соавт., 2000; Cervantes-Martí, López-Dí 2004; Федоров с соавт., 2010; Агафонова с соавт., 2016, 2018).

Кроме того, при росте на поверхности и внутри тканей растений бактерии могут использовать в качестве источников питания различные метаболиты растений, такие как аминокислоты. Особую роль в фитосимбиозе занимает деградация бактериями 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) – предшественника в биосинтезе этилена растениями. Этилен – один из основных фитогормонов, он играет важную роль в развитии корневой системы, созревании плодов, а также в передаче стрессового сигнала. В неблагоприятных условиях, таких как температурный, солевой и другие стрессы, концентрация этилена в тканях растений увеличивается. Как часть стрессовой реакции он ингибирует удлинение корня, нодуляцию и транспорт ауксинов, ускоряет старение тканей и вызывает дефолиацию (Arshad, Frankenberger, 2002). Бактерии, обладающие ферментом АЦК-деаминазой, который деградирует АЦК до неактивных α -кетобутирата и ионов аммония, способствуют снижению концентрации этилена и повышению устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам (Glick et al., 2007a).

Помимо этого, у растений и ряда бактерий обнаружен фермент, отличающийся высоким уровнем сходства аминокислотной последовательности с АЦК-деаминазой – D-цистеиндисульфогидраза, который катализирует деградацию D-цистеина до пирувата, сероводорода и аммиака. Активность этого фермента определяет устойчивость бактерий к токсичному для них D-цистеину, а выделяющийся при его деградации сероводород обладает фунгицидными свойствами и по последним данным регулирует множество физиологических процессов у растений (Soutourina et al. 2001; Wang, 2012; Li, 2013; Li, Zhu, 2014; Li et al., 2014).

Предполагается, что по этим причинам D-цистеиндесульфогидраза также принимает участие в формировании ассоциаций бактерий с растениями.

Несмотря на интенсивное изучение метаболических основ фитосимбиоза метилотрофов, остаются неизвестными многие вопросы относительно ферментов, определяющих взаимодействие бактерий с растениями, в том числе регуляции генов, кодирующих эти белки.

Цель и задачи исследования. Цель данной работы – изучение распространения генов АЦК-деаминаз и D-цистеиндесульфогидраз, биохимических свойств, а также транскрипционной регуляции экспрессии генов этих ферментов у аэробных метилотрофных бактерий.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать систему вырожденных олигонуклеотидных праймеров для ПЦР-амплификации генов 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазы (*acdS*) и D-цистеиндесульфогидразы (*dcyD*), ферментов катаболизма растительных аминокислот, и проанализировать их распространение среди аэробных метилотрофных бактерий.

2. Клонировать гены *acdS*, выделить и охарактеризовать рекомбинантные АЦК-деаминазы из *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и *Amycolatopsis methanolica* 239.

3. Получить и охарактеризовать мутантные штаммы *M. radiotolerans* JCM 2831 с делециями в генах *acdS* и *acdR*, а также их комплементированные варианты.

4. Клонировать ген *acdR* и очистить предполагаемый транскрипционный белок-регулятор из *M. radiotolerans* JCM 2831 и выяснить его роль в регуляции гена *acdS* *M. radiotolerans*.

Научная новизна работы. Впервые у метилотрофов различного таксономического положения проведен скрининг на наличие генов ферментов катаболизма растительных аминокислот – 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты и D-цистеина – АЦК-деаминазы и D-цистеиндесульфогидразы, а также проведен филогенетический анализ транслированных аминокислотных последовательностей этих генов.

Клонированы гены и охарактеризованы рекомбинантные АЦК-деаминазы из *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и факультативно метилотрофной актинобактерии *Amycolatopsis methanolica* 239.

Впервые для метилотрофов получены делеционные мутанты эпифитной метилотрофной бактерии *M. radiotolerans* по структурному (*acdS*) и регуляторному (*acdR*) генам АЦК-деаминазы, а также их комплементированные варианты, проанализирована их способность к деградации АЦК.

Впервые для альфапротеобактерий клонирован и очищен регуляторный белок AcdR, относящийся в Lgr-семейству, а также выявлена его роль в регуляции АЦК-деаминазы у *M. radiotolerans*.

Научно-практическое значение работы. Данная работа расширяет и углубляет знания о механизмах симбиоза мезофильных азотфиксаторов с растениями, что позволяет лучше реализовать их биотехнологический потенциал, разработать новые биопрепараты-стимуляторы роста и развития растений с заданными свойствами, повышающие продуктивность и устойчивость растений к стрессовым воздействиям и фитопатогенам.

Разработанные системы выродженных олигонуклеотидных праймеров для детекции и амплификации генов АЦК-дезаминаз (*acdS*) и D-цистеиндесульфогидаз (*dcyD*) позволяют в дальнейшем оценить способность бактерий различного таксономического положения в чистых культурах и сообществах к деградации растительных аминокислот.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на 15-18, 20-й международных школах-конференциях «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2011–2016 гг.); на VIII Молодёжной конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2011 г.); V Всероссийском с международным участием медико-биологическом конгрессе молодых ученых «Симбиоз-Россия 2012» (Тверь, 2012 г.); Всероссийском симпозиуме с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, 2014 г.); на конференциях «Экотоксикология» (Тула, 2011, 2013 гг.); отчетных конференциях ИБФМ РАН (Пушино, 2011, 2014, 2012 и 2017 гг.), симпозиуме «Биоразнообразие: геномика и эволюция» (Новосибирск, 2018 г.)

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 работ, из них 3 статьи – в рекомендованных ВАК РФ рецензируемых научных журналах, входящих в международные базы данных.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, экспериментальной части, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Текст работы занимает 107 страниц, содержит 37 рисунков и 8 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 226 ссылок.

Благодарности. Автор глубоко признателен д.б.н., Дорониной Н.В., зав. лабораторией радиоактивных изотопов, д.б.н., проф. Троценко Ю.А. и к.б.н. Федорову Д.Н. за ценное руководство в проведении работы, постоянное внимание и поддержку на всех этапах работы. При выполнении диссертационной работы автор пользовался советами и помощью к.б.н. Мустахимова И.И. и Панкратовой К.М. и выражает им искреннюю благодарность. Автор благодарен Akio Tani (Institute of Plant Science and Resources, Okayama University) за предоставление для работы ряда типовых штаммов аэробных мезофильных азотфиксаторов, Глухову А. С. (Институт белка РАН) за проведение беспленочной радиоавтографии.

Работа поддержана грантами: РФФИ №№ 12-04-31373-мол_а, 14-04-32202-мол_а, 16-04-00381-а, 18-34-00998 мол_а, РФФИ №14-14-01045, ГЗ №6.749.2014/к.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Влияние бактерий-фитосимбионтов на уровень фитогормонов

Жизненный цикл растений происходит в тесном контакте с микроорганизмами. В ходе эволюции бактерии развили ряд стратегий, позволяющих им использовать растения как экологическую нишу. Эти взаимоотношения в одних случаях формируются по типу антагонизма, в других – как симбиотическое сосуществование, повышающее адаптационные возможности растений и их продуктивность.

В настоящее время исследование растительно-микробных ассоциаций приобрело особое значение в связи с загрязнением окружающей среды в результате повсеместного использования химических удобрений, пестицидов, гербицидов и фунгицидов. Применение различных химических средств приводит к целому ряду негативных последствий, поэтому актуальной задачей исследователей является поиск альтернативных способов увеличения продуктивности сельскохозяйственных культур и защиты их от фитопатогенов. Оптимальной альтернативой может стать использование бактерий, стимулирующих рост растений (Sarwar, 2015; Nawaz et al., 2016).

Бактерии, ассоциированные с растениями, разделяют на ризосферные (связанные с корневой системой), филлосферные или эпифитные (прикрепляющиеся к наземным частям растений) и эндофитные (обитающие в тканях растений без формирования для этого специальных структур, не причиняя вреда хозяину) (Reinhold-Hurek, Hurek, 2011). Наибольшее количество этих микроорганизмов обычно локализуется в прикорневой области (ризосфере), вероятно, из-за высоких концентраций корневых экссудатов, используемых бактериями для своего роста (Kuiper et al., 2004; Lynch, Whipps 1990).

Таксономически стимулирующие рост растений бактерии (СРРБ) чрезвычайно разнообразны, наиболее изучены представители родов *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* и *Rhizobium*). Они обладают одним или несколькими свойствами, которые повышают устойчивость растений к внешним воздействиям. Некоторые бактерии приспособились напрямую влиять на развитие растений, регулируя уровень фитогормонов в их клетках и, в конечном итоге, способствуют формированию системной устойчивости у растений к негативным факторам среды (Glick et al., 2007a).

Фитогормоны – органические соединения, которые обладают высокой активностью в очень низких концентрациях (10^{-6} – 10^{-12} М), включая и регулируя физиологические процессы растений (Полевой, 1982). Фитогормоны обычно делят на 5 групп: ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизовая кислота и этилен. Они синтезируются во многих органах и легко перемещаются не только между клетками и органами растения, но и от одного растения к

другому (например, газообразный этилен). Фитогормоны весьма разнообразны по химической природе – это производные аминокислот (ауксины) и азотистых оснований нуклеотидов (цитокинины), терпеноиды (гиббереллины, абсцизовая кислота), алкены (этилен), небольшие белки. К ним также относят жасмоновую и салициловую кислоты, brassinosterоиды и стриголактоны (Neumann et al., 2009; Wani et al., 2016).

1.1 Синтез ауксинов

Ауксины – класс растительных гормонов, производных индола, образующихся в апикальных меристемах растений. Известно, что около 80% ризосферных бактерий могут синтезировать и высвобождать ауксины в качестве вторичного метаболита (Patten, Glick, 1996). Наиболее распространенным среди них является индолил-3-уксусная кислота (ИУК), фактически, часто под ауксинами подразумевается именно это вещество (Sraeren et al., 2007). Другие соединения, которые обладают ауксиновой активностью, можно рассматривать как предшественники ИУК – индолилпиридиноградная (ИПвК), индолилмолочная (ИМК) кислоты, индолилацетонитрил, индолилацетальдегид, индолилацетамид, триптамин, триптофол, либо как продукты ее дальнейшего превращения (рисунок 1.1.1). Однако их активность значительно ниже.

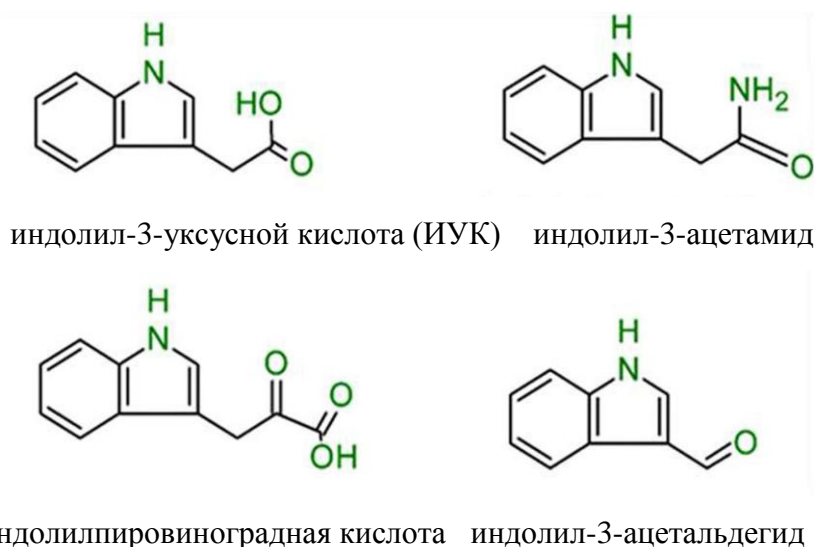


Рисунок 1.1.1 Индолил-3-уксусная кислота и некоторые ее предшественники.

Действие ИУК охватывает практически все аспекты роста и развития растения, она играет важную роль в геотропизме и фототропизме растений, делении, растяжении и дифференциации клеток, апикальном доминировании, индуцирует заложение корней в культуре тканей, регулирует рост корня и образование придаточных корней (Троценко с соавт., 2001; Grobelak et al., 2015). Появляются данные о том, что ИУК играет роль в адаптации растений к солевому стрессу (Iqbal et al., 2014; Fahad et al., 2015), улучшает рост корней и побегов растений, произрастающих в условиях солености или загрязнения тяжелыми металлами (Sheng, Xia, 2006;

Egamberdieva, 2009). Показано, что ризобактериальная ИУК повышает пул ауксинов растений, в конечном счете увеличивает длину и площадь корней и таким образом повышает уровень корневых экссудатов (Ali et al., 2010). Ауксин стимулирует транскрипцию большого количества генов, называемых генами первичного ауксинового ответа; эти гены идентифицированы и охарактеризованы у нескольких видов растений, включая рис, арабидопсис и сою (Javid et al., 2011).

Интересно, что растения различных видов, сортов и возрастов чувствительны к различному уровню ауксина (Cheng et al., 2013). Кроме того, оптимальный уровень ауксина, который эффективен для стимуляции роста растений, примерно на пять порядков ниже для корней по сравнению с побегами (Glick, 2012). Более того, концентрация синтезированного растениями ауксина определяет его влияние на стимуляцию или ингибирование роста растений. Концентрация ауксина в растении может быть либо субоптимальной, либо оптимальной, поэтому добавление бактериального ауксина может изменить уровень гормонов в растении до оптимального или сверхоптимального (Glick, 2012). Таким образом, бактериальная ИУК, продуцируемая СРРБ, может либо стимулировать развитие корней в тех случаях, когда концентрация её у растений субоптимальна, либо ингибировать развитие корня, когда уровень ауксина уже является оптимальным (Sraeren et al., 2007). Поэтому бактерии, синтезирующие и экскретирующие ИУК, могут оказывать как положительное влияние на рост и развитие растений (*Azospirillum*, *Rhizobium*), так и отрицательное, когда ИУК выступает в качестве фактора патогенности.

Большинство ауксинов синтезируется из аминокислоты триптофана, присутствующей в корневых экссудатах растений в низких концентрациях, различных в зависимости от генотипа растения. ИУК, по-видимому, синтезируется различными путями биосинтеза, причем каждый путь назван по ключевому интермедиату. Это индолил-3-пируватный путь, индолил-3-ацетамидный путь, индолил-3-ацетальдоксим/индолил-3-ацетонитрильный путь (Dusa et al., 2014), индолил-3-ацетальдегидный путь и триптаминовый путь (рисунок 1.1.2). Следует отметить, что различные СРРБ могут иметь один, два или даже три функциональных пути биосинтеза ИУК, что указывает на важность ее синтеза для нормального функционирования бактерии. Индолил-3-ацетамидный путь встречается главным образом у фитопатогенных микроорганизмов, в то время как индолил-3-пируватный путь у эпифитной и ризосферой микробиоты. Ген *ipdC*, один из генов, участвующих в синтезе ИУК в СРРБ, регулируется количеством продуцируемой ИУК по принципу положительной обратной связи в повышающей регуляции экспрессии этого гена (Sraeren, Vanderleyden 2011). Впервые это было обнаружено у *Azospirillum brasiliense* Sp245 (Broek et al., 2005). ИУК активно участвует в регуляции ее

биосинтетических генов, поскольку определяет активацию, инактивацию, повышенную или сниженную экспрессию.

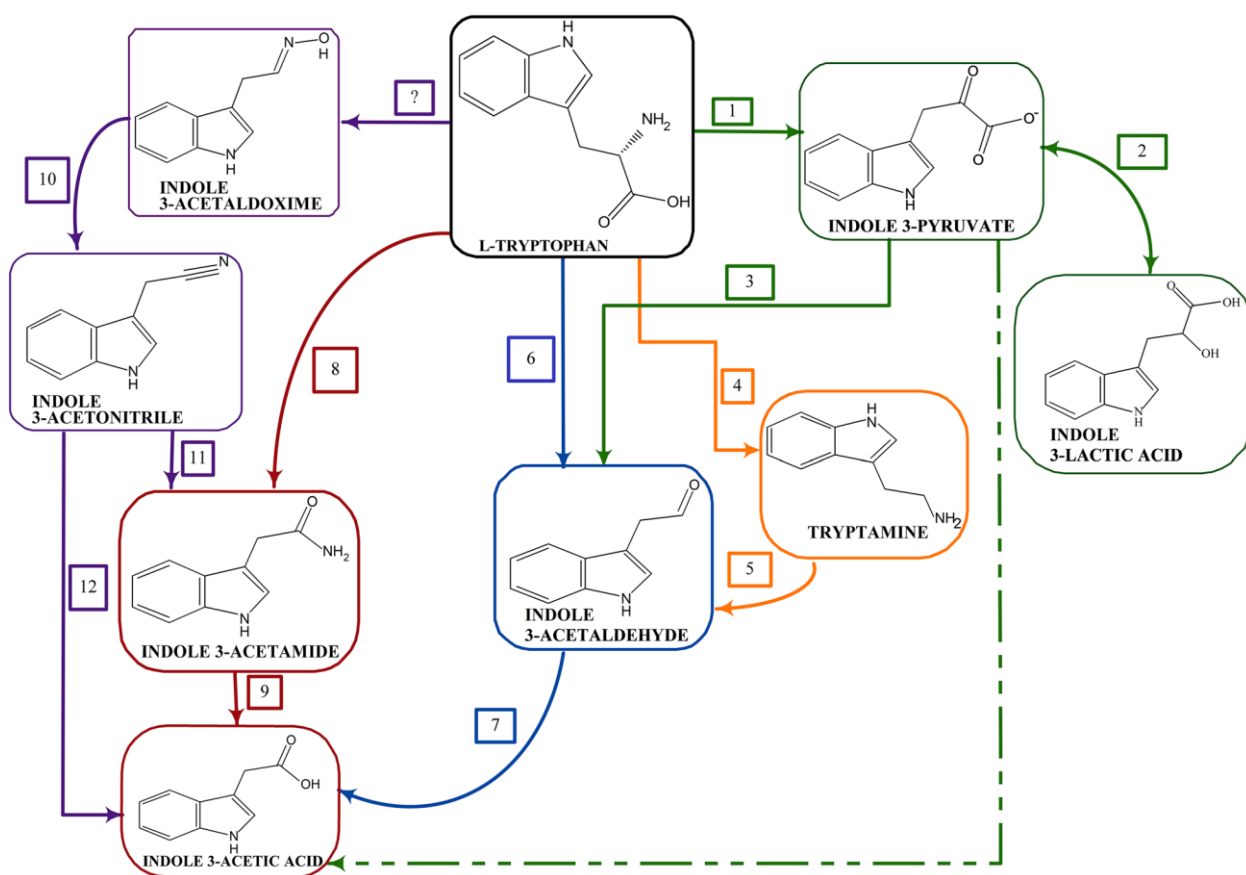


Рисунок 1.1.2 Схема известных путей синтеза ИУК у бактерий. Пунктирными линиями обозначены неферментативные реакции (Olanrewaju et al., 2017) Ферменты: 1 – триптофанамиотрансфераза, 2 – индолиллактидегидрогеназа, 3 – индолил-3-пируватдекарбоксилаза, 4 – триптофандекарбоксилаза, 5 – аминоксидаза, 6 – оксидаза боковой цепи триптофана, 7 – индолил-3-ацетальдегидоксидаза, 8 – триптофан-2-монооксигеназа, 9 – индолилацетамингидролаза, 10 – ацеталдоксимдегидратаза, 11 – нитрилгидратаза, 12 – нитрилаза, знаком вопроса обозначен пока неизвестный фермент.

Кроме того, ИУК рассматривается как сигнальная молекула бактерий (Федоров с соавт., 2011). Добавление ауксина в среду для выращивания *Methylobacterium extorquens* AM1 увеличило активности ферментов первичного C₁- и центрального метаболизма, особенно у мутанта *M. extorquens* AM1 *DipdC* с нарушенным биосинтезом ИУК (Федоров с соавт., 2009). Учитывая, что *M. extorquens* способен к биосинтезу ИУК, это соединение может служить авторегулятором метаболизма бактерий в условиях эпифитного роста.

Гены биосинтеза ауксина могут быть локализованы как в хромосоме, так и на плазмиде и переноситься горизонтально. Например, у *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* и *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, патогенов древесных растений, гены расположены на плазмиде и хромосомной ДНК соответственно. Кроме того, показано, что в этом случае ИУК также

выступает в роли сигнальной молекулы и влияет на экспрессию генов, обуславливающих вирулентность этих штаммов, в частности секреторных систем 3 и 6 типа (Aragón et al., 2014).

1.2 Синтез цитокининов

Цитокинины – это группа фитогормонов, производных азотистого основания пурина, которая получила своё название в связи со способностью стимулировать клеточное деление (цитокинез). Цитокинины широко распространены у водорослей, высших растений и бактерий, однако о роли продуцируемых бактериями цитокининов информации относительно немного.

Цитокинины обладают многообразным физиологическим действием и жизненно важны для роста и развития растений. Они активируют деление клеток, стимулируют развитие боковых побегов (снятие апикального доминирования), в культуре клеток способствуют клеточной дифференцировке (De Rybel et al., 2016). Цитокинины усиливают способность клеток притягивать питательные вещества (аттрагирующий эффект), активируют формирование хлоропластов и усиливают газообмен растений за счет открывания устьиц. У многих растений цитокинины способствуют прорастанию семян и повышают их всхожесть (Sakakibara, 2006). Кроме того, они увеличивают размеры клеток листа и тем самым усиливают рост молодых листьев. Цитокинины обладают и определенным защитным действием на растения против неблагоприятных внешних условий (Троценко с соавт., 2001; O'Brien, Benkova, 2013; Fahad et al., 2015).

Кинетин был первым обнаруженным цитокинином, однако он считается «синтетическим» из-за его источника, которым оказались дрожжи, а не растения (Miller et al., 1955). Широко известный и распространенный у растений цитокинин – зеатин был впервые выделен из кукурузы (*Zea mays*) (Schäfer et al., 2015). Цитокинины образуются главным образом в кончиках корней и перемещаются в верхние части растения по ксилеме; заметные количества цитокининов обнаруживаются и во флоэме. Выделяют две группы цитокининов на основе их структуры: аденинового типа и типа фенилмочевины. Адениновый тип включает кинетин, бензиладенин и зеатин, тогда как тип фенилмочевины включает дифенилмочевину и тидиазурон, синтетические аналоги цитокининов (рисунок 1.2.1).

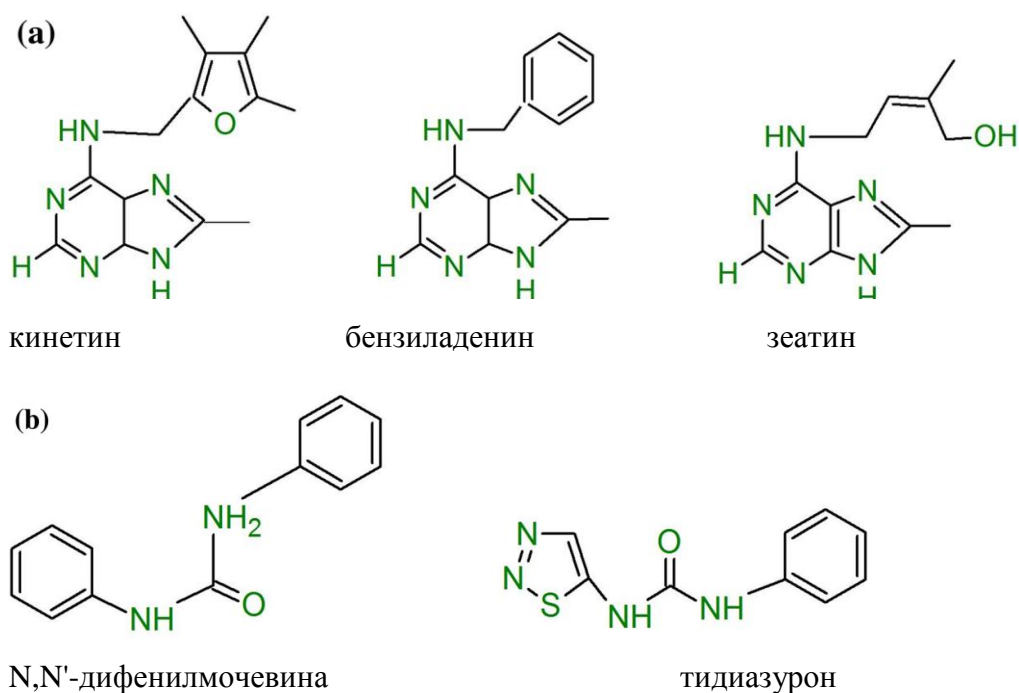
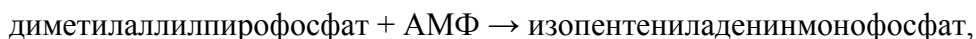


Рисунок 1.2.1 Цитокинины аденинового типа (а) и типа фенилмочевины (б).

Известно несколько источников цитокининов в клетке. Синтез цитокининов *de novo* у микроорганизмов, в основном, осуществляется изопентенилтрансферазами, катализирующими реакцию:



который затем модифицируется и приводит к образованию изопентениладенозина, изопентениладенина, зеатинрибозида и зеатина (Kakimoto, 2003). Альтернативный или непрямой биосинтез цитокининов осуществляется путем изопентенилирования аденинового основания, прикрепленного к антикодону петле некоторых тРНК. Данную реакцию катализирует тРНК-изопентенилтрансфераза, кодируемая геном *miaA*, причем источником изопентенильной группы служит мевалоновая кислота. При деградации такой тРНК цитокинины переходят в свободную форму. В большинстве случаев при деградации тРНК образуются неактивные *цис*-изомеры зеатина, в отличие от активных *транс*-изомеров, синтезируемых *de novo*. Известны примеры образования *транс*-изомеров зеатина при деградации тРНК (Koenig et al., 2002; Kakimoto, 2003).

Экспрессия генов цитокинина относительно очевидна у ряда СРРБ и инокуляция ими может в значительной степени изменить фитогормональную композицию растения. Содержание цитокинина и рост растений были увеличены в результате инокуляции салата штаммом *Bacillus subtilis* (Arkhipova et al., 2005). Следует отметить, что зачастую функциональная роль цитокининов в некоторых экспериментах основана на добавлении очищенных гормонов к

отдельным растениям. Показано, что в этих экспериментах цитокинины приводят к задержке старения растений путем накопления хлорофилла, развития корней, образования корневых волосков, стимуляции роста стебля и листьев (Sakakibara, 2006).

Генетически модифицированный штамм *Sinorhizobium meliloti*, со сверхэкспрессией цитокинина, был исследован на способность защитить люцерну от негативных эффектов, вызванных засухой. Полученный штамм продуцировал примерно в пять раз больше цитокинина, чем дикий тип. После периода стресса, вызванного сильной засухой, наблюдалось значительное увеличение размеров растений люцерны, инокулированных трансформированным штаммом, по сравнению с растениями, инокулированными диким штаммом. Таким образом, ризобийные штаммы, синтезирующие большее количество цитокинина, способствуют увеличению устойчивости к засухе у люцерны (Xu et al., 2012).

1.3 Синтез гиббереллинов

Гиббереллины – это большая группа тетрациклических дитерпеноидных карбоновых кислот, имеющих углеродные скелеты C₂₀ или C₁₉ (Dodd et al., 2010; Hedden, Thomas, 2012). Впервые гиббереллины были обнаружены у гриба, патогена риса, *Fusarium moniliforme* (ранее *Gibberella fujikuroi* или *Fusarium fujikuroi*) (Kurosawa, 1926), а затем у растений (GA₁) в семенах *Phaseolus coccineus* (MacMillan, Suter, 1958). В настоящее время идентифицированы 136 гиббереллиновых структур и обозначенных как GA₁ – GA₁₃₆ (Hedden, Thomas 2012). Только 4 из них являются биоактивными – это GA₁, GA₃, GA₄ и GA₇ (Yamaguchi, 2008) (рисунок 1.3.1) У бактерий были идентифицированы 4 GA: GA₁, GA₃, GA₄ и GA₂₀ (Gupta et al., 2016), причем GA₁ и GA₄ являются наиболее активными (Nelson, Steber, 2016). Гиббереллины известны стимуляцией роста и активацией важных процессов, включая удлинение стебля, прорастание семян, цветение, процесс завязывания плодов (Zaidi et al., 2015), увеличение скорости фотосинтеза и содержания хлорофилла в клетках (Khan et al., 2015; You et al., 2012). Недостаток гиббереллинов у растений легко заметен по сокращению числа и длины боковых корней (Dodd et al., 2010).

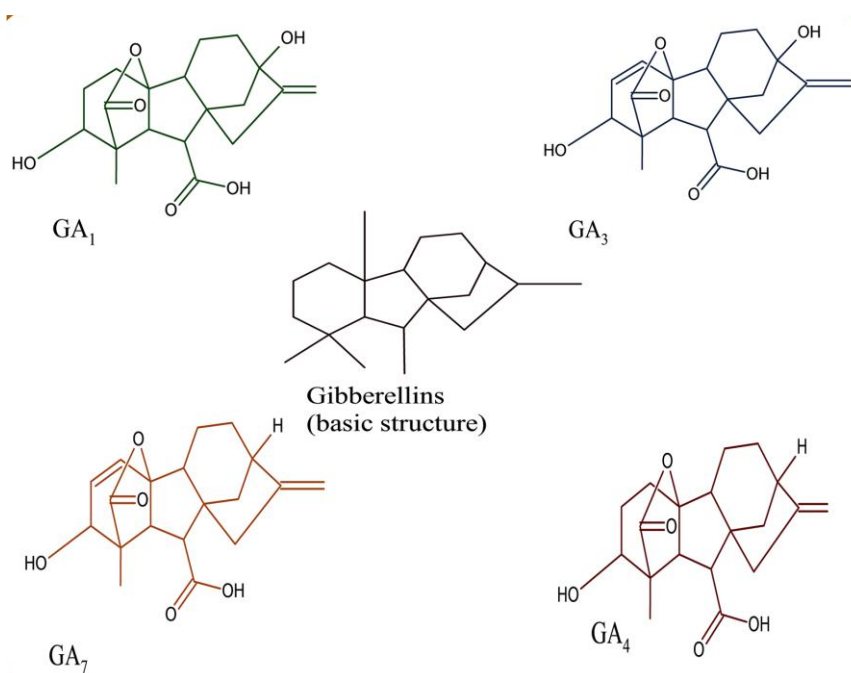


Рисунок 1.3.1 Структура гиббереллинов.

Гиббереллины могут индуцировать рост и развитие побегов, а также ингибировать рост корней благодаря действию сигнальной системы – DELLA-белков (Martínez et al., 2016; Minguet et al., 2014; Nelson, Steber, 2016; Wang et al., 2015). DELLA-белки являются репрессорами отклика растений на гиббереллины. Установлено, что ответ растений на гиббереллины зависит от деградации DELLA-белков, которые конститутивно связаны с промоторами гиббереллин-регулируемых генов. Так, мутанты растений с потерей функций генов, кодирующих DELLA-белки, обладают повышенной чувствительностью к гиббереллинам, напротив, мутанты с усилением их функций и трансгенные растения со сверхэкспрессией генов DELLA-белков являются карликовыми (Vera-Sirera et al., 2015).

Несмотря на то, что известно множество данных о путях биосинтеза гиббереллинов у растений и грибов, о синтезе гиббереллинов у бактерий известно немного. В исследованиях путей биосинтеза гиббереллинов у *Azospirillum lipoferum* и *Azospirillum brasilense* показано, что первые стадии регулируются с помощью цитохром P450-зависимых монооксигеназ (Tully et al., 1998; Cassán et al., 2001), а поздние стадии гидроксилирования – 2-оксоглутарат-зависимыми диоксигеназами (2ODD), как и у высших растений (Cassán et al., 2001).

Образование гиббереллинов наблюдали у ряда СРРБ: *Achromobacter xylooxidans*, *Gluconobacter diazotrophicus*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobia* ssp, *Azotobacter* spp., *Bacillus* spp., *Herbaspirillum seropedicae* и *Azospirillum* spp. (Deka et al., 2015; Dodd et al., 2010). Недавно была доказана способность облигатного метилотрофа *Methylobacillus arboreus* Iva^T к синтезу биоактивной гибберелловой кислоты GA₃ (Агафонова с соавт., 2018).

Кроме того, на *Azospirillum* sp. продемонстрировано, что бактерии могут образовывать гиббереллины *in vitro* (Piccoli, Bottini, 1994), а также в ассоциации с высшими растениями (Cassan et al., 2001). Инокуляция карликового риса, неспособного синтезировать гиббереллины, diaзотрофными бактериями рода *Azospirillum* существенно стимулировала рост растений. Данный эффект связали со способностью бактерий метаболизировать экзогенно добавленную GA₂₀ в биологически активную форму GA₁ (Моргун с соавт., 2009). Как и в случае цитокининов, в настоящее время большая часть функциональной роли гиббереллинов бактериального происхождения в стимуляции роста растений установлена посредством изучения реакцией растения на экзогенно добавленные очищенные гиббереллины.

1.4 Снижение уровня «стрессового этилена»

Этилен – газообразный фитогормон, при оптимальной концентрации в процессе развития растения он регулирует формирование корня и ксилемы, индуцирует созревание плодов и увядание цветков. Этот гормон влияет на пол цветков, вызывая образование женских у растений, для которых характерны раздельные мужские и женские цветки (Кулаева 1998). Этилен играет важную роль в развитии корневой системы, нодуляции, а также в передаче стрессового сигнала (Arshad, Frankenberger, 2012). Превышение пороговой концентрации этилена в тканях растения является ответом на различные стрессы, включая присутствие в почве тяжелых металлов, загрязнение химическими веществами, экстремальные температуры, обилие или недостаток влаги, наличие грибковых и бактериальных патогенов, повреждение насекомыми, нематодами или механическое (Ali et al., 2014; Barnawal et al., 2012; Glick et al., 2007). Как часть стрессовой реакции он ингибирует удлинение корня, нодуляцию и транспорт ауксинов, вызывает гипертрофию, ускоряет старение тканей, вызывает дефолиацию (Prayitno et al., 2006; Sun et al., 2009). Так называемый «стрессовый этилен» угнетает рост стебля в длину и вызывает его утолщение. Помимо этого, этилен вызывает и другие изменения в растениях, например, эпинастию, изменяющую угол наклона листа по отношению к стеблю (опущение листьев) (Кулаева, 1998).

Синтез этилена у определенного растения зависит от присутствия и концентрации других фитогормонов, температуры, света, питания и степени биотического или абиотического стресса (Gamalero, Glick, 2015). Он может образовываться во всех частях растительного организма, но наиболее активно в меристематических тканях и в зоне узлов. Ключевым соединением для биосинтеза этилена в растениях является аминокислота метионин. При взаимодействии с АТФ возникает промежуточный продукт S-аденозилметионин, который у высших растений АЦК-синтаза гидролизует до 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК) и

5'-метилтиоаденозина (рисунок 1.4.1). В последующей реакции АЦК-оксидаза превращает АЦК в этилен, углекислоту и циановодород (Kende, 1993). Синтез АЦК-синтазы индуцируют высокие концентрации ауксина, химические сигналы грибной инфекции, стрессовое воздействие, а также сам этилен. АЦК способна перемещаться внутри растения на маленькие (межклеточные и межтканевые) и большие (по ксилеме и флоэме) расстояния, обеспечивая чёткую систему контроля уровня этилена в разных частях (de Poel, Van Der Straeten, 2014). Установлено также, что АЦК является полноценной сигнальной молекулой, не зависящей от этилена (de Poel, Van Der Straeten, 2014).

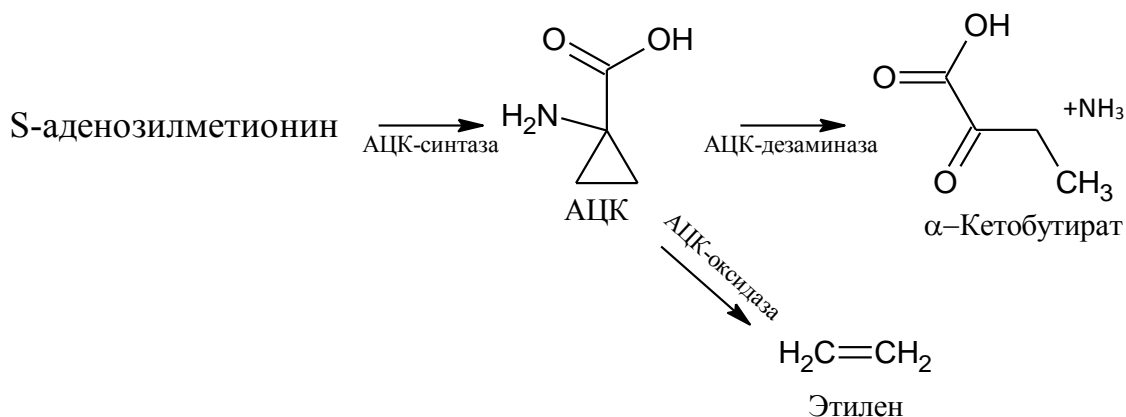


Рисунок 1.4.1 Метаболизм 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты (АЦК).

Одним из механизмов влияния СРРБ на растения является способность снижать уровень этилена в растениях за счет активности фермента 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминазы (АЦК-дезаминазы) (КФ 3.5.99.7) (Glick et al., 2007), открытой в 1978 году японскими исследователями М. Хонма и Т. Шимомура (Honma, Shimomura, 1978). Ранее считали, что АЦК-дезаминазы распространены только среди микроорганизмов. Однако было показано, что растения также содержат этот фермент (McDonnell et al., 2009).

Образование «стрессового этилена» происходит двумя пиками (Glick et al., 2007a), при этом первый пик представляет собой небольшую долю от величины второго пика. В стрессовых условиях первый пик, небольшой и трудно измеримый, в результате которого потребляется большая часть имеющегося у растения АЦК, инициирует транскрипцию генов, которые кодируют защитные белки растений. Второй, гораздо больший пик этилена, возникает в результате увеличения уровня АЦК в ответ на стресс и инициирует такие негативные процессы, как старение, хлороз и дефолиацию (Yim et al., 2013). Повышение концентрации этилена существенно ухудшает эффекты первоначального стресса, который вызвал эту реакцию, так что любое воздействие, которое снизит концентрацию второго пика «стрессового этилена» также должно быть в состоянии уменьшить/остановить повреждение растений в результате стресса. В связи с этим бактерии, способные снижать уровень АЦК (и, следовательно, уровень этилена в

растении), могут минимизировать вредное воздействие на растения различных стрессов (Glick, 2014).

Такие бактерии утилизируют АЦК при помощи АЦК-дезаминазы, катализирующей гидролиз АЦК до α -кетобутирата и ионов аммония (рисунок 1.4.1) (Honma, Shimomura, 1978). При этом многие ризосферные и эндофитные бактерии могут поглощать часть триптофана, выделяемого растениями, превращая его в ИУК, которая затем секретируется бактерией и потребляется растением (Glick, 2014). Повышение концентрации ИУК способствует росту растений и в тоже время активирует транскрипцию фермента АЦК-синтазы, что приводит к увеличению уровня АЦК и, следовательно, этилена. Таким образом, СРРБ, которые синтезируют ИУК из растительного триптофана, могут способствовать росту растений и затем ингибировать его (посредством воздействия произведенного в результате этилена). К счастью, бактерии, которые содержат АЦК-дезаминазу, уменьшают уровень вновь образованного АЦК в растениях, что позволяет бактериальной ИУК стимулировать рост растений без значительного ингибирования. Кроме того, в результате снижения уровня этилена в растении, снижается и ингибирование этиленом трансдукции сигнала ауксина, что позволяет бактериальному ауксину дополнительно стимулировать рост и развитие растений. Таким образом АЦК-дезаминаза способствует функционированию бактериальной ИУК (рисунок 1.4.2) (Olanrewaju et al., 2017).

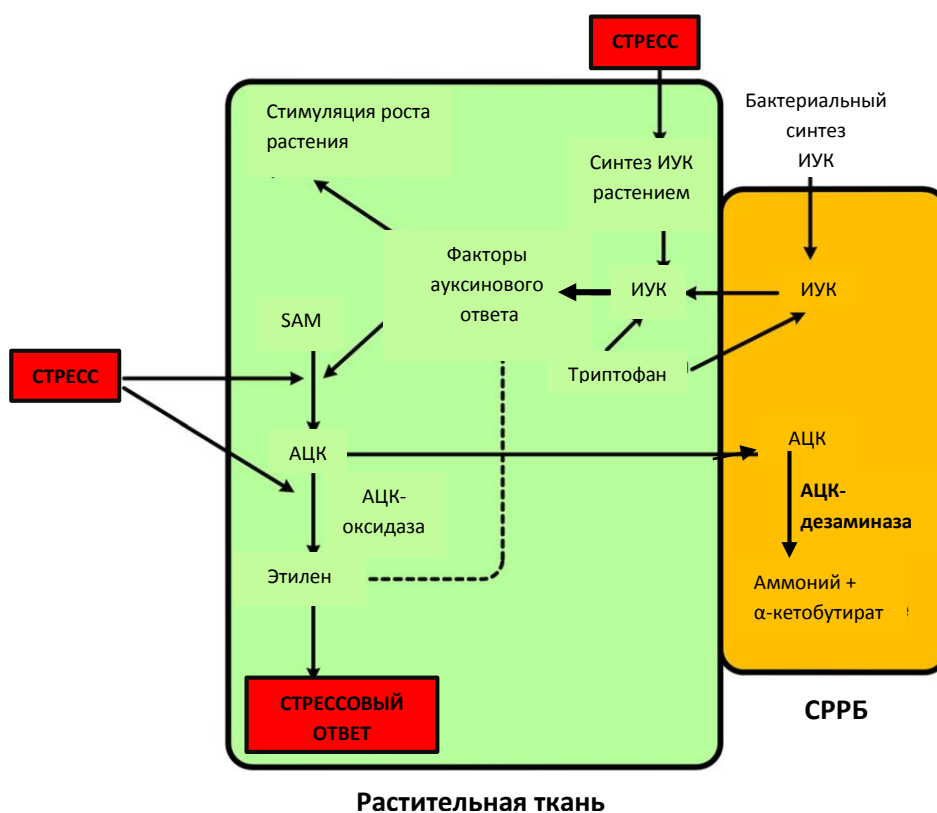


Рисунок 1.4.2 Схема стимуляции роста растений бактериями, содержащими АЦКД.

Стресс усиливает как синтез ИУК, так и синтез этилена в растении, что в конечном итоге ингибирует рост растений. При инокуляции штаммами СРРБ, которые содержат АЦК-дезаминазу, уровень этилена снижается, тем самым уменьшая ингибирование роста, вызванное избыточной концентрацией этилена. Это позволяет бактериальной ИУК продолжать стимулировать развитие растений. Таким образом, бактерии, которые продуцируют как ИУК, так и АЦК-дезаминазу, снижают негативные эффекты широкого диапазона биотических и абиотических стрессов, таких как засуха или избыток влаги, экстремальные температуры, засоленность почвы, тяжелые металлы и органические загрязнители, атаки насекомых и нематод, а также грибковые и бактериальные фитопатогены (Olanrewaju et al., 2017).

АЦК-дезаминаза полностью ингибируется L-изомерами аминокислот (L-аланином, L-серином, L- α -аминобутиратом) (Singh et al., 2015). Обратимым, медленно диссоциирующим ингибитором АЦК-дезаминазы является 1-амино-2,2-дифтороциклопропан-1-карбоксилат (Liu et al., 2015). Группа корейских учёных также показала, что добавление в среду культивирования *Herbaspirillum* sp. GW103 25-100 мг/л Pb и As уменьшали экспрессию гена *acdS*, в то время как добавление Cu в тех же концентрациях стимулировало экспрессию гена *acdS* (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase structural gene) (Loganathan et al., 2015).

Ген АЦК-дезаминазы (*acdS*) и активность фермента обнаружены у многих бактерий различного таксономического положения, ассоциированных с растениями (Glick et al., 2007a). АЦК-дезаминаза относится к большой группе пиридоксальфосфат-зависимых ферментов (Walsh et al., 1981). Наличие АЦК-дезаминазы подтверждено для представителей всех трёх доменов (Singh et al., 2015): фермент обнаружен у архей, бактерий, грибов (аско- и базидомицетов), протистов, растений и даже животных. Филогенетические исследования свидетельствуют в пользу монофилетического происхождения АЦК-дезаминаз разных видов. АЦК-дезаминазы распространяются путём вертикального переноса, в редких случаях горизонтального (Nascimento et al., 2014). Тем не менее, до сих пор остается неизвестным, наследуются ли гены *acdS* и регулирующий их транскрипцию гены *acdR* (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase transcriptional regulator) совместно или независимо друг от друга. Функции АЦК-дезаминазы, присутствующей в геномах некоторых животных, не ясны, поэтому предполагается, что некогда фитосимбиотические бактерии в качестве патогенов колонизировали другие царства, оставив след в их геномах (Singh et al., 2015).

В ряде экспериментов показано, что инокуляция растений, находящихся в стрессовых условиях, бактериями, имеющими АЦК-дезаминазу, приводит к частичному или полному снятию ингибирования роста растений. Кроме того, этилен участвует в формировании индуцированной системной устойчивости растений к фитопатогенам. Несмотря на то, что

бактерии снижают уровень этилена в растениях, способность вызывать такую устойчивость у них остается (Glick et al., 2007a).

Эффекты, оказываемые бактериями-фитосимбионтами, содержащими АЦК-деаминазу, на растения, хорошо продемонстрированы при помощи мутантов. Так, нокаут-мутант по гену *acdS* эндофитного фитосимбионта *Burkholderia phytofirmans* PsJN не обладал активностью АЦК-деаминазы и потерял способность стимулировать удлинение корней проростков рапса (Sun et al., 2009). Напротив, комплементированный штамм мог синтезировать АЦК-деаминазу и стимулировал удлинение корней.

Инсерционные мутанты *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 128C53K по структурному гену *acdS* и регуляторному гену *acdR*, ни один из которых не синтезировал АЦК-деаминазу, показали резкое снижение нодуляции корней гороха *Pisum sativum* cv. Sparkle по сравнению с диким штаммом (Ma et al., 2003). Также структурный и регуляторный гены АЦК-деаминазы *R. leguminosarum* bv. *viciae* 128C53K были введены в клетки *Sinorhizobium meliloti*, не обладающему этими генами, в составе плазмидного вектора. В результате инокуляции растений люцерны (*Medicago sativa* var. Iroquois) штаммом, образующим АЦК-деаминазу, отмечено повышение нодуляции корней на 40% по сравнению с растениями, обработанными диким штаммом (Ma et al., 2004).

Инокуляция резушки Таля различными штаммами ризобактерий (*Phyllobacterium brassicacearum* STM196, *Pseudomonas putida* UW4, *R. leguminosarum* bv. *viciae* 128C53K, *Mesorhizobium loti* MAFF303099) и их нокаут-мутантами по гену *acdS* показала, что АЦК-деаминаза не участвует в стимуляции удлинения боковых корней, но способствует образованию корневых волосков (Contesto et al., 2008).

АЦК-деаминаза начинает применяться и в биотехнологии растений. Использование *Agrobacterium tumefaciens*, несущей ген *acdS* для репрессии синтеза этилена на стадии доставки Т-ДНК в клетки растений, повышает эффективность трансгенеза (Someya et al., 2013).

К настоящему времени изучены гены и охарактеризованы АЦК-деаминазы только у *P. putida* UW4 (Hontzeas et al., 2005), *Cyberlindera saturnus* (Honma, Shimomura, 1978), и *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831 (Fedorov et al., 2013). Транскрипционная регуляция *acdS* хорошо изучена только у *P. putida* UW4 (Cheng et al., 2008) (рисунок 1.4.3). Выше структурного гена *acdS* располагается ген *acdR*, кодирующий регуляторный белок из *lrp*-семейства (Prigent-Combaret et al., 2008), имеющий октамерную структуру (Leonard et al., 2001). Этот белок связывается с последовательностью ДНК, известной как LRP-box, которая частично перекрывает промотор *acdR*, предотвращая дальнейшую транскрипцию гена *acdR*. Помимо этого, AcdR образует комплекс АЦК с белком AcdB, который относится к семейству фосфодиэстераз.

Комплекс (АЦК-AcdB-Lrp) связывается с областями FNR (регуляторный белок фумарат- и нитратредуктазы) и CRP (рецепторный белок циклического АМФ), которые, возможно, включают в себя отдельные последовательности промотора *acdS* (Cheng et al., 2008). Связывание с FNR происходит преимущественно в микроаэрофильных условиях, а с CRP – в аэробных. Взаимодействие этих факторов обеспечивает транскрипцию гена *acdS*. АЦК-дезаминаза расщепляет АЦК до аммиака и α -кетобутирата, являющегося предшественником аминокислот с разветвленной цепью, в том числе лейцина. Наконец, при высокой концентрации лейцина в клетке Lrp-октамер распадается на неактивные димеры и тем самым останавливает дальнейшую транскрипцию гена *acdS* (Glick et al., 2007b).

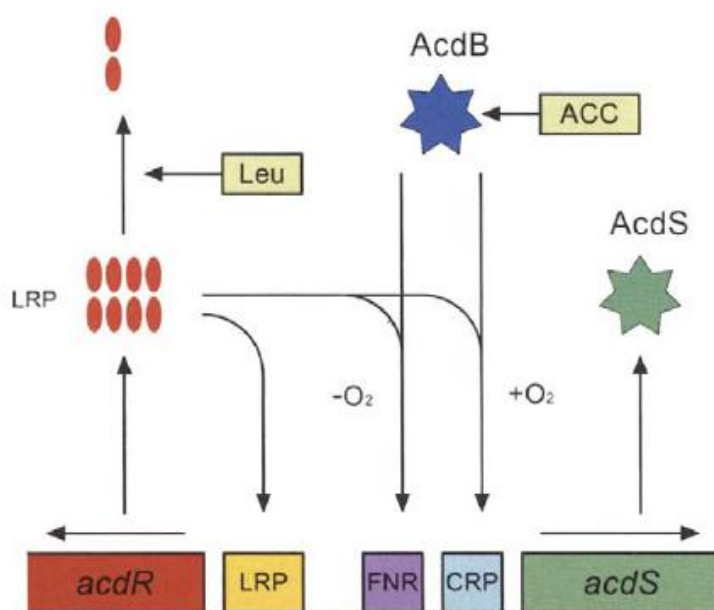


Рисунок 1.4.3 Модель транскрипционной регуляции экспрессии АЦК-дезаминазы у *Pseudomonas putida* UW4 (Glick et al., 2007b).

Lrp-белки принадлежат к большому семейству Lrp-AsnC (leucine-responsive regulatory protein/asparagine synthase C products). Впервые Lrp описан у *E. coli* как регулятор метаболизма лейцина (Oxender, 1976). Позднее выяснили, что белки этого семейства играют важную регуляторную роль в транспорте, метаболизме не только лейцина, но и других аминокислот, а также регулируют гены образования пилей и участвуют в придании структуры геномной ДНК (Shimada et al., 2015). Транскриптомный анализ показал, что белок Lrp влияет на экспрессию более 400 генов, что составляет 10% всех генов *E. coli*, причём 130 из них находятся под его непосредственной регуляцией. Эффекторами для Lrp служат не только лейцин, но и изолейцин, аланин, гистидин, метионин, треонин. Лейцин может стимулировать, ингибировать или не оказывать заметного влияния на связывание Lrp белков с ДНК (Seshasayee, Luscombe, 2013). В

основном, Lrp существует в двух формах – октамерной (Lrp₈) и гексадекамерной (Lrp₁₆), однако в растворах образует димеры. Белок Lrp *E. coli* состоит из 164 аминокислотных остатков и имеет 3 функциональных домена: N-концевой ДНК-связывающий домен «спираль-поворот-спираль», центральный домен, участвующий в активации транскрипции и перекрывающийся с ним С-концевой домен, содержащий сайт связывания лейцина (de los Rios, Perona, 2007).

Ранее анализ *in silico* 195 полных геномных последовательностей эндофитных фитосимбионтов показал, что большинство *acdS*-содержащих штаммов не имеют генов *acdR* поблизости от *acdS* или в другой части генома. Интересно, что даже у некоторых представителей рода *Pseudomonas* регуляторных генов *acdR* не удалось обнаружить (Nikolic et al., 2011). Однако более поздние работы (Nascimento et al., 2014) показали, что скорее всего в предыдущих исследованиях была допущена ошибка: за АЦК-дезаминазу были приняты последовательности D-цистеиндесульфогидразы или других деаминаз. По данным 2014 года, из 261 проанализированных штаммов протеобактерий с *acdS*, по крайней мере у 166 есть ген *acdR*, и только у 17 этого гена в геноме точно не обнаружено.

У многих актинобактерий и *Meiothermus*, гены, кодирующие белок из GntR-семейства транскрипционных регуляторов, расположены поблизости от гена *acdS* и предварительно названы *acdAR* (*Actinobacteria*) и *acdMR* (*Meiothermus*). Анализ участка выше *acdS* у этих организмов не выявил наличия на нём промоторных областей, зато ген *acdS* формирует оперон с вышеуказанными предположительными регуляторами (Nascimento et al., 2014).

Кроме того, обнаружена совершенно иная модель экспрессии гена *acdS* у *Mesorhizobium loti* MAFF303099 и *Bradyrhizobium japonicum* USDA11 (Uchiumi et al., 2004), для которой необходим *nifA*₂ ген, регулирующий азотфиксацию (Nukui et al., 2006) (рисунок 1.4.4). Белок NifA₂ взаимодействует с σ^{54} РНК полимеразой, запуская транскрипцию *acdS*. NifA₁ тоже влияет на описанный процесс, но пока не установлено, каким образом. Интересно, что сайт связывания NifA (5'-TGT-N₉₋₁₁-ACA-3') очень похож на сайт связывания CRP (5'-TGTGA-N₆-TCACA-3') (Nascimento et al., 2014).

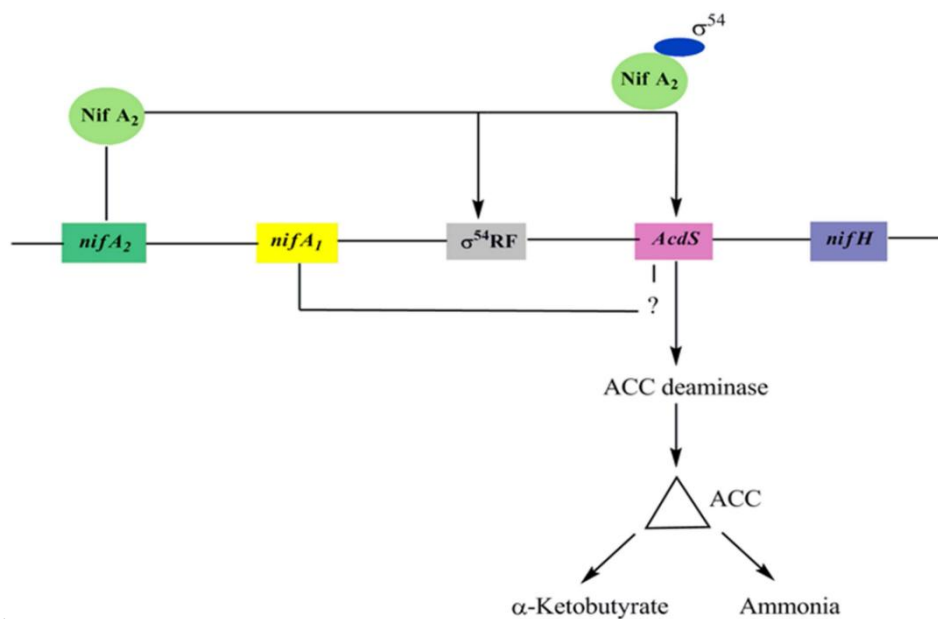


Рисунок 1.4.4 Модель регуляции гена *acdS* у азотфиксатора *Mesorhizobium* sp. (Singh et al., 2015).

Таким образом, несмотря на очевидную роль АЦК-деаминазы в фитосимбиозе бактерий, распространение, биохимические свойства и регуляция этого фермента изучены довольно слабо и нуждаются в дальнейшем исследовании.

1.5 Образование сероводорода

До 90-х годов прошлого столетия сероводород в физиологии и биохимии растений рассматривался как токсикант, в первую очередь как мощный ингибитор цитохром-с-оксидазы (Hancock, Whiteman, 2014). На примере многих видов растений (люцерна, виноград, салат) показано, что фумигация сероводородом вызывает повреждения листьев, дефолиацию, угнетение роста (Rennenberg, 1984; Wang, 2012). С другой стороны, еще в 1984 году были выявлены эффекты активации роста растений под влиянием низких концентраций H_2S (Rennenberg, 1984).

В последнее десятилетие накапливаются экспериментальные данные, свидетельствующие в пользу возможной сигнальной роли сероводорода в клетках растений (Li, 2013). К настоящему времени достаточно хорошо изучены функции сероводорода как сигнального транмиттера в клетках млекопитающих, установлено его участие в регуляции сосудистого тонуса, нейромодуляции, цитопротекции, воспалении, апоптозе (Abe, Kimura, 1996; Gadalla, Snyder, 2010; Zaichko et al., 2014). В то же время представления о сигнальной функции сероводорода у растений сформировались далеко не полностью (Hancock, Whiteman, 2014). При этом, однако, уже накоплен большой объем данных о разнообразных эффектах сероводорода у растений.

Известно, что сигнальным посредникам принадлежит особая роль в формировании адаптивных реакций растений на действие стрессов (Колупаев, Карпец, 2010). Показано индуцирование сероводородом многих протекторных систем растений (Wang et al., 2012; Li, 2013; Li, Zhu, 2014; Li et al., 2014a). Также есть сведения об изменениях эндогенного содержания H_2S в растительных клетках в ответ на воздействие внешних стимулов (Jin et al., 2013; Lai et al., 2014). Тем не менее, эти данные во многом противоречивы. До сих пор отсутствует однозначное мнение о том, является ли H_2S «самостоятельной» сигнальной молекулой у растений и каково ее место в сложных сигнальных сетях, что уже установлено для пероксида водорода и оксида азота (Lisjak et al., 2013; Hancock, Whiteman, 2014). Еще не известны однозначно пути синтеза и деградации сероводорода в растительных клетках (Guo et al., 2016).

В настоящее время ключевым ферментом синтеза сероводорода у растений считается L-цистеиндесульфогидаза (КФ 4.4.1.1), под влиянием которой H_2S образуется из L-цистеина (Wang, 2012; Li, 2013). Также возможно образование сероводорода из D-цистеина при действии соответственно D-цистеиндесульфогидазы (КФ 4.4.1.15) (рисунок 1.5.1). Наряду с ферментами синтеза сероводорода, в растениях обнаружен фермент, специализирующийся на его деградации – O-ацетил-L-серинлиазы (Lisjak et al., 2013). Наличие в растительных клетках специализированных ферментативных систем синтеза и деградации сероводорода, позволяющих тонко регулировать его внутриклеточную концентрацию, косвенно свидетельствует о сигнально-регуляторной роли H_2S .

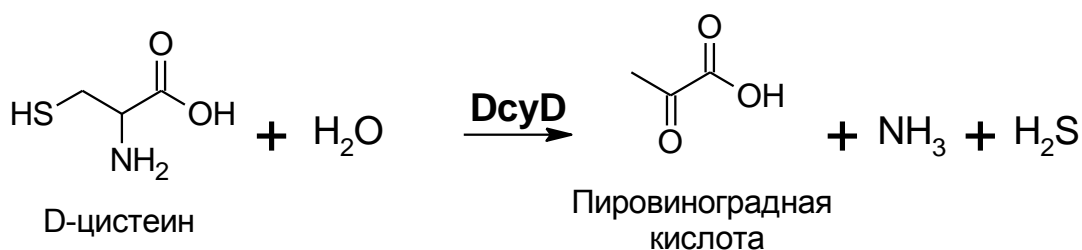


Рисунок 1.5.1 Реакция деградации D-цистеина.

Установлено усиление экспрессии генов L- и D-цистеиндесульфогидазы у растений арабидопсиса в ответ на действие засухи. При этом увеличивалась продукция растениями сероводорода (Jin et al., 2011). Показано увеличение количества транскриптов L-цистеиндесульфогидазы и эндогенного содержания сероводорода у люцерны под действием стрессовых концентраций хлорида натрия (Lai et al., 2014). Примечательно, что активность D-цистеиндесульфогидазы в этих условиях практически не изменялась.

Кроме того, известно, что сероводород обладает сильным фунгицидным действием (Rapenbrock et al., 2007). По этой причине удобрение серосодержащими веществами увеличивает устойчивость растений к фитопатогенным грибам. Известно, что растения из семейства

Крестоцветных наиболее устойчивы к грибковым инфекциям по причине того, что содержат много серосодержащих соединений, вероятно участвующих в защитном ответе (Papenbrock et al., 2007). Детальное исследование капустных растений выявило наличие у них нескольких L- и D-цистеиндесульфогидаз, а также O-ацетил-L-серин(тиол)лиазы (Papenbrock et al., 2007).

Стоит отметить, что D-цистеин токсичен для бактерий в микромолярных концентрациях (Soutourina et al, 2001). В связи с этим, неудивительно присутствие у ряда бактерий D-цистеиндесульфогидаз, участвующих в деградации D-цистеина и снятии его токсического действия (Nagasawa et al., 1985; Soutourina et al, 2001). В связи с вышеописанным, можно сделать вывод об участии D-цистеиндесульфогидазы в формировании ассоциации бактерий с растениями. Во-первых, активность этого фермента определяет устойчивость самих бактерий к D-цистеину, а также позволяет использовать его в качестве дополнительного источника углерода и серы. Во-вторых, при деградации D-цистеина выделяется сероводород, обладающий фунгицидными свойствами, что, с одной стороны, может повышать устойчивость растений к фитопатогенным грибам, а с другой стороны – увеличивать конкурентоспособность бактерий при колонизации растений (Papenbrock et al., 2007).

На данный момент бактериальные D-цистеиндесульфогидазы изучены очень слабо, выделены и охарактеризованы только два фермента: из *E. coli* (Nagasawa et al., 1985) и *Methylobacterium extorquens* AM1 (Шихсаидов, 2010). За последнее десятилетие многие исследования показали значительную роль H₂S в стимуляции роста и развития растений, в частности, его участие в защите растений от различных стрессов (Guo et al., 2016; Zhang, 2010). Кроме того, увеличению данных о возможной сигнальной функции сероводорода у растений способствует появление интереса к дальнейшему исследованию этого фермента у бактерий-фитосимбионтов. Таким образом, присутствие D-цистеиндесульфогидазы в бактериях может быть фактором, стимулирующим рост растений за счет высвобождения сероводорода, однако, чтобы доказать это, необходимы дополнительные исследования.

2. Особенности метаболизма аэробных метилотрофных бактерий

Аэробные метилотрофные бактерии, использующие в качестве источников углерода и энергии окисленные или замещенные производные метана, но неспособные расти на метане, широко распространены в природе, обнаружены в воде и на суше. Ростowymi субстратами для метиловобактерий служат метанол, метиламин, диметиламин, триметиламин, галометаны (хлорметан и дихлорметан), серосодержащие соединения – метансульфоновая кислота, диметилсульфид и многие другие (Троценко et al., 2010).

Факультативные метилотрофы используют различные полиуглеродные соединения наряду с одноуглеродными, тогда как ограниченно-факультативные метилотрофы могут расти только на одном или нескольких полиуглеродных субстратах. Облигатные метилотрофы используют исключительно C₁-соединения (Anthony, 1982). В соответствии с реализуемыми путями первичной C₁-ассимиляции (сериновый, рибулозомонофосфатный или рибулозобисфосфатный), аэробные метиловобактерии условно разделены на 3 основные группы, хотя некоторые из них способны использовать эти пути одновременно (*Arthrobacter globiformis*).

Впервые бактерии, способные к аэробному росту на метаноле как единственном источнике углерода и энергии, обнаружены Loew в 1892 г. и названы *Bacillus methylicus*. Однако до начала 1960-х годов выделено всего несколько штаммов метилотрофных микроорганизмов. Начало систематическому изучению их биологии и метаболизма было положено описанием розовоокрашенного метилотрофа *Pseudomonas* sp. AM1 (Peel, Quayle, 1961). К настоящему времени изучены сотни штаммов метиловобактерий, проявляющих поразительное морфологическое, физиолого-биохимическое и таксономическое разнообразие и относящиеся к классам *Alpha-*, *Beta-* и *Gamma*proteobacteria, *Verrucomicrobia*, *Firmibacteria*, *Actinobacteria* и *Flavobacteriia* (Kolb, 2009; Троценко с соавт., 2010; Доронина с соавт., 2015).

Аэробные метилотрофные бактерии, окисляя природные и антропогенные C₁-соединения, в том числе токсичные, выполняют уникальную функцию природного биофильтра на пути их эмиссии в атмосферу (Lidstrom et al., 1992; Murrell, McDonald 2000; Троценко, Доронина 2003). Кроме того, метилотрофы образуют прочные ассоциации с растениями, что обусловлено образованием и выделением растениями метанола и других C₁-соединений, которые активно используются аэробными метиловобактериями (Nemeček-Marshall et al., 1995; Fall, 1996; Keppler et al., 2008). Разнообразие C₁-соединений обуславливает особенности биологии и метаболизма аэробных метилотрофных бактерий.

2.1 Пути окисления C1-соединений

Процессы окисления C₁-субстратов обеспечивают клетки энергией и восстановительными эквивалентами, а также переводят эти субстраты в доступные для ассимиляции формы, т.е. формальдегид (НСНО), формиат (НСООН) и СО₂ (рисунок 2.1.1).

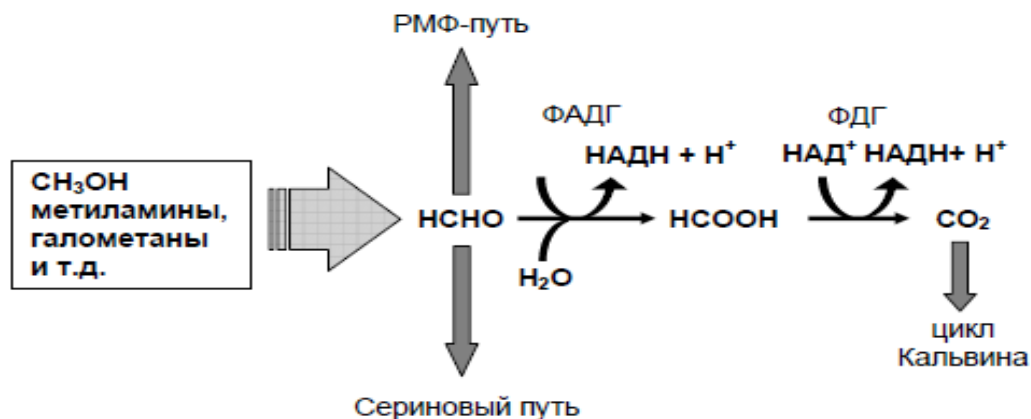


Рисунок 2.1.1 Схематическое изображение окисления C₁-субстратов у аэробных метилотрофных бактерий (Vorholt, 2002).

Окисление метанола до формальдегида катализируется метанолдегидрогеназами (МДГ), различными у грамотрицательных и грамположительных метилотрофных бактерий. Метанолдегидрогеназы делят на 3 группы, основанные на вариантах акцепторов электронов: O₂- (у метилотрофных дрожжей), PQQ- и НАД- зависимые (у грамположительных). Большинство грамотрицательных метилотрофных бактерий окисляют метанол классической PQQ-зависимой МДГ (Anthony, 1982), которая захватывает электроны и передает их на цитохром *c* (Krog et al., 2013). Кроме того, у *Amycolatopsis methanolica* и *Mycobacterium gastri* обнаружен мультиферментный комплекс, катализирующий окисление метанола и других первичных спиртов с участием кофакторов НАД(Ф)Н₂ или МТТ и ДХФИФ (Nector et al., 2000)

Формальдегид является центральным C₁-метаболитом, поступающим в первичные биосинтетические пути ассимиляции (РМФ и сериновый) и подвергающимся дальнейшему окислению с целью получения энергии. Автотрофные метилотрофы окисляют формальдегид через формиат до СО₂, который затем ассимилируют через классический РБФ путь (цикл Кальвина) (рисунок 2.1.1).

Известно несколько путей окисления формальдегида через формиат до СО₂, участвующих в генерации восстановленных эквивалентов для аэробного дыхания. Большинство метилотрофных бактерий обладают несколькими путями окисления формальдегида, которые могут использоваться для разных целей, включая энергетическую составляющую и детоксикацию СН₂О. Прямое окисление формальдегида до формиата у метилотрофов

катализируется тремя различными ферментами: 1) НАД⁺-зависимой дегидрогеназой, требующей GSH и обнаруженной у *Brevibacterium fuscum*, *Methylophaga* и *Paracoccus kondratievae*; 2) НАД⁺-зависимой дегидрогеназой, не требующей GSH, которая обнаружена у большинства метилотрофов; 3) дегидрогеназой, проявляющей *in vitro* активность с 2,6-дихлорфенолиндофенолом (ДХФИФ) и ФМС, как акцепторами электронов (Anthony, 1982; Vorholt, 2002; Zhang et al., 2017). Помимо НАД- и тиол-зависимых формальдегиддегидрогеназ у метилотрофов описаны микотиол- и фолат-зависимые формальдегиддегидрогеназы, а также циклическое окисление формальдегида (Lidstrom, 2006).

Окисление формиата – завершающая стадия цепи реакций прямого окисления у аэробных метилотрофных бактерий. Ферментами, катализирующими окисление формиата до CO₂, являются мембрансвязанные формиатоксидаза и формиатдегидрогеназа, использующие в качестве акцепторов электронов кислород, ДХФИФ или цитохромом *c*, а также наиболее распространенная растворимая НАД⁺-зависимая формиатдегидрогеназа (ФДГ) (Lidstrom, 2006).

2.2 Пути ассимиляции C₁-соединений

Известны три основных циклических пути, ответственных за биосинтез клеточных компонентов при росте бактерий на C₁-соединениях, более восстановленных, чем CO₂: рибулозомонофосфатный (РМФ), сериновый и рибулозобисфосфатный (РБФ).

РМФ-путь является шунтированным вариантом цикла Кальвина, в котором синтез триозофосфата осуществляется из трех молекул формальдегида. Ключевая реакция цикла – альдольная конденсация формальдегида и рибулозо-5-фосфата с образованием нестабильного 3-гексулозо-6-фосфата, который далее изомеризуется во фруктозо-6-фосфат и может фосфорилироваться до фруктозо-1,6-бисфосфата, либо через глюкозо-6-фосфат и 6-фосфоглюконат окисляться до 2-кето-3-дезоксиглюконоата. Специфическими ферментами этого пути являются гексулозофосфатсинтаза и фосфогексулоизомераза (Lidstrom, 2006). Метилобактерии с РМФ-путем C₁-ассимиляции представлены грамотрицательными, облигатными и ограниченно-факультативными метилобактериями родов: *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylovorus*, *Methylophaga* и *Methylotenera*. Из них только метилобактерии рода *Methylophaga* являются умеренными галофилами, ауксотрофными по витамину B₁₂. У облигатных и ограниченно-факультативных метилобактерий (фосфо)триозы образуются через 2-кето-3-дезоксиглюконоатальдозу (КДФГ-вариант).

Факультативные метилобактерии, реализующие РМФ-путь, представлены грамположительными бактериями родов *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Amycolatopsis* и одним родом ацидофильных грамотрицательных метилобактерий – *Acidomonas*. Образование

(фосфо)триоз у них осуществляется в гликолитическом пути через фруктозо-1,6-бисфосфатальдолазу (ФБФ-вариант).

Сериновый путь представляет собой циклическую цепь реакций, начинающихся с образования серина из глицина и формальдегида. Основными в цикле являются четыре реакции, катализируемые сериноксиметилтрансферазой, серин-глиоксилатаминотрансферазой, оксипируватредуктазой, глицераткиназой и малил-КоА-лиазой. Регенерация глицина происходит по циклическому пути переносом аминогруппы серина на глиоксилат, образуемый в результате распада малата до ацетил-КоА и глиоксилата (Harder, Dijkhuizen 1983). Итогом серинового цикла является синтез ацетил-КоА из двух C_1 -единиц (CH_2O и CO_2). В результате последующих превращений образуется 3-ФГК – стартовый материал для биосинтеза клеточных компонентов (Strom et al., 1974).

Метилобактерии с сериновым путем делят на две группы – изоцитратлиазоположительные (ицл+), т.е. имеющие изоцитратлиазу, и изоцитратлиазоотрицательные (ицл–), у которых изоцитратлиаза отсутствует. Ицл+ вариант серинового цикла реализуют гифообразующие почкующиеся метилобактерии рода *Nyphomicrobium* и почкующиеся метилобактерии рода *Aminobacter*, использующие метилированные амины. Ицл– вариант серинового пути реализуют розовоокрашенные метилобактерии (РОФМ) рода *Methylobacterium*, а также бесцветные метилобактерии родов *Methylorhabdus*, *Methylopila* и галофильные метилобактерии рода *Methylarcula*.

РБФ-путь автотрофной ассимиляции CO_2 , встречается у метилобактерий реже, чем РМФ и сериновый пути, т.к. энергетически менее выгоден (Strom et al., 1974). Реализующие этот путь факультативные метилобактерии окисляют C_1 -субстраты последовательно до CO_2 , который фиксируется в реакции карбоксилирования рибулозо-1,5-бисфосфата с образованием 3-фосфоглицерата. Ключевыми ферментами этого пути являются фосфорибулокиназа, фосфорилирующая рибулозо-5-фосфат до рибулозо-1,5-бисфосфата, и рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (РБФК/О или Рубиско), катализирующая реакцию карбоксилирования и гидролитического расщепления рибулозо-1,5-бисфосфата с образованием двух молекул 3-ФГК. Далее одна из молекул 3-ФГК восстанавливается в 3-ФГА, а другая участвует в регенерации акцептора. Метилобактерии с РБФ-путем являются факультативными метилотрофами и, как правило, способны расти автотрофно в атмосфере $H_2 + CO_2 + O_2$. Зависят от биотина, получают энергию, окисляя C_1 -субстраты до CO_2 , который ассимилируют через цикл Кальвина. Некоторые представители имеют специфическую морфологию (Троценко с соавт., 2009). Метилотрофные бактерии с рибулозобисфосфатным путем C_1 -ассимиляции: *Paracoccus*,

Albibacter, *Xanthobacter*, *Beijerinckia* (Dedysh et al., 2005), *Angulomicrobium*, *Hansschlegelia*, *Methylovirgula*, *Ancylobacter* и др.

Наиболее энергоемким путем ассимиляции C₁-соединений является РБФ-цикл, поскольку синтез триоз осуществляется из CO₂ с затратой АТФ и восстановителей. Сериновый путь более эргономичен, чем РБФ-цикл, т.к. образование триоз в нем происходит из двух молекул формальдегида и одной молекулы CO₂. Таким образом, метилотрофные бактерии могут реализовать три пути C₁-ассимиляции, однако они выяснены не для всех таксонов метиловых бактерий (Schaefer et al., 2002; Moosvi et al., 2005).

2.3 Центральный метаболизм

Особенностями центрального метаболизма аэробных метиловых бактерий с сериновым путем являются полное отсутствие или низкая активность ферментов катаболизма углеводов (гексокиназы, дегидрогеназ глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата, фруктозобисфосфата альдолазы), тогда как у метиловых бактерий с РМФ-путем эти ферменты играют существенную роль, т.к. участвуют в регенерации акцептора формальдегида и образовании НАД(Ф)Н. Большинство факультативных метилотрофов обладает полным набором ферментов ЦТК, который при метилотрофном росте играет преимущественно биосинтетическую роль. Напротив, для многих облигатных и ограниченно-факультативных метилотрофов характерны множественные метаболические блоки в путях центрального метаболизма – отсутствие пируваткиназы, ФЕП-синтазы, пируватфосфатдикиназы, α-кетоглутаратдегидрогеназы и ферментов глиоксилатного шунта, наряду с функционированием специализированных механизмов трансформации энергии, обуславливающие их неспособность к росту на полиуглеродных субстратах (Shishkina, Trotsenko, 1982; Доронина, 1999; Trotsenko, Murrell, 2008; Троценко с соавт., 2010).

3. Аэробные метилотрофные бактерии как фитосимбионты

Аэробные метилотрофные бактерии широко распространены в природе, многие из них являются симбионтами растений. Они были обнаружены в ассоциации с более чем 70 видами растений (Omer et al., 2004), в частности, были выделены из риса (Poonguzhali et al., 2008), томатов, красного перца (Yim et al., 2012), картофеля (Ardanov et al., 2016), хлопка, сахарного тростника (Madhaiyan et al., 2006a), арахиса (Madhaiyan et al., 2006b) и пшеницы (Meena et al., 2012).

Тесную связь метилотрофных бактерий с растениями объясняют функционированием «метанольного цикла», т.е. образованием и выделением растениями метанола, который активно используется аэробными метилотрофными бактериями как источник углерода и энергии. Известно, что растения являются глобальным источником атмосферного метанола, составляющего 40-46% от общего обнаруженного летучего органического углерода атмосферы (Fall, 1996). Основным источником метанола, выделяемого растениями, служит деметилирование пектина в клеточных стенках под действием пектинметилэстеразы (Frenkel et al., 1998). Другими источниками метанола из растений являются интермедиаты ТГФ пути, функционирование метилтрансферазы белков, деградация лигнина во вторичных клеточных стенках. Кроме того, при росте на поверхности и внутри тканей растений бактерии могут использовать в качестве источников питания другие C_1 -соединения, выделяемые растением, а также различные метаболиты растений, например аминокислоты. С другой стороны, метилотрофы способны стимулировать рост и развитие растений, оказывая влияние на уровень фитогормонов, синтезируя витамины, а также фиксируя молекулярный азот.

3.1 Разнообразие, распространение и роль метилотрофных фитосимбионтов

Наиболее полно изучены представители розовоокрашенных факультативных метилотрофных бактерий (РОФМ) из рода *Methylobacterium*, которые являются типичными обитателями филлосферы (Holland et al., 2002, Капарулина с соавт., 2017). Представители этого рода – грамотрицательные, строго аэробные бактерии, способные расти как на одноуглеродных субстратах, таких как метанол, формальдегид, так и на многих других органических соединениях. Наличие у многих из них каротиноидного пигмента придает метиловым бактериям дополнительную устойчивость к УФ-излучению при росте в филлосфере. Многие виды рода *Methylobacterium* были впервые выделены из растений. Количественная оценка численности РОФМ методом посева выявила наличие 10^4 – 10^8 КОЕ на грамм сырой ткани растений, что, в среднем, составляет 14% от всех бактерий, выявляемых в филлосфере этим методом (Holland et al., 2002; Knief et al., 2010).

Известно, что поверхность растений колонизована бактериями нескольких сотен видов (Whipps et al., 2008). Достоверно показано, что представители α - и γ -*Proteobacteria* преобладают, причем их количественное соотношение меняется в зависимости от вида растения (Redford et al., 2010). В целом, количество клонов с генами рНК метиловобактерий, полученных из мацерированных тканей растений, достигает 20% от общего числа клонов бактерий, что хорошо согласуется с данными, полученными методом посева (Ikeda et al., 2010; Knief et al., 2010).

Численность и структура популяций метилотрофов, живущих на поверхности растений вместе с неметилотрофными бактериями, в большей мере зависит от места обитания, чем от вида растения (Knief et al., 2010). Так, например, растения резушки Таля, люцерны, одуванчика, отобранные в одном месте, были населены примерно одинаковыми по видовой структуре популяциями метилотрофных бактерий. Напротив, растения одного вида, но произрастающие в разных местах, населены значительно различающимися по составу популяциями метилотрофных бактерий. Вместе с тем, нельзя исключить влияние метаболитов растения-хозяина на структуру популяции сопутствующих метиловобактерий, поскольку разные виды, произрастающие в одном месте, все же отличались по видовому составу симбиотрофной микробиоты (Knief et al., 2008; Knief et al., 2010).

Метилотрофы в наибольшем количестве найдены на поверхности листьев, особенно на нижней стороне листовой пластинки, где расположено большинство устьиц – основного пути эмиссии метанола, а также проникают в межклеточное пространство и внутрь клеток растений (Poonguzhali et al., 2008; Iguchi et al., 2015; Jourand et al., 2005; Abanda-Nkpwatt et al., 2006). Действительно, используя метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*, несущие репортерный ген *gfp* под контролем метанол-чувствительного промотора, установлено, что устьица являются главным источником эмиссии метанола на поверхности листьев. Кроме того, доказано, что инокуляция метиловобактериями растений приводила к значительному снижению уровня метанола, выделяемого растениями в атмосферу (Abanda-Nkpwatt et al., 2006).

Молекулярными методами установлено, что метиловобактерии обитают не только на поверхности, но и в тканях растений. С применением метода FISH показано наличие *Methylobacterium extorquens* внутри почек сосны *Pinus sylvestris* L., населяющих, в основном, клетки примордиев и смоляные ходы (Pirttilä et al., 2000). Более того, при инокуляции *M. extorquens* меченным зеленым флуоресцирующим белком (GFP), люцерны (*Medicago truncatula* L.) установлено, что метиловобактерии проникают в межклетники эпидермиса, и, в меньшей степени, мезофилла листа (Sy et al., 2005). Имеется целый ряд исследований, в которых сообщается что они являются эндофитами различных растений, таких как хлопок (Madhaiyan et al., 2012), арахис (Madhaiyan et al., 2006b), цитрусовые (Ara'ujo et al., 2002), сосна (Pohjanen et al.,

2014), эвкалипт (Andreote et al., 2009), табак (Andreote et al., 2006), клубника (Smejkalov' a et al., 2010) и мангровые деревья (Dourado, 2012). Ранее предполагали, что весной РОФМ колонизируют поверхность листьев, попадая на них с почвенной пылью (Романовская с соавт., 1996). В настоящее время доказано, что метилотрофы постоянно ассоциированы с растениями и даже в зимний период локализованы внутри растительных тканей (Доронина с соавт., 2004).

Несмотря на активное изучение филлосферных РОФМ, гораздо меньше внимания уделялось ризосферным и неокрашенным метилотрофам-фитосимбионтам, проявляющим большое таксономическое и физиологическое разнообразие. Отмечено, что зачастую бесцветные метилотрофные бактерии родов *Methylovorus* и *Paracoccus* выделялись из филлосферы и ризосферы кукурузы. Вполне вероятно, что для кукурузы – растения с C₄-типом метаболизма, более характерна связь с иными, нежели РОФМ, метиловыми бактериями (Доронина, Троценко, 2000; Доронина с соавт., 2000). Значительным событием явилось описание клубенькового симбионта *Methylobacterium nodulans*, образующего клубеньки у бобовых растений (Jourand et al., 2004).

Развитие молекулярной биологии и все более широкое использование технологий высокопроизводительного секвенирования позволили получить последовательности многих бактериальных геномов. До 2012 года было доступно только 11 геномов среди представителей рода *Methylobacterium*. К 2015 году 22 секвенированных генома бактерий рода *Methylobacterium*, депонированы в базе данных NCBI (Dourado, 2015), в настоящее время их число постоянно увеличивается. Последовательность генома штамма GXF4 стала первой для ассоциированного с ксилемой представителя рода *Methylobacterium* (Gan et. al., 2012), а штамм SR1.6/6 первой для представителя рода, колонизирующего тропическое растение (Almeida et al., 2013). Кроме того, последовательность генома клубенькового симбионта *Methylobacterium nodulans* ORS2060 также важна для дальнейших исследований (Jourand et al., 2004). Наличие полных геномных последовательностей аэробных метилотрофных бактерий-фитосимбионтов открывает новые возможности для изучения процессов, обуславливающих их взаимодействие с растениями.

Метилотрофные бактерии реализуют различные стратегии влияния на рост растений. К настоящему моменту выделено большое количество метиловых бактерий, которые обладают одним или несколькими свойствами, позволяющими в определенных условиях стимулировать рост и развитие растений, улучшать прорастание семян, сохранять их всхожесть, в том числе и в ассоциации с другими группами бактерий (Holland, 1997; Lee et al., 2010; Nalayani et al., 2014). Известно, что представители метилотрофов стимулируют рост растений, влияя на концентрацию растительных гормонов – ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, некоторые из них обладают ферментами АЦК-деаминазой и D-цитеиндесульфогидразой, а также синтезируют витамин B₁₂, сидерофоры, фиксируют атмосферный азот, способствуют солубилизации фосфора, улучшая

тем самым минеральное питание растений. Благодаря этим способностям, метилотрофы имеют большой потенциал для применения в сельском хозяйстве. В последнее время появилось множество сообщений о повышении урожайности различных культур растений после обработки РОФМ: риса (Poonguzhali et al., 2008), томатов, красного перца (Yim et al., 2012), картофеля (Ardanov et al., 2016), хлопка, (Madhaiyan et al., 2006a), арахиса (Madhaiyan et al., 2006b), пшеницы (Meena et al., 2012) и др. Хотя представители рода *Methylobacterium* не являются фитопатогенными бактериями и не связаны с деградацией растительной биомассы, есть сообщения, что некоторые штаммы способны синтезировать пектиназу и целлюлазу. Предполагается, что они могут вызывать системную устойчивость у растений (Madhaiyan et al., 2007, Lee et al., 2006).

3.2 Синтез фитогормонов аэробными метилотрофными бактериями

Ауксины синтезируют аэробные метилотрофные бактерии различных родов (при добавлении в среду L-триптофана): *Hansschlegelia*, *Hyphomicrobium*, *Methylobacterium*, *Methylopila*, *Methylarcula*, *Methylobacillus*, *Methylophilus*, *Methylovorus*, *Methylophaga*, *Paracoccus*, *Xanthobacter*, *Albibacter*, *Ancylobacter*, *Methylomonas*, *Methylosinus*, *Methylocystis*, *Methylobacter*, *Methylomicrobium* (Доронина с соавт., 2002; Ivanova et al., 2007; Kwak et al., 2014). Метилотрофные бактерии различаются по количеству выделяемых в среду индольных соединений (от 5 до 120 мкг/мл). Индольные соединения, выделенные из *Methylobacterium mesophilicum*, *Albibacter aminovorans*, *Methylovorus mays*, *Paracoccus kondratievae* идентифицированы как ИУК, ИМК или ИПВК, а у бактерий с сериновым путем C₁-метаболизма найден также индоллил-3-ацетамид. При этом отмечено ингибирование синтеза ИУК ионами аммония, вероятно, вследствие конкуренции ионов аммония с аминогруппами триптофана, элиминирующимися в процессе биосинтеза ИУК (Троценко с соавт., 2001).

Поиск генов, кодирующих ключевые ферменты биосинтеза ИУК в геноме метилотрофа *M. extorquens* AM1 выявил ген, кодирующий тиаминпирофосфат-зависимую декарбоксилазу α -кетокислот, проявляющую сходство с индолилпируватдекарбоксилазами. В результате клонирования гена *ipdC* был получен высокоочищенный рекомбинантный фермент, способный декарбоксилировать бензоилформиат с максимальной скоростью (k_{cat}). В реакции с индолилпируватом этот фермент имел наибольшую константу специфичности (k_{cat}/K_m), что позволило классифицировать его как индолил-3-пируватдекарбоксилазу. Нокаут-мутант *M. extorquens* по гену *ipdC*, выращенный в присутствии триптофана, синтезировал на 54% меньше ИУК, чем штамм дикого типа. Комплементация мутации приводила к увеличению содержания ИУК в культуральной жидкости по сравнению с мутантом (Федоров с соавт., 2010).

Эти данные не согласуются с результатами экспериментов, проведенных на ризосферной бактерии *Azospirillum brasilense*, у которой при инактивации гена *ipdC* наблюдали 90%-ное снижение концентрации ИУК. Из этого следует, что *IpdC* является ключевым и, вероятно, единственным ферментом биосинтеза ауксинов у *A. brasilense* (Prinsen et al., 1993; Costacurta et al., 1994). Напротив, мутационный анализ фитопатогена *Pantoea agglomerans* выявил наличие индолилпируватного и триптаминового путей биосинтеза ауксинов (Manulis et al., 1998). По-видимому, *M. extorquens* AM1 также реализует несколько путей биосинтеза ИУК. Помимо этого, на большое разнообразие путей биосинтеза ИУК у бактерий рода *Methylobacterium* указывает отсутствие в геноме *M. nodulans* гена, кодирующего *IpdC* (Федоров с соавт., 2010).

У метилотрофов и метанотрофов различного таксономического и филогенетического положения (*Methylobacterium*, *Methylovorus*, *Aminobacter*, *Methylopila*, *Methyloarcula*, *Xanthobacter*, *Paracoccus*, *Blastobacter*, *Hyphomicrobium*, *Methylophilus*, *Methylobacillus*, *Methylomonas*, *Methylobacter*, *Methylosinus*, *Methylocystis*) в геномах показано наличие участков, гомологичных последовательностям генов биосинтеза и секреции цитокининов (Шепеляковская с соавт., 1999). Анализ генома *Methylobacterium oryzae* СВМВ20^T указывает на то, что штамм СВМВ20^T имеет два гена *miaA* (MOC_5190 и MOC_5911), кодирующих изопентенил-аденилтрансферазы (Kwak et al., 2014). Кроме того, методами иммуноаффинной хроматографии, ВЭЖХ и радиоиммуноферментным анализом культуральной жидкости бесцветной облигатной метилотрофной бактерии *Methylovorus mays* и РОФМ, выделенных с растений сои, кукурузы, ячменя и арабидопсиса, выявлено наличие зеатина и зеатинрибозида (от 50 до 400 нг/г сухих клеток), а методом ПЦР у факультативного метилотрофа *M. extorquens* обнаружен ген фермента изопентенилтрансферазы, ответственного за первый этап биосинтеза цитокининов (Long et al., 1997; Иванова с соавт., 2000; Троценко с соавт., 2001). Следовательно, некоторые метилотрофные бактерии неспецифически образуют цитокинины путем гидролиза тРНК до изопентенилированного аденина (зеатина), что подтверждено в опытах с мутантом *M. extorquens*, у которого делеция гена *miaA*, кодирующего изопентенил-тРНК-синтетазу, привела к полной потере способности синтезировать цитокинины (Koenig et al., 2002). Следует отметить, что эксперименты по изучению влияния инокуляции семян сои *miaA*-отрицательным мутантом *M. extorquens* не выявили существенных отличий в фенотипе от исходного штамма (Holland et al., 2002). Вполне вероятно, образуемые метилотрофами цитокинины определяют иные фенотипические проявления, нежели прорастание семян, в котором могут также участвовать ауксины. Кроме того, установлено, что колонизация метилобактериями *M. arboreus* существенно повышала адаптивную защиту и устойчивость растений гороха к окислительному стрессу, вызванному обработкой гербицидом паракватом (Агафонова, 2018).

3.3 Влияние метилотрофных бактерий на уровень этилена

АЦК-дезаминаза принимает участие в формировании ассоциаций метиловобактерий с растениями, за счет снижения уровня этилена, который ингибирует рост растений (Singh et al., 2015). Впервые для метилотрофов АЦК-дезаминазная активность показана у *Methylobacterium fujisawaense* (Madhaiyan et al., 2007).

В настоящее время ген АЦК-дезаминазы среди метилотрофных бактерий чаще всего встречается у представителей рода *Methylobacterium* (Madhaiyan et al., 2004, Chinnadurai, et al., 2009, Федоров с соавт., 2010). С использованием имеющихся в GenBank геномных последовательностей метиловобактерий, обнаружены гены АЦК-дезаминаз у *M. radiotolerans* JCM 2831, *M. nodulans* ORS 2060, *Methylobacterium* sp. 4_46, *Methylibium petroleiphilum* PM1, а также *Amycolatopsis methanolica* 239.

Из филлосферы риса был выделен штамм *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831, также обладающий АЦК-дезаминазой (Ito, Iizuka, 1971). Обнаружено, что нуклеотидная последовательность структурного гена *acdS* *Methylobacterium radiotolerans*, кодирующего АЦК-дезаминазу, имеет большое сходство (около 70%) с соответствующим геном *P. putida* (Fedorov et al., 2013). Гетерологичной экспрессией гена *acdS* из *M. radiotolerans* в клетках *E. coli* был получен электрофоретически гомогенный препарат рекомбинантного белка AcdS. Установлено, что ген *acdS* *M. radiotolerans* действительно кодирует АЦК-дезаминазу, которая использует АЦК в качестве единственного субстрата (Fedorov et al., 2013). Определены кинетические характеристики, оптимумы активности и гомотетрамерная структура фермента.

Инокуляция растений капусты полевой (*Brassica campestris*) *Methylobacterium fujisawaense* привела к типичным для бактерий, содержащих АЦК-дезаминазу, эффектам – снижению уровня выделяемого растениями этилена, стимуляции удлинения корней, а также снижению концентрации АЦК в проростках (Madhaiyan et al., 2006a). Аналогичные эксперименты были проведены с *M. oryzae* (Madhaiyan et al., 2007). Исследования *M. oryzae* также продемонстрировали, что бактерии, имеющие АЦК-дезаминазу, могут использовать АЦК в качестве источника азота (Kwak et al., 2014). Инокуляция проростков риса и томата этими штаммами приводила к обычным эффектам (Chinnadurai et al., 2009).

3.4 D-цистеиндесульфогидраза у метилотрофных бактерий

Рекомбинантная D-цистеиндесульфогидраза DcyD, которая, по-видимому, участвует в ассоциации с растениями, у метиловых бактерий впервые описана у штамма *Methylobacterium extorquens* AM1. Также впервые получен мутант *M. extorquens* с делецией гена *dcyD*, у которого полностью отсутствует активность D-цистеиндесульфогидразы. Комплементация мутации по гену *dcyD* привела к значительному увеличению активности DcyD в экстрактах по сравнению со штаммом дикого типа, что доказывает участие этого фермента в катаболизме D-цистеина (Шихсаидов, 2010).

Принимая во внимание накопленные данные, необходимы дополнительные эксперименты, чтобы доказать участие АЦК-дезаминаз и особенно D-цистеиндесульфогидраз метиловых бактерий в повышении устойчивости растений к различным видам стресса, что поможет расширить потенциал использования метилотрофов в качестве стимуляторов роста и развития, а также приблизит к более глубокому пониманию основ растительно-микробного симбиоза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

4. Материалы и методы

4.1 Объекты исследований

В работе использовали штаммы аэробных метилотрофных бактерий из коллекции лаборатории радиоактивных изотопов ИБФМ РАН и типовые культуры, предоставленные А. Tani (Institute of Plant Science and Resources, Okayama University). (таблица 4.1.1).

Таблица 4.1.1 Штаммы аэробных метилотрофных бактерий, использованные в работе.

Группа	Вид	Штамм
<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Hansschlegelia plantiphila</i>	S ₁ = NCIMB 14035 = VKM B-2347
	<i>Methylobacterium adhaesivum</i>	AR27 = CCM 7305 = CECT 7069 = DSM 17169
	<i>Methylobacterium aerolatum</i>	5413S-11 = DSM 19013 = JCM 16406 = KACC 11766
	<i>Methylobacterium aminovorans</i>	ATCC 51358 = JCM 8240 = VKM B-2145
	<i>Methylobacterium brachiatum</i>	B0021 = DSM 19569 = NBRC 103629 = NCIMB 14379
	<i>Methylobacterium brachythecii</i>	99b = NBRC 107710 = DSM 24105
	<i>Methylobacterium cerastii</i>	C15 = CCM 7788 = CCUG 60040 = DSM23679
	<i>Methylobacterium fujisawaense</i>	O-31 = CIP 103775 = ATCC 43884 = NCIMB 12417 = JCM 10890 = DSM 5686
	<i>Methylobacterium gnaphalii</i>	23e = DSM 24027 = NBRC 107716
	<i>Methylobacterium goesingense</i>	iEII3 = CCUG 56109 = DSM21331
	<i>Methylobacterium gossipiicola</i>	Gh-105 = CCM 7572 = NRRL B-51692
	<i>Methylobacterium gregans</i>	002-074 = DSM 19564 = NBRC 103626 = NCIMB 14376
	<i>Methylobacterium haplocladii</i>	87e = DSM 24195 = NBRC 107714
	<i>Methylobacterium hispanicum</i>	GP34 = CCM 7219 = CECT 5997 = CIP 108332 = DSM 16372
	<i>Methylobacterium iners</i>	5317S-33 = JCM 16407 = KACC 11765 = DSM 19015
<i>Methylobacterium isbiliense</i>	AR24 = CCM 7304 = CECT 7068 = DSM 17168	
<i>Methylobacterium jeotgali</i>	S2R03-9 = KCTC 12671 = LMG 23639	
<i>Methylobacterium komagatae</i>	002-079 = DSM 19563 = NBRC 103627 = NCIMB 14377	

Продолжение таблицы 4.1.1 Штаммы аэробных метилотрофных бактерий, использованные в работе.

Группа	Вид	Штамм
	<i>Methylobacterium longum</i>	440 = CECT 7806 = DSM 23933
	<i>Methylobacterium marchantiae</i>	JT1 = CCUG 56108 = DSM 21328
	<i>Methylobacterium mesophilicum</i>	A47 = ATCC 29983 = DSM 1708 = ICPB 4095 = NBRC 15688 = JCM 2829 = NCIMB 11561
	<i>Methylobacterium nodulans</i>	CNCM I 2342 = LMG 21967 = ORS 2060
	<i>Methylobacterium organophilum</i>	ATCC 27886 = JCM 2833 = CIP 101049 = DSM 760 = NCCB 78041 = VKM B-2066
	<i>Methylobacterium oryzae</i>	CBMB20 = DSM 18207 = JCM 16405 = LMG 23582
	<i>Methylobacterium oxalidis</i>	35a = DSM24028 = NBRC 107715
	<i>Methylobacterium persicinum</i>	002-165 = DSM 19562 = NBRC 103628
	<i>Methylobacterium phyllosphaerae</i>	BL47 = NBRC 105206 = ICMP 17619 = DSM 19779
	<i>Methylobacterium podarium</i>	FM4 = ATCC BAA-547 = DSM 15083
	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	ATCC 273229 = DSM 1819 = NBRC 15690 = NCIMB 10815 = VKM B-2144 = JCM 2831
	<i>Methylobacterium rhodesianum</i>	ATCC 43882 = DSM 5687 = NBRC 15844 = JCM 10891 = NCIMB 12249 = VKM B-2142
	<i>Methylobacterium rhodinum</i>	ATCC 14821 = JCM 2811 = VKM B-2065
	<i>Methylobacterium salsuginis</i>	MR = CGMCC 1.6474 = NCCB 100140
	<i>Methylobacterium soli</i>	KCTC 22810
	<i>Methylobacterium suomiense</i>	F20 = DSM 14458 = VKM B-2238
	<i>Methylobacterium tardum</i>	RB677 = DSM 19566 = NBRC 103632
	<i>Methylobacterium thiocyanatum</i>	ATCC 700647 = JCM 10893 = VKM B-2197
	<i>Methylobacterium thuringiense</i>	C34 = CCM 7787 = DSM 23674
	<i>Methylobacterium trifolii</i>	TA73 = LMG 25778 = CCM 7786 = DSM 23632
	<i>Methylobacterium zatmanii</i>	ATCC 43883 = JCM 10892 = VKM B-2161
	<i>Methylopila musalis</i>	DSM 24986 = CCUG 61696 = VKM B-2646
	<i>Methylopila</i> sp.	1G
	<i>Methylosinus trichosporium</i>	ATCC 35070 = NCIMB 11131 = VKM B-2117

Продолжение таблицы 4.1.1 Штаммы аэробных метилотрофных бактерий, использованные в работе.

Группа	Вид	Штамм
	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	ATCC 35674 = DSM 432 = JCM 1202
<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Delftia</i> sp.	LP1 = DCM 24446
	<i>Methylobacillus arboreus</i>	Iva = DSM 23628 = CCUG 59684 = VKM B-2590
	<i>Methylobacillus glycogenes</i>	T-11 = ATCC 29475 = JCM 2850 = VKM B-2060
	<i>Methylobacillus gramineus</i>	DSM 23629 = CCUG 59684 = VKM B-2590
	<i>Methylobacillus pratensis</i>	F31 = NCIMB 13994 = VKM B-2247
	<i>Methylophilus flavus</i>	Ship = DSM 23073 = VKM B-2547
	<i>Methylophilus glucoseoxydans</i>	B = DSM 5898 = VKM B-1607
	<i>Methylophilus luteus</i>	Mim = DSM 22949 = VKM B-2548
	<i>Methylophilus methylotrophus</i>	AS1 = ATCC 53528 = DSM 46235 = VKM B-1623
	<i>Methylophilus quaylei</i>	VKM B-2338
	<i>Methyloversatilis universalis</i>	FAM 5 = CCUG 52030 = JCM 13912
	<i>Methylovorus glucosotrophus</i>	6B1 = ATCC 49758 = DSM 6874 = VKM B-1745.
	<i>Methylovorus mays</i>	BV = NCIMB 13992 = VKM B-2221
	<i>Methylovorus menthalis</i>	MM = CCUG 61695 = DSM 24715 = VKM B-2663
<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Methylomonas methanica</i>	ATCC 35067 = NCIMB 11130 = VKM B-2110
	<i>Methylophaga muralis</i>	Kr3 = NCIMB 13993 = VKM B-2303
<i>Actinobacteria</i>	<i>Amycolatopsis methanolica</i>	239 = DSM 44096 = NBRC 15065 = JCM 8087

В работе использовали штаммы *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) и XL1-Blue (Stratagene) для рутинных операций с плазмидами, *Rosetta* (Novagen) для сверхпродукции рекомбинантных белков AcdS и AcdR, S17-1λpir (Simon et al., 1983) для конъюгативного переноса векторов.

4.2 Условия культивирования

Состав питательных сред.

Среда «К» (г/л): KH_2PO_4 – 2,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,025; NaCl – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,002; $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$ – до 1 л.

Среда 5/5 (г/л): бакто-триптон («Pronadisa», Испания) – 5,0; соевый пептон («Difco», США) – 5,0; дрожжевой экстракт – 1,0; аминокислота («Самсон-Мед», Россия) – 60 мг; $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$ – до 1 л.

Среда R2A(г/л): гидролизат казеина – 0,5; дрожжевой экстракт – 0,5; протеозопептон – 0,5; глюкоза – 0,5; растворимый крахмал – 0,5; пируват натрия – 0,3; K_2HPO_4 – 0,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05; $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$ – до 1 л.

Среда LB (г/л): триптон – 10,0; дрожжевой экстракт – 5,0; NaCl – 10,0; $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист.}}$ – до 1 л.

pH сред устанавливали раствором 5M NaOH до 7,3.

Культивирование метиловых бактерий проводили в колбах объемом 750 мл, содержащих 200 мл среды «К». Непосредственно перед посевом вносили 1 мл метанола в качестве источника углерода. Инокулят добавляли в среду в соотношении 1:10. При культивировании мутантов и трансконъюгантов метиловых бактерий в среду добавляли антибиотики (мкг/мл): налидиксовую кислоту (Nal) – 100, канамицин (Km) – 50, тетрациклин (Tc) – 10. Для проверки чистоты культур метиловых бактерий использовали среду 5/5.

E. coli TOP10, *Rosetta*, XL1-Blue или S17-1λp1g выращивали при 37°C в жидкой или агаризованной (1,5% агара «Difco», США) среде «LB» с добавлением при необходимости селективных антибиотиков: канамицина (Km) – 50 мкг/мл, ампициллина (Amp) – 100 мкг/мл или хлорамфеникола (Cm) – 40 мкг/мл (Sambrook, Russell 2001).

4.3 Основные молекулярно-генетические методы

4.3.1 Выделение геномной ДНК

Очистку хромосомной ДНК проводили модифицированным методом (Sambrook, Russell 2001). Культуру бактерий в начале экспоненциальной фазы роста (10 мл) осаждали, осадок ресуспендировали в 570 мкл TE-буфера. К суспензии добавляли лизоцим до конечной концентрации 1 мг/мл. Тщательно перемешивали и инкубировали 30 мин при 37°C. Затем добавляли 30 мкл 10%-го додецилсульфата натрия (ДСН) и 3 мкл протеиназы К (20 мг/мл) до конечной концентрации 100 мкг/мл. Тщательно перемешивали и инкубировали 1 час при 37°C. Далее к раствору добавляли 100 мкл 5M NaCl и 80 мкл 10% цетилтриметиламмонийбромида (ЦТАБ) в 0,7M NaCl. Лизат выдерживали 10 мин при 65°C. В лизат добавляли равный объем смеси хлороформа и изоамилового спирта (24:1). Тщательно перемешивали и центрифугировали

при 14500 об/мин, 5 мин. Верхнюю фазу, не затрагивая интерфазы, переносили в новую пробирку, добавляли к ней равный объем смеси фенол/хлороформ/изоамиловый спирт (25:24:1) и центрифугировали 5 мин при 14500 об/мин. Затем экстракцию смесью хлороформа и изоамилового спирта повторяли до исчезновения интерфазы.

Для осаждения ДНК добавляли 1 объем изопропанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 15 мин при 14500 об/мин. Осадок ДНК последовательно промывали 70%, 80% и 96%-ми растворами этанола и высушивали на воздухе. ДНК растворяли в 50 мкл TE-буфера. Добавляли 1 мкл РНК-азы (10 мг/мл) (Fermentas) и инкубировали 20 минут при комнатной температуре. Концентрацию ДНК определяли на спектрофотометре «Shimadzu UV-160» (Япония) при 260/280 нм. Растворы ДНК хранили при -20°C .

4.3.2 Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции

Гидролиз ДНК различными эндонуклеазами рестрикции проводили согласно инструкциям фирм «СибЭнзим» (Россия) и «Fermentas» (Литва), используя для каждой эндонуклеазы рекомендованный буфер и соответствующий температурный режим. ДНК разделяли и визуализировали с помощью электрофореза в агарозном геле, используя в зависимости от длины разделяемых ДНК 0,75% – 1%-ю агарозу и TBE буфер. Для оценки размеров фрагментов ДНК использовали ДНК-маркеры молекулярного веса «GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Mix» («Fermentas»).

4.3.3 Очистка фрагментов ДНК

Очистку фрагментов ДНК, полученных в результате гидролиза различными эндонуклеазами рестрикции, а также ПЦР фрагментов проводили двумя способами: непосредственно из реакционной смеси или из агарозного геля после электрофореза. В обоих случаях использовали набор DNA Clean & Concentrator-25 Kit («ZymoResearch», США), согласно рекомендациям фирмы-производителя.

4.3.4 Лигирование фрагментов ДНК

Реакцию лигирования проводили в объеме 10 мкл, содержащем 1×буфер для лигирования («СибЭнзим»), 50-100 нг ДНК вектора и 3-5-кратный молярный избыток клонируемого фрагмента ДНК, 5 ед. ДНК-лигазы бактериофага T4 («СибЭнзим»). Лигирование проводили в течение 12-16 часов при 4°C . По окончании реакции ДНК-лигазу инактивировали в течении 15 минут при 70°C , лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli*.

4.3.5 Получение компетентных клеток и их трансформация

Получение компетентных клеток.

Ночную культуру клеток *E. coli* (0,01 л) вносили в 200 мл среды LB и выращивали при интенсивном перемешивании при 37°C до середины логарифмической фазы ($A_{600} = 0,4 - 0,6$ О.Е.), охлаждали во льду 10 мин и центрифугировали (7000 об/мин, 25 мин при 4°C). Осторожно удаляли надосадочную жидкость, осадок ресуспендировали в 20 мл буфера TFB 1 (30 мМ ацетата калия, 10 мМ CaCl₂, 50 мМ MnCl₂, 100 мМ RbCl, 15% глицерина), выдерживали во льду 30 мин, центрифугировали в тех же условиях. После удаления супернатанта осажденные клетки ресуспендировали в 4 мл TFB2 (10 мМ 3-морфолинопропансульфоновой кислоты (МОПС), 75 мМ CaCl₂, 10 мМ RbCl, 15% глицерина), добавляли 80 мкл диметилсульфоксида (ДМСО), выдерживали 30 минут во льду и распределяли по 50 мкл в предварительно охлажденные пробирки. Аликвоты компетентных клеток хранили при -70°C.

Трансформация компетентных клеток.

В суспензию компетентных клеток *E. coli* (50 мкл) вносили лигазную смесь или раствор ДНК объемом 1-2 мкл, охлаждали пробирки во льду в течении 10 мин, а затем быстро переносили в термостат 42°C на 90 секунд. После инкубации пробирки охлаждали во льду 10 мин. Затем в каждую пробирку добавляли 200 мкл среды LB и инкубировали при 37°C 1 час. Далее суспензию клеток высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей необходимые для селекции трансформированных бактерий антибиотики. При отборе рекомбинантных клонов с помощью «бело-голубого» теста, основанного на α -комплементации β -галактозидазной активности, добавляли X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозид) (80 мкг/мл) и ИПТГ (изопропил-1-тио- β -D-галактопиранозид) (60 мкг/мл) («Melford Laboratories», Англия).

4.3.6 Выделение плазмид из рекомбинантных клонов

Выделение плазмидной ДНК проводили методом щелочного лизиса (Sambrook, Russell 2001), с модификациями. Ночную культуру *E. coli*, содержащую плазмиду, осаждали, ресуспендировали в 100 мкл раствора I (TE-буфера) и добавляли 200 мкл раствора II (1%-й SDS в 0,2 N NaOH), осторожно перемешивали до полного лизиса клеток. К лизату клеток добавляли 150 мкл холодного раствора III (3 M ацетата калия), перемешивали и оставляли во льду на 5 мин. После центрифугирования (14000 об/мин, 30 мин) при 4 °C надосадочную жидкость переносили в чистые пробирки и добавляли один объем изопропанола, инкубировали в течение 30 минут при -20°C. После центрифугирования осадок последовательно промывали 70%- и 96%-м этанолом, высушивали и растворяли в 50 мкл TE-буфера и 0,5 мкл РНКазы (10 мг/мл) (Fermentas). Выход плазмидной ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1%-м агарозном геле.

4.4 Конструирование и подбор праймеров для ПЦР-скрининга генов *acdS* и *dcyD* у представителей рода *Methylobacterium*

Вырожденные олигонуклеотидные праймеры для амплификации генов *acdS* и *dcyD* разрабатывали на основе имеющихся в базе данных GenBank известных нуклеотидных и предсказанных аминокислотных последовательностей, представленных в таблице 4.4.1 и 4.4.2.

Олигонуклеотидные праймеры спроектированы комплементарно участкам, кодирующим наиболее консервативные аминокислотные последовательности, выравненные при помощи программы AlignX из пакета Vector NTI Suite 9.1 (Invitrogen). Затем последовательности праймеров сравнивались с выравненными нуклеотидными последовательностями генов *acdS* и *dcyD* для корректировки их вырожденности. Таким образом, были сконструированы вырожденные праймеры для амплификации гена *acdS*: *acdS*-AF, соответствующий позициям с 103 по 122, *acdS*-AR – позициям с 856 по 878 последовательности гена *acdS* *M. radiotolerans* JCM 2831, предназначенные для амплификации гена *acdS* α -протеобактерий; *acdS*-BGF, соответствующий позициям 139-158, и *acdS*-BGR – позициям с 889 по 911 последовательности гена *acdS* *M. radiotolerans* – для амплификации этого гена β - и γ -протеобактерий. Применение пары праймеров *acdS*-AF-*acdS*-AR позволяет амплифицировать фрагмент *acdS*-гена размером 776 п.н., а *acdS*-BGF- *acdS*-BGR – 773 п.н.

Для амплификации гена *dcyD* были сконструированы следующие вырожденные праймеры: *dcyD*-161F соответствующий позициям с 161 по 181, *dcyD*-971R – позициям с 971 по 991 последовательности гена *dcyD* *M. extorquens* DM4, предназначенные для амплификации *dcyD* у представителей рода *Methylobacterium* (таблица 4.4.3). Применение пары праймеров *dcyD*-161F и *dcyD*-971R позволяет получить специфический фрагмент *dcyD*-гена размером 810 п.н. Олигонуклеотиды были синтезированы фирмой «Евроген» (г. Москва).

Таблица 4.4.1 Последовательности генов АЦК-дезаминаз (*acdS*), использованные для конструирования праймеров.

Организм	Номер доступа в GenBank
<i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS571	NC_009937
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	NC_004463
<i>Methylobacterium nodulans</i> ORS 2060	NC_011984
<i>Methylobacterium</i> sp. 4-46	NC_010511
<i>Methylobacterium radiotolerans</i> JCM 2831	NC_010505
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> d3	AF315580

Продолжение таблицы 4.4.1 Последовательности генов АЦК-деаминаз (*acdS*), использованные для конструирования праймеров.

Организм	Номер доступа в GenBank
<i>Sinorhizobium meliloti</i> KYA40	EU603722
<i>Meiothermus ruber</i> DSM1279	NZ_ABUF01000006
<i>Dickeya dadantii</i>	NC_012880
<i>Dickeya zeae</i>	NC_012912
<i>Pseudamons siringae</i>	NC_007005
<i>Enterobacter cloaceae</i>	AF047710
<i>Pseudomonas putida</i> UW4	AY823987
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	NC_008314
<i>Burkholderia graminis</i>	EU886302
<i>Burkholderia phytofirmans</i>	NC_010676
<i>Burkholderia xenovorans</i>	NC_007952
<i>Burkholderia thailandensis</i>	NC_007650
<i>Ralstonia ricketti</i> 12D	NC_012856
<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1	NC_008825
<i>Polaromonas</i> sp. JS666	NC_007948
<i>Acidovorax</i> sp. JS42	NC_008782
<i>Ralstonia solanacearum</i> UW551	NC_AAKL01000018

Таблица 4.4.2 Последовательности генов D-цистеиндесульфигидраз (*dcyD*), использованные для конструирования праймеров.

Организм	Номер доступа в GenBank
<i>Caulobacter</i> sp. K31	NC_010338.1
<i>Escherichia coli</i> E24377A	NC_009801.1
<i>Shigella flexneri</i> 5 str. 8401	NC_008258.1
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	NC_007348.1
<i>Pectobacterium wasabiae</i> WPP163	NC_013421.1
<i>Methylobacterium populi</i> BJ001	NC_010725.1
<i>Methylobacterium extorquens</i> AM1	NC_012808.1
<i>Methylobacterium chloromethanicum</i> CM4	NC_011757.1
<i>Methylobacterium extorquens</i> DM4	NC_012988.1

Таблица 4.4.3 Праймеры, использованные в работе.

Название праймера	Целевой ген	Нуклеотидная последовательность	Сайт рестрикции
acdS-AF	<i>acdS</i>	5'-GCCAAGCGSGAVGAYTGCAA-3'	нет
acdS-AR		5'-TCRTAGACSGGGTCSGTRATCAT-3'	нет
acdS-BGF		5'-GGCGGSAACAARACSCGCAA-3'	нет
acdS-BGR		5'-ACCAKSTCRATCATGCCSTGCAT-3'	нет
DcyD-161F	<i>dcyD</i>	5'-TGCGCAAGCTCGAATTCCTG-3'	нет
DcyD-971R		5'-CCGCCGGTCATCACGAACAG-3'	нет
Mr-acdS-MF	<i>acdS</i>	5'-CAATCCGGAATTCCTCTGCAGCTGAG-3'	EcoRI
Mr-acdS-MR	<i>M. radiotolerans</i>	5'-GATCAAGCTTGCCCTCTCCGGTTC-3'	HindIII
Mr-acdR-MF	<i>acdR</i>	5'-GGGTAAGCTTCCTCACAGATCGAG-3'	HindIII
Mr-acdR-MR	<i>M. radiotolerans</i>	5'-CGAGGTACCGCTCCGTCTTCGAGG-3'	Acc65I
Mr-mxaFpr-1f	<i>mxoF</i> <i>M. radiotolerans</i>	5'-CATCGCTAGCGCCTGTCTGGGGTGAAG-3'	NheI
Mr-mxaFpr-1r		5'-GAGACGGCATGCCGGAGCCTGATCATC-3'	SphI
Mr-acdS-1f	<i>acdS</i> <i>M. radiotolerans</i>	5'-TGGATCCCTAGACCCGGAGAGACCCGATG-3'	BamHI
Mr-acdS-1r		5'-ATGAATTCAGCCGTTGCGGAACGTGTAG-3'	EcoRI
Mrad-acdR29-for	<i>acdR</i> <i>M. radiotolerans</i>	5'-TCTCGATCTAGAAGCTCAGACAT-3'	XbaI
Mrad-acdR29-rev		5'-CGACCGCTGGGTACCGTTGCGGAAG-3'	Acc65I
Mnod-acdS-UbF	<i>acdS</i>	5'-AAGGATCCGTGCTGGAGAAATTCGAACG-3'	BamHI
Mnod-acdS-UbR	<i>M. nodulans</i>	5'-AACAAAGCTTCAGCCGTTGCGGAAGGTGTAG-3'	HindIII
Mr-acdR-UbF	<i>acdR</i>	5'-CTCCGCGGTGGTATGACCCTGAAAGAATCGTCCA-3'	Cfr42I
Mr-acdR-UbR	<i>M. radiotolerans</i>	5'-CATAAGCTTTCACAGATCGAGGGGCGCGTTGTC-3'	HindIII
Amy-acdS-2F	<i>acdS</i> <i>Amycolatopsis methanolica</i> 239	5'-GGACCGCGGTGGTATGTCCCTGGACGACTTC-3'	Cfr42I
Amy-acdS-2R		5'-ACTAAGCTTCAGCTGAACAGCGCGCTGTAG-3'	HindIII
Mr-acdR-68r	<i>acdS- acdR</i> <i>M. radiotolerans</i>	5'-AGGAGGCGGAGGATCTTCTG-3'	нет
P-acdSR		5'-GAAAACCTACCCGATCCGC-3'	нет

4.5 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) осуществляли на амплификаторе BIO-RAD MJ Mini (США) в реакционной смеси следующего состава (30 мкл): 1×буфер для Taq-ДНК-полимеразы, по 2 мМ каждого из дНТФ («ThermoScientific»), по 1 мкМ соответствующих праймеров («Евроген», Россия), 50 – 100 нг геномной ДНК, 3 - 5 % диметилсульфоксида (Sigma), 2,5 ед. Taq-ДНК-полимеразы («СибЭнзим», Россия). Цикл амплификации состоял из денатурации ДНК при 94°C – 3 мин., последующие 30 циклов: денатурации 94°C – 30 с., отжига праймеров – 20 с. и элонгации ДНК при 72°C – 2 мин. Завершали амплификацию дополнительным синтезом ДНК при 72°C, 2 мин. Для каждой комбинации праймеров/ДНК-матрицы были подобраны оптимальные условия ПЦР с помощью градиента температуры отжига и концентрации ДМСО.

Для последующего клонирования амплификацию генов *acdS* и *acdR* проводили с использованием высокоточной *Pfu*-ДНК-полимеразы («СибЭнзим»). Реакционная смесь (30 мкл) содержала 10 нг ДНК, по 0,2 мМ каждого из четырёх дНТФ, 1×ПЦР буфер для *Pfu*-ДНК-полимеразы («СибЭнзим»), БСА 0,1 мг/мл, 10 пмоль каждого праймера (таблица. 4.9.3) и 1 ед. *Pfu*-ДНК-полимеразы («СибЭнзим»).

Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1%-м агарозном геле, в TBE буфере, при напряженности поля 6 В/см². Для оценки размеров фрагментов ДНК использовали ДНК-маркеры молекулярного веса «GeneRuler™ 100 bp DNALadder» («Fermentas»).

4.6 Секвенирование ДНК

Секвенирование ДНК выполнено в Межинститутском центре «ГЕНОМ» ИМБ РАН на автоматическом секвенаторе ABI PRISM (США) с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1. Нуклеотидные последовательности транслировали в аминокислотные, используя программу Gene Runner.

4.7 Филогенетический анализ

Предварительный филогенетический анализ нуклеотидных и транслированных аминокислотных последовательностей исследованных генов изучаемых штаммов по базе данных GenBank [NCBI] проводили с помощью пакета программ BLAST [<http://ncbi.nlm.nih.gov>]. Для более точного определения филогенетического положения нуклеотидные или аминокислотные последовательности выравнивали вручную с соответствующими последовательностями референтных штаммов с помощью программы CLUSTAL X (Larkin et al., 2007) из последней версии базы данных NCBI Database Project. Для перевода нуклеотидных последовательностей в аминокислотные была использована программа GeneRunner. Выравнивание аминокислотных последовательностей были проведены при помощи программы CLUSTAL X (Larkin et al., 2007).

Для построения филогенетического дерева аминокислотных последовательностей использовали модель UPGMA (unweighted-pair group method with average linkages), реализованная в пакете программ MEGA (Tamura et al. 2013), для тестирования надежности построенного дерева использовали значения bootstrap для 1000 повторностей. В случае нуклеотидных последовательностей гена 16S рПНК бактерий применяли метод ближайших соседей (Neighbor-Joining) в программе MEGA 6. Надежность построенного дерева была проверена значением bootstrap для 1000 деревьев.

4.8 Получение мутантов *M. radiotolerans* с делециями в генах *acdS* и *acdR*

Получение мутантных штаммов *M. radiotolerans* с делециями в генах *acdS* и *acdR* проводили при помощи гомологичной рекомбинации.

Для делеции гена *acdS* (Mrad2831_1521) из геномной ДНК *M. radiotolerans* амплифицировали ПЦР-фрагмент размером 1,5 т.п.н., содержащий полную последовательность гена *acdS*, фланкированную дополнительными 300 нуклеотидами, при помощи праймеров Mr-*acdS*-MF и Mr-*acdS*-MR (таблица 4.9.1). Полученный фрагмент, предварительно обработанный эндонуклеазами EcoRI и HindIII, клонировали в векторе pUC18, раскрытом по тем же сайтам рестрикции, что дало вектор p7A-17 (таблица 4.8.1). Далее SalI-фрагмент размером 1,5 т.п.н. из p34S-Tc, содержащий кассету устойчивости к тетрациклину, клонировали в векторе p7A-17, раскрытом по сайтам XhoI. Полученный таким образом вектор p7A-21 содержал мутантный аллель гена *acdS* в котором центральная часть гена размером 0,7 т.п.н. замещена на Tc^r-кассету (таблица 4.8.1). Затем EcoRI-HindIII-фрагмент, содержащий мутантный аллель гена *acdS* из плазмиды p7A-21, клонировали в мобилизуемом суицидальном векторе pK18mob (таблица 4.8.1).

Полученную плазмиду p7A-22 (таблица 4.8.1) использовали для переноса в клетки *M. radiotolerans* JCM2831 и селекции рекомбинантов (Tc^r). Для этого сконцентрированные клетки *M. radiotolerans* JCM2831 (реципиент плазмиды), отобранные в ранней экспоненциальной фазе роста (OD₆₀₀ 0,2-0,3), смешивали с «ночной» культурой клеток *E.coli* S17-1λpir /p7A-22 (донором плазмиды), предварительно отмытых средой «К» (соотношение донор: реципиент 1:5). Смесь клеток наносили на поверхность агаризованной среды «К», содержащей 0,5% метанола и 0,02% казаминовых кислот, и инкубировали при 28°C в течение суток. Затем клетки смывали стерильной средой «К», разбавляли в 10 и 100 раз и наносили на чашки со средой «К», содержащей 2% метанола, налидиксовую кислоту и селективные антибиотики. Только двойных рекомбинантов (Tc^r, Km^s) очищали двукратным пересевом из единичных колоний на селективной среде с соответствующими антибиотиками. Дополнительно рекомбинантов проверяли при помощи ПЦР на наличие мутантного аллеля.

Таблица 4.8.1 Плазмиды, использованные в работе.

Плазмида	Характеристика, генотип	Ссылка
pUC18	Вектор для клонирования, Ap ^r	(Yanisch-Perron et al., 1985)
pHUE	Вектор для экспрессии аутентичных рекомбинантных белков, Ap ^r	(Catanzariti et al., 2004)
pK18mob	Мобилизуемый вектор для клонирования, Km ^r	(Schäfer et al., 1994)
p34S-Tc	Вектор, содержащий Tc ^r -кассету, Tc ^r , Ap ^r	(Dennis, Zylstra 1998)
pCM160	Мобилизуемый вектор для экспрессии белков в <i>M. extorquens</i> под контролем промотора <i>mxaF</i> , Km ^r	(Marx, Lidstrom, 2001)
p7A-29	Производная pCM160, содержащая клонированный по сайтам NheI-SphI промотор метанолдегидрогеназы (<i>mxaF</i>) из <i>M. radiotolerans</i> , Km ^r	Данная работа
p7A-17	pUC18, содержащий EcoRI/HindIII-фрагмент с геном <i>acdS</i> из <i>M. radiotolerans</i> JCM 2831	Данная работа
p7A-21	p7A-17, содержащий Tc ^r -кассету, клонированную по сайтам XhoI (Δ <i>acdS::tetA</i>)	«»
p7A-22	pK18mob содержащий 2,2 т.п.н. EcoRI/HindIII -фрагмент из p7A-21	«»
p7A-134	pK18mob содержащий 0,6 т.п.н. Acc65I/HindIII -фрагмент с геном <i>acdR</i> из <i>M. radiotolerans</i> JCM 2831	«»
p7A-135	p7A-134 с клонированной по сайту BamHI Tc ^R -кассетой из p34S-Tc	«»
p7A-36	p7A-29, содержащий клонированный по сайтам BamHI-EcoRI фрагмент ДНК с геном <i>acdS</i> из <i>M. radiotolerans</i> JCM2831	«»
p7A-136	p7A-29, содержащий клонированный по сайтам XbaI-Acc65I фрагмент ДНК с геном <i>acdR</i> из <i>M. radiotolerans</i> JCM2831	«»
p7A-127	pHUE, содержащий клонированный по сайтам Cfr42I - HindIII OРС гена <i>acdR</i> из <i>M. radiotolerans</i> JCM2831	«»

Продолжение таблицы 4.8.1 Плазмиды, использованные в работе.

Плазмида	Характеристика, генотип	Ссылка
p7A-126	pHUE, содержащий клонированный по сайтам Cfr42I и HindIII ген <i>acdS</i> из <i>Amycolatopsis methanolica</i> 239	(Екимова с соавт., 2015)
p7A-129	Производная pHUE, содержащая клонированный по сайтам BamHI и HindIII ген <i>acdS</i> из <i>M. nodulans</i> ORS 2060	(Fedorov et al., 2013)
pAC5mut2	Экспрессионный вектор, содержащий ИПТГ-индуцибельный промотор P_{trc}	(Novakova et al., 1998)
pSB40N	Вектор, несущий <i>lacZa</i> в качестве репортерного гена	Rezuchova, Kormanec, 2001).

Аналогичным образом для делеции регуляторного гена *acdR* (Mrad2831_1520) из геномной ДНК *M. radiotolerans* амплифицировали ПЦР-фрагмент размером 0,6 т.п.н., содержащий полную последовательность гена *acdR*, с помощью праймеров Mr-*acdR*-MF и Mr-*acdR*-MR. ПЦР-фрагмент, предварительно обработанный эндонуклеазами Acc65I и HindIII, клонировали в векторе pK18mob, раскрытом по тем же сайтам рестрикции, что привело к созданию вектора p7A-134 (таблица 4.8.1). Далее BamHI-фрагмент размером 1,5 т.п.н. из p34S-Tc, содержащий кассету устойчивости к тетрациклину клонировали в векторе p7A-134, раскрытому по этим же сайтам.

Полученную таким образом плазмиду p7A-135 (таблица 4.8.1), содержащую мутантный аллель гена *acdR* с инсерцией Tc^r-кассеты в центральной части, использовали для переноса в клетки *M. radiotolerans* JCM 2831 и селекции рекомбинантов (Tc^r, Km^s) при помощи метода конъюгации, описанного выше.

4.9 Получение комплементированных мутантов *M. radiotolerans* по генам *acdS* и *acdR*

С помощью праймеров Mr-*mxaFpr*-1f Mr-*mxaFpr*-1r был амплифицирован фрагмент, содержащий область промотора метанолдегидрогеназы (*mxaF*) *M. radiotolerans* JCM2831. Обработав рестриктазами NheI и SphI, его клонировали в экспрессионном векторе pCM160, предварительно раскрытом по этим же сайтам, что дало плазмиду p7A-29, предназначенную для экспрессии белков в *M. radiotolerans* (таблица 4.8.1).

Для комплементации мутаций Δ *acdS* и Δ *acdR* у *M. radiotolerans*, при помощи сочетаний праймеров Mr-*acdS*-1f и Mr-*acdS*-1r, а также Mrad-*acdR*29-for и Mrad-*acdR*29-rev

амплифицировали ПЦР-фрагменты, содержащие ОРС соответствующих генов с последовательностями Шайна-Дальгарно (таблица 4.4.3). Фрагмент, содержащий ген *acdS*, предварительно обработанный BamHI и EcoRI, клонировали в экспрессионном векторе p7A-29, раскрытом по этим же сайтам, что дало плазмиду p7A-36 (таблица 4.8.1). Фрагмент, содержащий ген *acdR*, предварительно обработанный XbaI и Acc65I, клонировали в экспрессионном векторе p7A-29, раскрытом по этим же сайтам, что дало плазмиду p7A-136 (таблица 4.8.1).

Плазмиды p7A-29, p7A-36 и p7A-136 перенесены в клетки мутантов при помощи конъюгации, как описано в разделе 4.8. В результате получены штаммы $\Delta acdS/p7A-29$ и $\Delta acdS/p7A-36$, $\Delta acdR/p7A-29$ и $\Delta acdR/p7A-136$ (Tc^r, Km^r). Трансконъюгантов, несущих исходные векторы p7A-29, использовали в качестве отрицательного контроля.

4.10 Определение активности АЦК-деаминазы у различных штаммов *M. radiotolerans*

Штаммы *M. radiotolerans* JCM 2831, $\Delta acdS$, $\Delta acdR$, $\Delta acdS/p7A-29$, $\Delta acdR/p7A-29$, $\Delta acdR/p7A-136$, $\Delta acdS/p7A-36$ выращивали в среде «К» с метанолом. Затем все культуры в экспоненциальной фазе роста разделяли на две части, к одной из которых добавляли 10 мМ 2-аминоизобутирата в качестве индуктора синтеза АЦК-деаминазы. После инкубации в течение ночи, клетки центрифугировали (4500g, 30 мин) и отмывали буфером 50 мМ Tris-HCl pH 8,0 и ресуспендировали в нём же. Разрушение клеток проводили обработкой ультразвуком на ультразвуковом дезинтеграторе Misonix Ultrasonic Liquid Processor S-4000/ CL5 (35 Гц, 8 раз по 15 сек с 50 сек интервалами) при 4°C. Неразрушенные клетки и их фрагменты отделяли центрифугированием (10000g, 15 мин), супернатант использовали для определения активности фермента.

Активность 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазы (НФ 3.5.99.7) определяли колориметрическим методом по образованию α -кетобутирата (Honma, Shimomura 1978). Реакционная смесь в 0,5 мл содержала (мкмоль): Tris (pH 8.0) – 25; пиридоксальфосфат – 0,01, 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота – 100, белковый экстракт – 50 мкл. Реакцию начинали добавлением 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата; инкубацию проводили 30 мин при 30 °C. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 0,56 М HCl и центрифугировали (5 мин, 16000 g). К 0,5 мл супернатанта добавляли 400 мкл 0,56 М HCl и 150 мкл 0,2% раствора 2,4-динитрофенилгидразина в 2 М HCl и инкубировали 30 мин при 30 °C. Реакционную смесь нейтрализовали 1 мл 2 М NaOH и измеряли оптическую плотность при 540 нм. Для калибровки использовали стандартные растворы с известными концентрациями α -кетобутирата.

Активность очищенного фермента определяли спектрофотометрически на регистрирующем спектрофотометре «Shimadzu UV-1700» (Япония) в термостатированной

кувете при 30°C по окислению НАДН в сопряженной реакции с лактатдегидрогеназой из мышц кролика (Nagasawa et al., 1985). Реакционная смесь 2 мл содержала (мкмоль): калий-фосфатный буфер (pH 8.0) – 100, пиридоксальфосфат – 0,02, НАДН – 0,2, лактатдегидрогеназа (Serva) – 10 ед., 1-аминоциклопропан-1-карбоновая кислота (Fluka) – 2, AcdS – 0,0001. Реакцию начинали добавлением раствора субстрата. Активности фермента измеряли в двух независимых экспериментах и трех повторностях.

4.11 Создание векторов для сверхэкспрессии рекомбинантных белков

ПЦР-фрагмент, содержащий ОРС гена *acdS* (Mnod_5479) из *M. nodulans*, был амплифицирован из геномной ДНК *M. nodulans* при помощи праймеров Mnod-acdS-UbF и Mnod-acdS-UbR. Полученный ПЦР-фрагмент обработанный рестриктазами BamHI и HindIII, клонировали в экспрессионном векторе pHUE (Catanzariti et al., 2004), раскрытом по этим же сайтам рестрикции, в результате чего получили вектор p7A-129 (таблица 4.8.1).

Аналогичным образом ОРС гена *acdS* (AMETH_2787) амплифицировали из геномной ДНК *A. methanolica* при помощи праймеров Amy-acdS-2F и Amy-acdS-2R, ПЦР-фрагмент, обработанный рестриктазами Cfr42I и HindIII, клонировали в экспрессионном векторе pHUE, раскрытом по этим же сайтам рестрикции, в результате чего получили вектор p7A-126 (таблица 4.8.1).

Регуляторный ген *acdR* *M. radiotolerans* был амплифицирован из геномной ДНК *M. radiotolerans* при помощи праймеров Mr-acdR-UbF и Mr-acdR-UbR, ПЦР-фрагмент, обработанный рестриктазами Cfr42I и HindIII, клонировали в экспрессионном векторе pHUE, раскрытом по этим же сайтам, что дало вектор p7A-127 (таблица 4.8.1).

Последовательности полученных векторов были подтверждены секвенированием.

4.12 Основные биохимические методы

4.12.1 Экспрессия и очистка рекомбинантных белков His₆-AcdS и His₆-AcdR

Для экспрессии рекомбинантных белков His₆-AcdS_{ORS2060}, His₆-AcdS₂₃₉ и His₆-AcdR_{JCM2831}, клетки *E.coli* Rosetta, трансформированные плазмидами p7A-129, p7A-126 и p7A-127 соответственно, выращивали в 2 л среды LB с добавлением ампициллина и хлорамфеникола при 28°C до OD₆₀₀ = 0,6-0,7. Синтез белка индуцировали добавлением 0,2 мМ ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ; клетки инкубировали в течение ночи на качалке (180 об/мин) при 28°C. Скрининг клонов на сверх-экспрессию белков проводили стандартным ДСН-ПААГ электрофорезом по методу Лэммли (Laemmli, 1970).

Очистку рекомбинантных белков проводили металл-хелатной хроматографией в соответствии с инструкцией фирмы «Qiagen» (Германия), с небольшими изменениями (Henco,

1992). Клетки осаждали центрифугированием (4500g, 30 мин) при 4°C, осадок ресуспендировали в связывающем буфере с pH 8,0, содержащем 0,5 М NaCl, 5 мМ имидазола и 20 мМ Tris-HCl. Ресуспендированные клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе Misonix Ultrasonic Liquid Processors (35 Гц, 9 раз по 0,2 мин с 1 мин интервалами) во льду. Клеточный лизат центрифугировали (10000 g, 30 мин) при 4°C, супернатант наносили на колонку, содержащую 1 мл Ni²⁺-нитрилтриацетатной (НТА) агарозы («Qiagen»). Последовательно вносили в колонку 3 мл и 2 мл связывающего буфера, затем 3 мл и 2 мл промывающего буфера (pH 8,0, 0,5 М NaCl, 60 мМ имидазола, 20 мМ TrisHCl). Связанные рекомбинантные белки элюировали с колонки буфером следующего состава: 40 мМ TrisHCl (pH 8,0), 0,5 М NaCl, 200 мМ имидазола. Белковые фракции по 0,5 мл проверяли при помощи ДСН-ПААГ. Препараты белков обрабатывали деубиквитилирующей протеазой Usp2-cc (Catanzariti et al., 2004). После диализа в течение ночи в 40 мМ Tris HCl (pH 8,0) и 0,5 М NaCl, белок очищали металл-хелатной хроматографией от His₆-tag меченых убиквитина и Usp2-cc. Концентрацию белков определяли спектрофотометрически, с применением коэффициента экстинкции, рассчитанного по предсказанной аминокислотной последовательности в пакете программ Vector NTI Suite 9.1 (Invitrogen), а также по методу Бредфорда, используя БСА в качестве стандарта (Bradford, 1976). Препараты всех белков хранили при 4°C.

4.12.2 Определение физико-химических свойств ферментов

Электрофорез белков в денатурирующих, восстанавливающих условиях проводили в 10% линейном ПААГ по модифицированному методу Лэммли (Laemmli, 1970). В случае электрофореза регуляторного белка AcdR *M. radiotolerans* использовали 20% ПААГ. Гель окрашивали Кумасси G-250. В качестве маркеров использовали набор стандартных белков фирмы «Хеликон» (Россия).

4.12.3 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили при помощи стандартных методов, реализованных в программе SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc.). Аппроксимацию зависимостей активности ферментов от концентрации субстратов проводили при помощи уравнений Хилла и Михаэлиса-Ментен, реализованных в модуле Enzyme Kinetics 1.3 программы Systat SigmaPlot 10.0.

4.12.4 Гельпроникающая хроматография

Молекулярную массу фермента AcdS *M. nodulans* и *A. methanolica* определяли при помощи гельпроникающей хроматографии на Sephacryl S-200 колонке (1.5 × 40 cm, Pharmacia),

уравновешенной буфером следующего состава: 50 mM Tris pH 7.5 (скорость потока 1 мл/мин). В качестве стандартов молекулярной массы использовали ферритин (450 кДа), каталазу (240 кДа), альдолазу (162 кДа), БСА (68 кДа), овальбумин (45 кДа) и цитохром *c* (12 кДа).

4.12.5 Нативный ПААГ-электрофорез

Электрофорез белков в нативных условиях проводили в полиакриламидном геле с градиентом концентрации акриламида 4% - 30%, согласно рекомендациям фирмы Pharmacia.

4.13 Анализ образования комплексов AcdR - ДНК методом задержки в геле

В качестве ДНК-субстратов в опытах по образованию комплексов AcdR – ДНК методом задержки в геле использовали ПЦР-фрагмент, амплифицированный из геномной ДНК *M. radiotolerans*, используя [γ - 32 P] АТФ меченые праймеры Mrad-acdR-68r и P-acdSR (таблица 4.4.3). Мечение праймеров проводили с использованием полинуклеотидкиназы фага Т4 («Fermentas», Литва) и [γ - 32 P] АТФ согласно рекомендациям производителя. Уровень радиоактивности в образцах определяли с помощью сцинтилляционного счётчика Beckman Coulter LS6500 Multipurpose Scintillation Counter.

Синтезированные ПЦР-продукты предварительно очищали. На первом этапе очистки ПЦР-продукты разделяли гель-электрофорезом в 5% ПААГ с последующим вырезанием участка геля, содержащего фрагмент ДНК нужного размера. Затем гель растирали до гомогенного состояния, элюировали из него ДНК раствором 1M NaCl, осаждали ДНК изопропанолом и растворяли в 100 мкл ТЕ-буфера (pH 8,0). Дальнейшую очистку ДНК-субстрата проводили с использованием хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе («Whatman», Великобритания). ПЦР-фрагмент наносили на предварительно уравновешенную 0,2 M NaCl колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, промывали носитель тем же раствором и элюировали ДНК 1 M NaCl. Элюированный препарат ДНК осаждали изопропанолом в присутствии 15 мкг гликогена («Fermentas»), 0,3 M ацетата калия и растворяли в ТЕ-буфере.

Комплексообразование проводили в 20 mM Трис-HCl буфере (pH 8,0), содержащем 10 mM MgCl₂, в присутствии конкурирующей ДНК спермы сельди в концентрации 200 мкг/мл. Образование комплексов анализировали электрофорезом в 5% ПААГ, гели высушивали и визуализировали с использованием системы «Cyclone Storage Phosphor System» («Packard Instruments Co», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

5. Обсуждение полученных результатов

5.1 ПЦР-скрининг генов АЦК-дезаминазы и D-цистеиндесульфогидразы у аэробных метилотрофных бактерий

Вследствие тесной ассоциации с растениями, метилотрофы могут использовать различные растительные экссудаты в качестве источников питательных веществ. Особую роль в симбиозе бактерий с растениями играет их способность деградировать 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат, предшественник в биосинтезе этилена растениями (Glick et al., 2007a).

Известно, что в геномах многих бактерий, являющихся частью аборигенной микрофлоры филлосферы и ризосферы, таких как *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Azorhizobium*, а также *Pseudomonas*, *Burkholderia* и многих других, присутствуют гены АЦК-дезаминазы, которая принимает участие в стимуляции роста и развития растений за счет снижения уровня фитогормона этилена (Glick et al., 2007a,b). Идентификация гена *acdS*, кодирующего АЦК-дезаминазу, затрудняется высоким уровнем сходства аминокислотной последовательности с другим пиридоксальфосфат-зависимым ферментом D-цистеиндесульфогидразой, который также обнаружен у растений, что дополнительно указывает на участие этих бактериальных ферментов в фитосимбиозе (Mcdonnell et al., 2009).

О близком родстве D-цистеиндесульфогидраз и АЦК-дезаминаз свидетельствует и то, что замена только двух аминокислот в активных центрах приводит к взаимопревращению этих ферментов. Так, например, замены серинового остатка в позиции 358 на глутаматный (S358E) и треонинового остатка в позиции 386 на лейциновый (T386L) у D-цистеиндесульфогидразы томата привели к полной потере нативной активности и появлению АЦК-дезаминазной активности. Напротив, замены глутаматного остатка в позиции 295 на сериновый (E295S) и лейцинового остатка в позиции 322 на треониновый (L322T) у АЦК-дезаминазы *P. putida* привели к изменению субстратной специфичности фермента (рисунок 5.1.1) (Todorovic, Glick, 2008). Выравнивание указывает на то, что белки из *Methylobacterium*, скорее всего, являются АЦК-дезаминазами или D-цистеиндесульфогидразами, так как аминокислотные остатки активных сайтов совпадают с аминокислотами уже изученных ферментов.

		*		▼			
K-12	:	EAVKLLARLEGI	LLDPVYT	GKAMAGLIDG	ISQK-RFKDEGPI	ILFIHTCGAPALFAYHPHV	:
Arabidopsis	:	EFVKKVASSTG	VILDPVYS	GKAAAYGLINE	ITKDPKCWEGRK	ILFIHTCGLLGLYDKVDQM	:
Tomato	:	KFVKQVAETT	GVILDPVYS	GKAAAYGMMKDM	GENPTKWEGRK	ILFIHTCGLLGLYDKADEI	:
JCM10892	:	EAVRLMARTEGL	LLDPVYS	GKAFAGLLHDV	RTG-TYAWGETV	LFVMTGN-----	:
CGMCC1.647	:	EAVRLMARTEGL	LLDPVYS	GKAFAGLLHDV	RAG-GYPAGAAV	LFVMTCGVPGLFAYRGAF	:
F20	:	EAVRLMARTEGL	LLDPVYS	GKAFAGLLHDV	RAG-----	-----	:
23e	:	EAVTLMAQTEGM	LLDPVYS	GKAFAGLLADV	RPR-----	-----	:
BJ001	:	EAVRLMARTEGL	LLDPVYS	GKAFAGLLHDV	RAG-AYARGDAV	LFVMTCGVPGLFAYRGEF	:
JCM10891	:	EAVRLMARTEGL	LLDPVYS	GKAFAGLLHDV	RTG-----	-----	:
TA73	:	EAVTLMAQTEGM	LLDPVYS	GKAFAGLLADV	RAA-HR-----	-----	:
PA1	:	EAVRLMARTEGL	LLDPVYS	GKAFAGLLHDV	RAG-RYERGAAV	LFVMTCGVPGLFAYRSEF	:
CM4	:	EAVRLMARTEGL	LLDPVYS	GKAFAGLLHDV	RAG-LYERGAAV	LFVMTCGVPGLFAYRSEF	:
DM4	:	EAVRLMARTEGL	LLDPVYS	GKAFAGLLHDV	RAG-RYERGAAV	LFVMTCGVPGLFAYRSEF	:
AM1	:	EAVRLMARTEGL	LLDPVYS	GKAFAGLLHDV	RAG-RYERGAAV	LFVMTCGVPGLFAYRSEF	:
JCM2840	:	EAVRLMARTEGL	LLDPVYS	GKAFAGLLHD	-----	-----	:
phyllostac	:	VAVRLMARTEGK	LLDPVYS	GKAFAGLLHDV	RAG-LYPAGSSV	LFVMTGGTGFIFAYKDV	:
pseudosas	:	EAVRLVARTEGK	LLDPVYS	GKAFAGLLHDV	RAG-LYPSGSSV	LFVMTGGTGPVFAYKDTL	:
ALL/SCN-P	:	EAVRLMARTEGL	LLDPVYS	GKAFAGLLHDV	RAG-A-----	-----	:
BL36	:	EAIRLSARLEGM	ITDPVYE	EKSMQGMIDL	VKKG-FFPKGSKV	LYAHLGGAPALNGYSYTF	:
CBMB20	:	EAIRLSARLEGM	ITDPVYE	EKSMQGMIDL	VKKG-FFPKGSKV	LYAHLGGAPALNGYSYTF	:
CBMB27	:	EAIRLSARLEGM	ITDPVYE	EKSMQGMIDL	VKKG-FFPKGSKV	LYAHLGGAPALNGYSYTF	:
ORS2060	:	DAIRLCARLEGM	ITDPVYE	EKSMQGMIDL	VRRK-FFPAGSKV	LYAHLGGAPALNGYGYTF	:
4-46	:	EAIRLCGRLEGM	ITDPVYE	EKSMQGMIDL	VRRK-FFPAGAKV	LYAHLGGAPALNGYAYAF	:
BL47	:	EAIRLSARLEGM	ITDPVYE	EKSMQGMIDL	VKKG-FFPKGSKV	LYAHLGGAPALNGYSYTF	:
DSM16371	:	EAIRLAARLEAM	ITDPVYE	EKSMQGLIDL	VQTG-FFPKGAKV	LYAHLGGAPALNGYSYTF	:
JCM14648	:	EAIRLAARLEAM	ITDPVYE	EKSMQGMIDL	VQKG-FFPKGSKV	LYAHLGGAPALNGYSYTF	:
239	:	DAMKLAARTEGM	VTDPVYE	EKSMAGLIDL	VSRK-EIPAGSTV	LYAHLGGQPALNGYSALF	:
JCM2831	:	EAIRLSARLEGM	ITDPVYE	EKSMQGMIDL	VKKG-FFPKGSKV	LYAHLGGAPALNGYSYTF	:
DSM16961	:	EAIRLAARLEAM	ITDPVYE	EKSMQGMIDL	VQKG-FFPKGSKV	LYAHLGGAPALNGYSYTF	:
DSM25844	:	EAIRLAARLEAM	ITDPVYE	EKSMQGMIDL	VQKG-FFPKGSKV	LYAHLGGAPALNGYSYTF	:
UW4	:	EAIRLCGSLEGV	LITDPVYE	EKSMHGMIE	MVRRG-EFPDGS	KVLYAHLGGAPALNAYSFLF	:

DЦДС

АЦКД

Рисунок 5.1.1 Выравнивание аминокислотных последовательностей активных центров различных АЦК-деаминаз и D-цистеиндесульфогидаз. Звездочка указывает на позицию, соответствующую остатку серина 358 у D-цистеиндесульфогидазы томата и остатку глутамата 295 у АЦК-деаминазы *P. putida*. Стрелка указывает на позицию, соответствующую остатку треонина 386 у D-цистеиндесульфогидазы томата и остатку лейцина 322 у АЦК-деаминазы *P. putida*. K-12 - *Escherichia coli* K-12 (AP_002534), Arabidopsis - *Arabidopsis thaliana* (NP_175275), tomato - *Solanum lycopersicum* (NP_001234368), JCM 10892 - *Methylobacterium zatmanii* JCM 10892 (MF124308), CGMCC1.6474 - *M. salsuginis* CGMCC 1.6474 (SFK49878), F20 - *M. suomiense* F 20 (MF124306), 23e - *M. gnaphalii* 23e (MG495926), BJ001 - *M. populi* BJ001 (ACB80476), JCM10891 - *M. rhodesianum* JCM 10891 (MF124305), TA73 - *M. trifolii* TA73, PA1 - *M. extorquens* PA1 (YP_001639823), CM4- *M. extorquens* CM4 (YP_002421404), DM4 - *M. extorquens* DM4 (YP_003068648), AM1 - *M. extorquens* AM1 (YP_002963420), JCM2840 - *M. aminovorans* JCM 2840, phyllostac - *M. phyllostachyos* BL 47 (SDM_25060), pseudosas - *M. pseudosasicola* BL 36 (SFL_94876), ALL/SCN-P - *M. thiocyanatum* ALL/SCN-P (MF_124307), BL36 - *M. pseudosasicola* BL36 (SFN_00176), CBMB20 - *M. oryzae* CBMB 20 (AIQ89653), CBMB27 - *M. phyllosphaerae* CBMB27 (APT30455), ORS2060 - *M. nodulans* ORS 2060 (YP_002500626), 4-46 – *Methylobacterium* sp. 4-46 (YP_001767276), BL47 - *M. phyllostachyos* BL47 (SDM_25060), DSM16371 - *M. aquaticum* DSM 16371 (KMO30784), JCM14648 - *M. platani* JCM 14648 (KMO19409), 239 - *Amycolatopsis methanolica* 239 (WP_017982099), DSM16961 - *M. variabile* DSM 16961 (WP_048447370), DSM25844 - *M. tarhaniae* DSM 25844 (WP_048453762), UW4 - *Pseudomonas putida* UW4

(Q5PWZ8). Охарактеризованные ферменты выделены полужирным шрифтом.

При помощи нуклеотидных последовательностей *acdS*-генов, кодирующих АЦК-деаминазы различных видов бактерий, и *dcyD*-генов, кодирующих D-цистеиндесульфогидазы, представленных в GenBank, разработаны наборы вырожденных олигонуклеотидных праймеров. С использованием этих пар праймеров проведен ПЦР-скрининг среди 28 типовых штаммов различных видов рода *Methylobacterium*. Представители рода *Methylobacterium* – граммотрицательные, строго аэробные бактерии, способные расти как на одноуглеродных субстратах, таких как метанол, формиат, так и на многих других органических соединениях. Многие типовые штаммы выделены с поверхности и из тканей растений, например, *M. platani* из листьев платана (Kang et al., 2007), *M. radiotolerans* – из семян риса (Ito, Iizuka 1971), *M. gossypiicola* из листьев хлопка (Madhaiyan et al., 2012). Наличие у большинства из них каротиноидного пигмента придает дополнительную устойчивость к УФ-излучению при росте в филлосфере.

На рисунке 5.1.2 видно, что с использованием пары праймеров *acdS*-AF и *acdS*-AR специфический продукт размером 776 п.н. обнаружен в реакциях с ДНК *Methylobacterium mesophilicum* JCM2829, *Methylobacterium fujisawaense* O-31 и *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* VF39, а также ДНК культур *Bradyrhizobium japonicum* B-1967 и *Methylobacterium nodulans* ORS 2060, служившими положительными контролями. Кроме того, специфический продукт той же длины обнаружен в реакциях с ДНК *Methylobacterium gregans* NBRC103626, *Methylobacterium longum* DSM 23933, *Methylobacterium brachiatum* NBRC 103629, *Methylobacterium tardum* NBRC103632, *Methylobacterium phyllosphaerae* DSM19779, *Methylobacterium marchantiae* DSM21328 (рисунок 5.1.3).

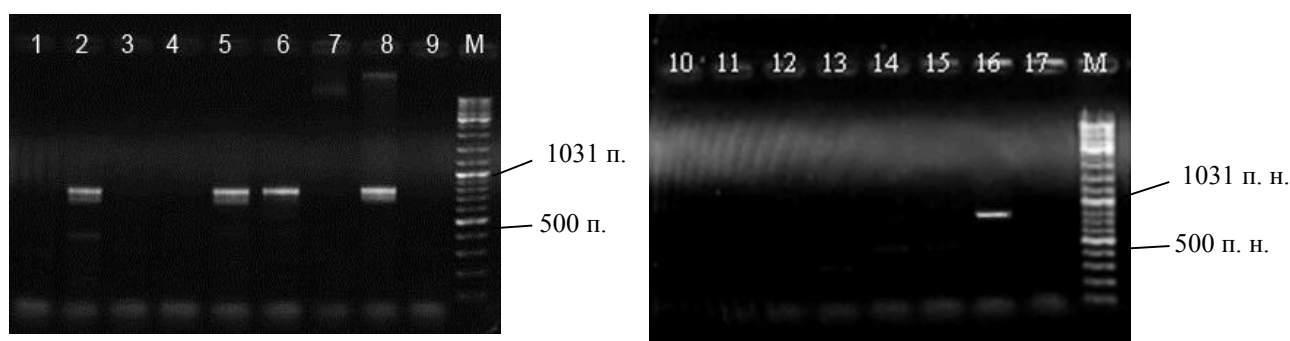


Рисунок 5.1.2 Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР с праймерами *acdS*-AF – *acdS*-AR. 1 – *Azospirillum brasilense* Sp7; 2 – *Bradyrhizobium japonicum* VKM B-1967; 3 – *Hansschlegelia plantiphila* S₁; 4 – *Methylosinus trichosporium* OB3b; 5 – *Methylobacterium mesophilicum* JCM 2829; 6 – *Methylobacterium nodulans* ORS 2060; 7 – *Methylopila* sp. 1G; 8 – *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* VF 39; 9 – *Xanthobacter autotrophicus* ATCC 35674; 10 – *Methylobacterium suomiense* A20; 11 – *Methylobacterium thiocyanatum* JCM 10893; 12 – *Methylobacterium rhodesianum* JCM 10891; 13 – *Methylobacterium rhodinum* JCM 2811; 14 –

Methylobacterium organophilum JCM 2833; 15 – *Methylobacterium zatmanii* JCM 10892; 16 – *Methylobacterium fujisawaense* O-31; 17 – *Methylobacterium aminovorans* JCM 2840; М – ДНК-маркер Gene Ruler DNA Ladder Mix («Fermentas»).

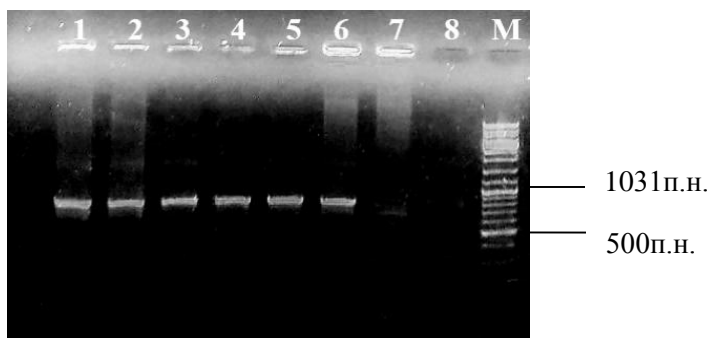


Рисунок 5.1.3—Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР с праймерами *acdS*-AF – *acdS*-AR. 1- *Methylobacterium gregans* NBRC 103626; 2 – *Methylobacterium longum* DSM 23933; 3- *Methylobacterium brachiatum* NBRC 103629, 4 – *Methylobacterium tardum* NBRC 103632, 5 – *Methylobacterium phyllosphaerae* DSM 19779, 6 – *Methylobacterium marchantiae* DSM 21328; 7 – *Methylobacterium isbiliense* DSM 17168, 8 – *Methylobacterium iners* DSM 19015, М – ДНК-маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas).

В ПЦР с праймерами *acdS*-BGF и *acdS*-BGR, разработанными с учетом последовательностей генов *acdS* β - и γ -протеобактерий, продукт, сходный по размеру со специфическим, обнаружен у *Methylobacillus glycogenes*, *Methylobacillus pratensis* F-31, *Methylophilus luteus* Mim, *Methylobacillus gramineus* Lap (рис. 5.1.4). Однако в результате секвенирования этих продуктов размером около 800 п.н. выяснено, что это результат неспецифического связывания праймеров с ДНК. Таким образом, в реакциях с ДНК аэробных метиловобактерий, относящихся к β - и γ -*Proteobacteria*, ген *acdS* не был обнаружен.

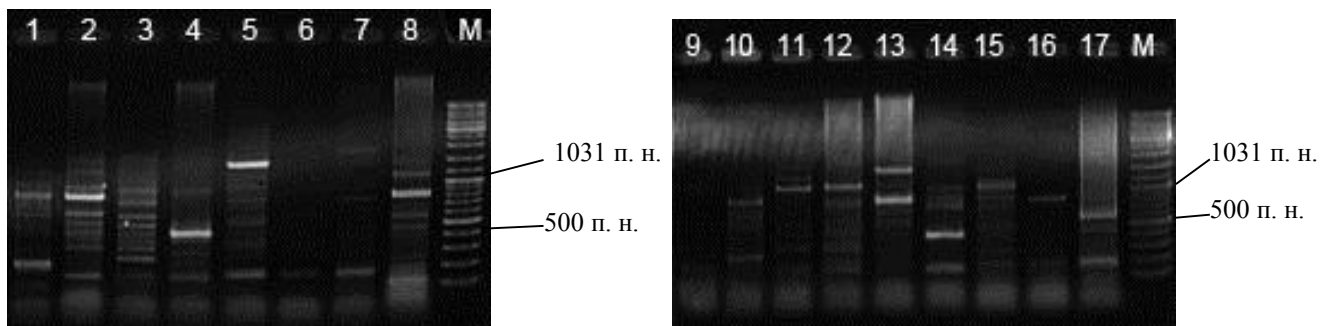


Рисунок 5.1.4. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР с праймерами *acdS*-BGF – *acdS*-BGR. 1 – *Methylobacillus glycogenes* ТК 0113; 2 – *Methylobacillus pratensis* F31; 3 – *Methylomonas methanica* VKM B-2110; 4 – *Methylovorus glucosotrophus* 6B1; 5 – *Methylovorus mayis* BV; 6 – *Methylophilus quaylei* VKM B-2338; 7 – *Methylophaga muralis* VKM B-2303; 8 –

Pseudomonas putida ATCC 12633; 9 – *Methylophilus flavus* Ship, 10 – *Methylophilus luteus* Mim; 11 – *Methylophilus methylotrophus* AS1; 12 – *Methylobacillus arboreus* VKM B-2590; 13 – *Methylobacillus gramineus* VKM B-2590; 14 – *Methylovorus menthalis* VKM B-2663; 15 – *Delftia* sp. LP 1; 16 – *Methylopila musalis* VKM B-2646; 17 – *Methyloversatilis universalis* FAM5; М – ДНК-маркер Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

На рисунке 5.1.5 видно, что с использованием пары праймеров dcyD-161F и dcyD-971R специфический продукт размером 810 п.н. обнаружен в реакциях с ДНК *Methylobacterium suomiense* F 20; *Methylobacterium thiocyanatum* JCM 10893; *Methylobacterium rhodinum* JCM 2811; *Methylobacterium rhodesianum* JCM 10891; *Methylobacterium organophilum* JCM 2833; *Methylobacterium zatmanii* JCM 10892; *Methylobacterium aminovorans* JCM 2840; *Methylobacterium trifolii* TA73, *Methylobacterium gnaphalii* DSM 24027, а также ДНК штамма *Methylobacterium extorquens* G10, служившего положительным контролем.

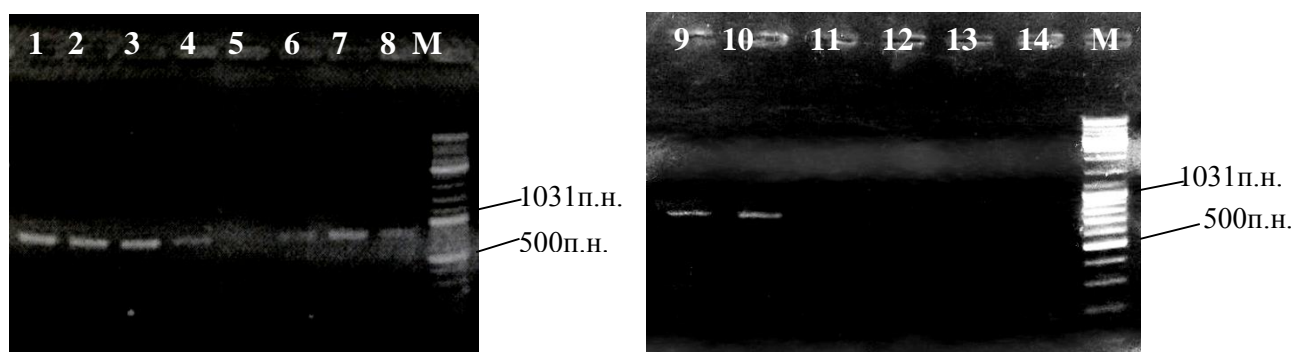


Рисунок 5.1.5 Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР с праймерами dcyD-161F–dcyD-971R. 1 – *Methylobacterium suomiense* F 20; 2 – *Methylobacterium thiocyanatum* JCM 10893; 3 – *Methylobacterium rhodinum* JCM 2811; 4 – *Methylobacterium rhodesianum* JCM 10891; 5 – *Methylobacterium organophilum* JCM 2833; 6 – *Methylobacterium zatmanii* JCM 10892; 7 – *Methylobacterium aminovorans* JCM 2840; 8 – *Methylobacterium extorquens* G10, 9 – *Methylobacterium trifolii* TA73, 10 – *Methylobacterium gnaphalii* DSM 24027, 11 – *Methylobacterium salsuginis* NCCB100140, 12 – *Methylobacterium haplocladii* DSM 24195, 13 – *Methylobacterium podarium* DSM 15083, 14 – *Methylobacterium brachytheticii* DSM 24105, М – ДНК-маркер Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas).

5.2 Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов

Все полученные ПЦР-продукты были секвенированы. Результаты ПЦР-скрининга и последующего секвенирования представлены в таблице 5.2.1.

Таблица 5.2.1 Распределение генов *acdS* и *dcyD* в геномах типовых штаммов рода *Methylobacterium*.

Вид	Штамм	Наличие генома	<i>acdS</i>	<i>dcyD</i>
<i>M. adhaesivum</i>	DSM 17169T	—	—	—
<i>M. aerolatum</i>	DSM 19013	—	—	—
<i>M. aminovorans</i>	JCM 8240	—	—	+
<i>M. aquaticum</i>	DSM 16371	+	+	—
<i>M. brachiatum</i>	DSM 19569	—	+	—
<i>M. brachythecii</i>	DSM24105	—	—	—
<i>M. bullatum</i>	DSM 21893	—	Н.О.	Н.О.
<i>M. cerastii</i>	DSM 23679	—	Н.О.	Н.О.
<i>M. dankookense</i>	DSM 22415	—	Н.О.	Н.О.
<i>M. extorquens</i>	DSM 1337	—	—	+
<i>M. fujisawaense</i>	DSM 5686	—	+	—
<i>M. gnaphalii</i>	DSM 24027	—	—	+
<i>M. goesingense</i>	DSM 21331	—	+	—
<i>M. gossipiicola</i>	CCM 7572	—	—	+
<i>M. gregans</i>	DSM 19564	—	+	—
<i>M. haplocladii</i>	DSM24195	—	Н.О.	Н.О.
<i>M. hispanicum</i>	DSM 16372	—	—	—
<i>M. iners</i>	DSM 19015	—	—	—
<i>M. isbiliense</i>	AR24	—	—	—
<i>M. jeotgali</i>	LMG 23639	—	—	—
<i>M. komagatae</i>	DSM 19563	+	—	—
<i>M. longum</i>	DSM 23933	—	+	—
<i>M. marchantiae</i>	DSM 21328	—	+	—
<i>M. mesophilicum</i>	DSM 1708	—	+	—
<i>M. nodulans</i>	ORS 2060	+	+	—
<i>M. organophilum</i>	DSM 760	—	—	—
<i>M. oryzae</i>	DSM 18207	+	+	—
<i>M. oxalidis</i>	DSM 24028	—	—	—
<i>M. persicinum</i>	DSM 19562	—	—	—
<i>M. phyllosphaerae</i>	DSM 19779	+	+	—
<i>M. phyllostachyos</i>	BL47	+	+	+
<i>M. platani</i>	JCM 14648	+	+	—
<i>M. podarium</i>	DSM 15083	—	—	—
<i>M. populi</i>	NCIMB 13946	+	—	+

Продолжение таблицы 5.2.1 Распределение генов *acdS* и *dcyD* в геномах типовых штаммов рода *Methylobacterium*.

Вид	Штамм	Наличие генома	<i>acdS</i>	<i>dcyD</i>
<i>M. pseudosasicola</i>	BL36	+	+	+
<i>M. radiotolerans</i>	DSM 1819	+	+	-
<i>M. rhodesianum</i>	DSM 5687	-	-	+
<i>M. rhodinum</i>	DSM 2163	+	-	-
<i>M. salsuginis</i>	NCCB 100140	+	-	+
<i>M. soli</i>	YIM 48816	-	-	-
<i>M. suomiense</i>	DSM 14458	-	-	+
<i>M. tardum</i>	DSM 19566	-	+	-
<i>M. tarhaniae</i>	DSM 25844	+	+	-
<i>M. thiocyanatum</i>	DSM 11490	+	-	+
<i>M. thuringiense</i>	LMG 25777	-	н.о.	н.о.
<i>M. trifolii</i>	LMG 25778	-	-	+
<i>M. variabile</i>	DSM 16961	+	+	-
<i>M. zatmanii</i>	DSM 5688	-	-	+

н.о. – не определяли.

Таким образом, из 48 типовых штаммов различных видов рода *Methylobacterium* у 29 штаммов найдены и/или секвенированы гены либо *acdS* и *dcyD*. Из них у 18 штаммов обнаружен ген *acdS*, у 13 – *dcyD*, два вида обладают двумя генами одновременно. Пять типовых штаммов отсутствуют в коллекции лаборатории, а также их геномные последовательности отсутствуют, поэтому определение генов у них не проводили. Таким образом у 17 штаммов на данный момент неизвестно наличие этих генов, у 11 из них методом ПЦР гены не найдены, при этом у двух видов (*M. komagatae* и *M. rhodinum*) есть неполные последовательности геномов, однако, гены *acdS* и *dcyD* в них отсутствуют.

5.3 Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей АЦК-деаминаз и D-цистеиндесульфогидраз

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей белков AcdS метиловых бактерий показал, что, в основном, все последовательности кластеризуются совместно, за исключением AcdS из *M. nodulans* ORS2060 и *Methylobacterium sp.* 4-46, кластеризующиеся с АЦК-деаминазами различных ризобий. Это неудивительно, поскольку штаммы ORS2060 и 4-46, несмотря на то, что принадлежат к роду *Methylobacterium*, очень близки по своим свойствам к ризобиям, так как эти два штамма являются настоящими клубеньковыми симбионтами бобовых

растений (Sy et al., 2001). По этой причине штаммы ORS 2060 и 4-46 обладают АЦК-дезаминазами филогенетически близкими таковым различных ризобий.

В целом, аминокислотные последовательности АЦК-дезаминаз бактерий различного таксономического положения довольно консервативны и уровень аминокислотной идентичности белков составляет более 60% для наиболее филогенетически удаленных последовательностей. В настоящий момент считают, что эволюция белка AcdS идет вертикально, и, хотя известны случаи горизонтального переноса, они довольно редки (Nascimento et al., 2014). Аминокислотные последовательности метиловых бактерий проявляют очень высокий уровень аминокислотной идентичности между собой – 86-100%, что свидетельствует о высокой консервативности белка AcdS у представителей рода *Methylobacterium*. Однако, несмотря на это, можно выделить несколько филогенетических кластеров последовательностей белка AcdS метиловых бактерий. Первую группу образуют ранее упомянутые белки *M. nodulans*, которые филогенетически близки к ризобиям, но согласно филогенетическому дереву, построенному по последовательностям гена 16S рРНК, эти виды обособлены в кластере с *M. isbiliense*. Вторую группу последовательностей белков составляют AcdS из *M. variabile*, *M. platani*, *M. aquaticum* и *M. tarhaniae*, которые также образуют единый кластер на дереве, построенном по гену 16S рРНК (рисунок 5.3.4). В третью, весьма обширную группу, объединены последовательности AcdS близкородственных видов *M. fujisawaense*, *M. oryzae*, *M. phyllosphaerae*, *M. phyllostachyos*, *M. radiotolerans*, *M. longum*, *M. brachiatum*, *M. mesophilicum*, *M. tardum*, *M. pseudosasicola* (рисунок 5.3.1). Исключением из этой группы можно считать *M. gregans*, который, несмотря на присутствие гена *acdS*, похожего на таковой у представителей этой группы, филогенетически достаточно удален от нее. На филогенетическом дереве АЦК-дезаминаз видно, что аминокислотные последовательности ферментов метиловых бактерий образуют совместный кластер с белками других α -протеобактерий и отделены от последовательностей АЦК-дезаминаз β - и γ -протеобактерий (рисунок 5.3.1).

D-цистеиндесульфогидазы проявляют большую вариабельность аминокислотных последовательностей, которые можно объединить в несколько филогенетических групп: это ферменты из бактерий, ассоциированных с растениями, ферменты *Amycolatopsis*, ферменты из энтеробактерий, к числу которых принадлежит охарактеризованный белок из *E. coli* (Soutourina et al., 2001), группа ферментов *Cupriavidus/Pseudomonas* и очень большая группа белков бактерий различного таксономического положения, которые выделены из морских, пресноводных и почвенных мест обитания. Необходимо отметить, что у последней группы отсутствуют охарактеризованные ферменты с доказанной активностью (рисунок 5.3.2).

Анализ последовательностей D-цистеиндесульфогидаз метиловых бактерий показал, что все они входят в состав кластера, содержащий последовательности белков DcuD из ассоциированных

с растениями бактерий, как фитосимбиотных, так и фитопатогенных. Последовательности метиловых бактерий образуют единый кластер на филогенетическом дереве (рисунок 5.3.3) и характеризуются довольно высоким уровнем аминокислотной идентичности (>65%). Уровень аминокислотной идентичности с ферментом из *E. coli*, который филогенетически удален, составляет менее 44%.

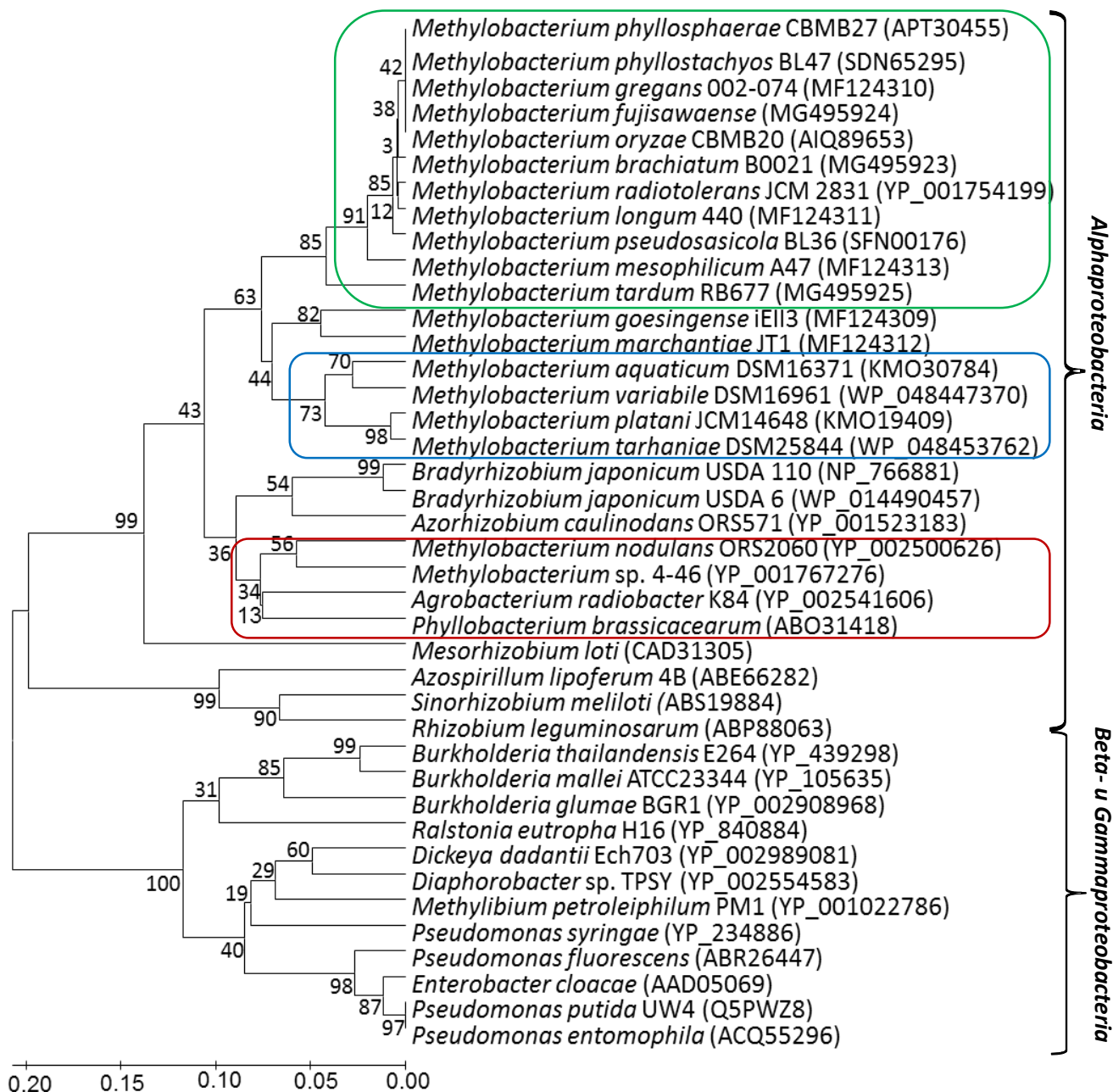


Рисунок 5.3.1 Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей AcdS различных бактерий. Полуужирным шрифтом выделены охарактеризованные ферменты.

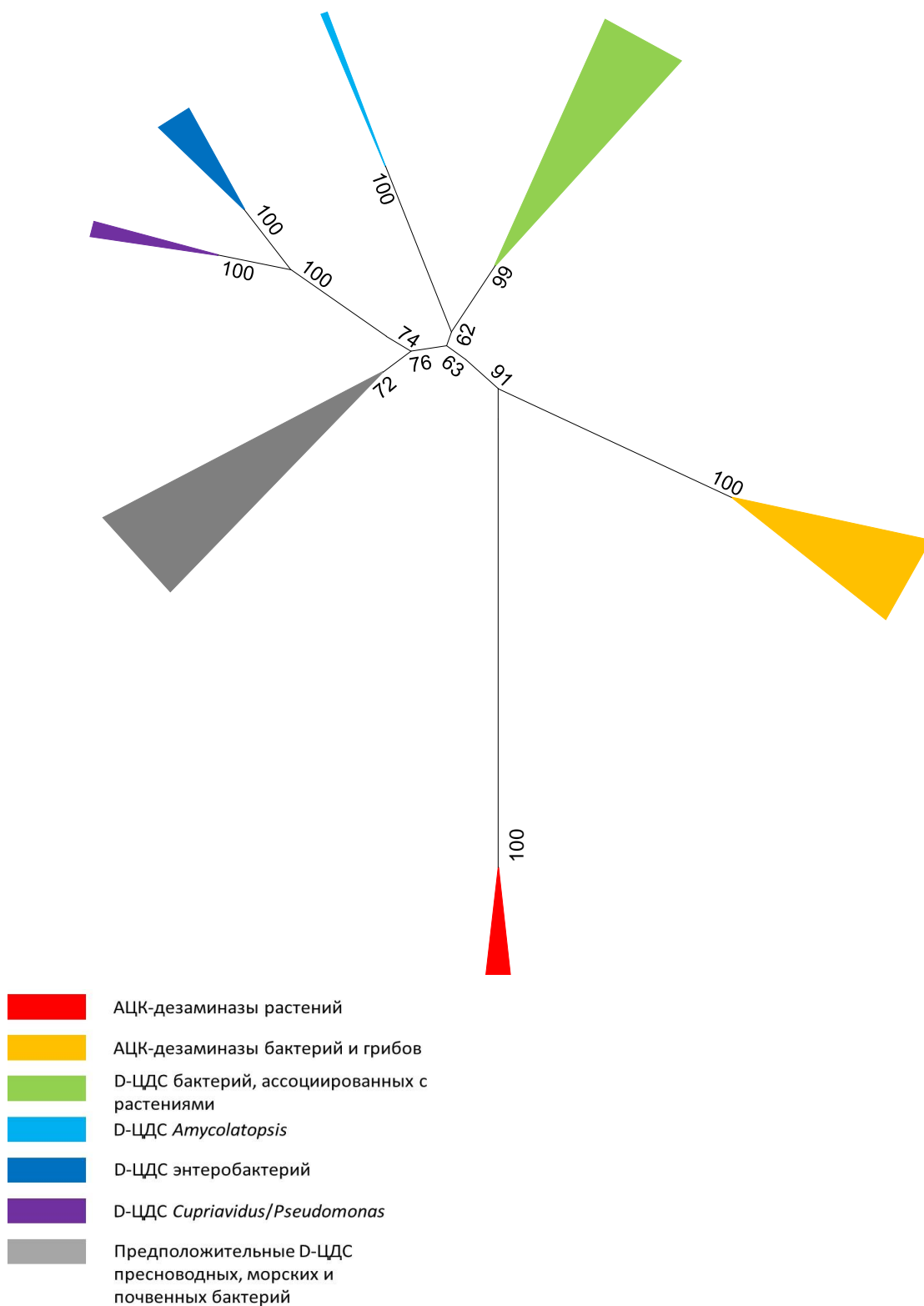


Рисунок 5.3.2 Филогенетическое дерево АЦК-дезаминаз и D-цистеиндесульфогидраз различных групп организмов.

На филогенетическом дереве D-цистеиндесульфогидраз метилобактерий можно выделить большой кластер, объединяющий белки представителей рода *Methylobacterium*, образующих

также отдельную группу на дереве, построенном по последовательности гена 16S рРНК (рисунок 5.3.4). Эту группу составляют *M. extorquens*, *M. rhodesianum*, *M. aminovorans*, *M. thiocyanatum*, *M. populi*, *M. zatmanii*, *M. suomiense*, *M. salsuginis*. Кроме того, белки из этой группы характеризуются очень высоким уровнем аминокислотной идентичности (83-100%). Интересно, что два близкородственных вида *M. phyllostachyos* и *M. pseudosasicola*, обладающие похожими белками DcyD, имеют в своих геномах ген *acdS* (рисунок 5.3.1).

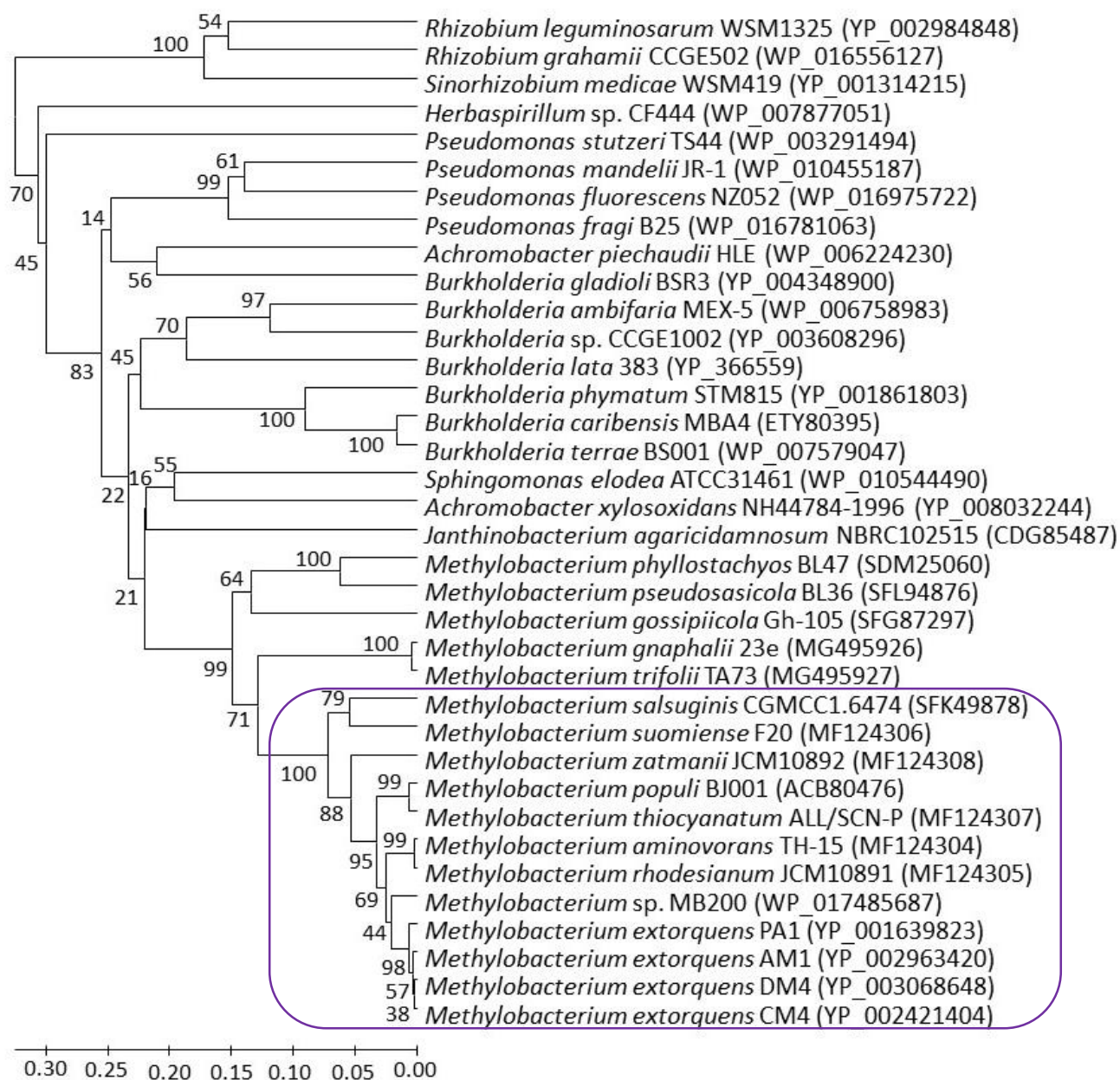


Рисунок 5.3.3 Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей DcyD различных бактерий.

Таким образом, анализируя распределение генов *acdS* и *dcyD* на филогенетическом древе гена 16S рРНК, можно выделить три большие группы видов, которые составляют больше половины известных видов *Methylobacterium*. Группа, которую можно назвать «*M. nodulans*» для большинства видов которой секвенированы геномы, содержит в них исключительно ген *acdS*. Группа «*M. extorquens*», в геномах которой обнаружены гены *dcyD*, и группа «*M. radiotolerans*», представители которой содержат, в основном, гены *acdS*, однако в геномах двух видов обнаружен также и ген *dcyD* (рисунок 5.3.4). Следует отметить, что совсем недавно появилось предложение реклассифицировать виды, обозначенные здесь как группа «*M. extorquens*», в новый род *Methylorubrum* (Green, Ardley 2018).

Несмотря на то, что у представителей 5 видов не проводили поиск генов *acdS* и *dcyD*, очевидно, что эти гены достаточно широко распределены среди представителей рода *Methylobacterium* (гены обнаружены у 29 из 48 видов). В то же время, существуют группы близкородственных видов, у которых эти гены отсутствуют. На это указывает, например, отсутствие исследуемых генов в предварительном геноме *M. komagatae*, у которого и ближайших его родственников методом ПЦР также гены не были обнаружены. С другой стороны, нам удалось амплифицировать и секвенировать ген *dcyD* у *M. thiocyanatum*, для которого известна неполная геномная последовательность, но изученный ген пока отсутствует.

Помимо трех обнаруженных групп видов, содержащих гены *acdS* и/или *dcyD*, вполне могут существовать и другие, так как эти гены встречаются у бактерий, филогенетически удаленных от основных групп, но для их доказательства не хватает данных о разнообразии видов *Methylobacterium*.

Кроме того, использованный в данной работе метод ПЦР с вырожденными праймерами не является совершенным, поскольку отсутствие комплементарности в одном из нуклеотидов в 3'-области праймера препятствует образованию специфического ПЦР-фрагмента. Вполне возможно, что некоторые исследованные штаммы обладают генами *acdS* и *dcyD* филогенетически удаленными от обнаруженных. Это подчеркивает важность последующего секвенирования геномов типовых штаммов метиловых бактерий.

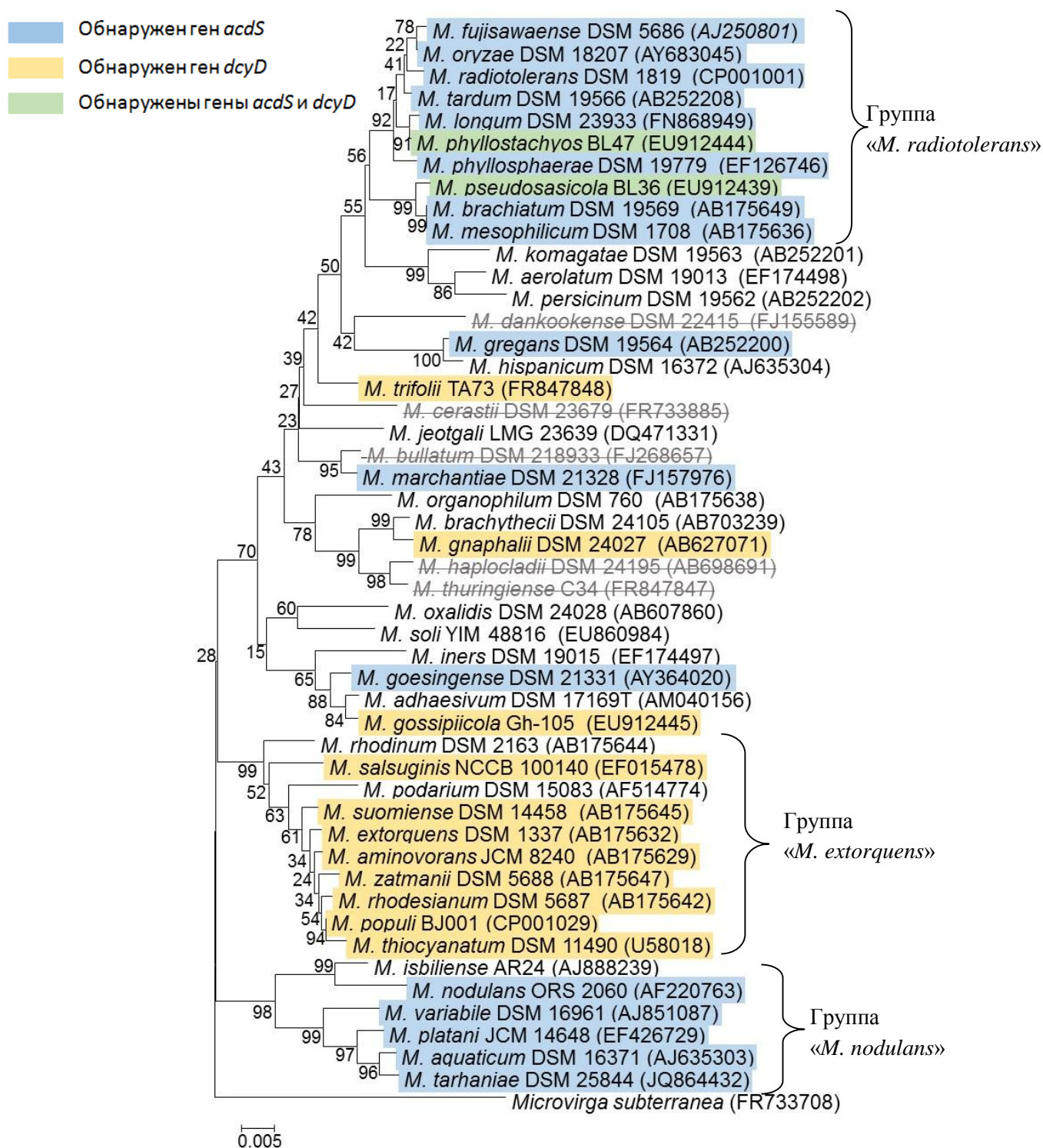


Рисунок 5.3.4 Распределение генов АЦК-деаминазы (*acdS*) и D-цистеиндесульфогидразы (*dcyD*) у представителей рода *Methylobacterium*. Филогенетическое дерево, построенное на основании последовательностей гена 16S рРНК. Зачеркивание – наличие генов не определяли.

В целом, наличие гена АЦК-деаминазы характерно для бактерий, ассоциированных с растениями, поскольку образование АЦК доказано только для растений (Van de Poel, Van Der

Straeten 2014). Очевидно, что бактерии, обладающие АЦК-дезаминазой, могут использовать АЦК в качестве источника азота и углерода. Этот факт позволяет рассматривать наличие гена АЦК-дезаминазы как адаптацию бактерий для роста внутри и на поверхности растений. Кроме того, бактерии, деградируя АЦК, снижают уровень этилена в растениях, тем самым повышая их устойчивость к различным видам стресса (Glick, 2014). Наличие у растений АЦК-дезаминазы дополнительно свидетельствует о важности регуляции внутриклеточной концентрации АЦК (McDonnel et al., 2009).

Филогенетический анализ белков *AcdS* и гена *16S* рРНК выявил, что, как минимум, две группы *Methylobacterium* – «*M. nodulans*» и «*M. radiotolerans*» разделились и унаследовали от общего предка ген АЦК-дезаминазы, что коррелирует с филогенией по гену *16S* рРНК. Наличие генов *acdS* у двух достаточно обширных групп метиловых бактерий может свидетельствовать об эволюционной адаптации к их тесной ассоциации с растениями. Об этом косвенно свидетельствует то, что некоторые типовые штаммы выделены из тканей растений. Так, например, *M. nodulans* – настоящий симбионт бобовых (Sy et al., 2001), *M. platani* выделен из листьев платана (Kang et al., 2007), *M. radiotolerans* – из семян риса (Ito, Iizuka 1971), *M. mesophilicum* – с поверхности листьев (Austin et al., 1979), *M. oryzae* и *M. phyllosphaerae* – из стеблей риса (Madhaiyan et al., 2007, 2009).

Нами было обнаружено, что за исключением двух видов *M. phyllostachyos* и *M. pseudosasicola*, в геномах некоторых метиловых бактерий присутствует ген D-цистеиндесульфогидазы, а ген АЦК-дезаминазы отсутствует. Несмотря на то, что D-цистеиндесульфогидаза обнаружена у многих растений, физиологическая роль, функции и метаболические пути биосинтеза D-цистеина неизвестны (Papenbrock et al., 2007). В отличие от растений активность D-цистеиндесульфогидазы позволяет бактериям использовать эту аминокислоту в качестве источника серы и углерода, а также бороться с цитотоксичным эффектом D-цистеина (Soutuorina et al., 2001). D-цистеиндесульфогидазы менее консервативные ферменты и шире распространены среди бактерий (рисунок 5.3.2). Однако DcyD метиловых бактерий проявляют сходство с D-цистеиндесульфогидазами других бактерий, ассоциированных с растениями, благодаря чему можно предположить участие этого белка в симбиозе с растениями. Пока не ясна роль бактериальных D-цистеиндесульфогидаз в растительно-микробных ассоциациях, однако, очевидно, что катализируемая ферментом реакция является источником сероводорода. В последнее десятилетие во многих работах показана значительная роль сероводорода в стимуляции роста и развития и, в частности, его участие в защите растений от различных видов стрессов (Guo et al., 2016; Zhang et al., 2011).

Тесная связь D-цистеиндесульфогидразы и АЦК-деаминазы подтверждается тем фактом, что замена только двух аминокислот в активных центрах приводит к взаимопревращению этих ферментов (рисунок 5.1.1) (Todorovic, Glick 2008). Дополнительным доказательством их общей функции являются ферменты растений, которые, по-видимому, не имеют строгого разделения на два фермента с разной функцией. Например, рекомбинантный белок *Arabidopsis thaliana*, полученный клонированием гена с высоким уровнем аминокислотной идентичности с АЦК-деаминазами, проявлял активность как АЦК-деаминазы, так и D-цистеиндесульфогидразы (Riemenschneider et al., 2005; McDonnell et al., 2009).

Таким образом, наличие D-цистеиндесульфогидразы у бактерий может быть фактором стимуляции роста растений за счет выделения сероводорода, однако, для доказательства этого необходимы соответствующие эксперименты. Важно отметить, что активность АЦК-деаминазы и эмиссия сероводорода приводят к одинаковому эффекту – повышению устойчивости растений к стрессу. Поэтому, вероятно, бактерии приспособились использовать два близкородственных фермента, АЦК-деаминазу и D-цистеиндесульфогидразу, для адаптации к жизни в ассоциации с растениями. Можно предположить, что виды, обладающие АЦК-деаминазной активностью, теснее связаны с растениями, проникая внутрь тканей и используя помимо метанола доступные им метаболиты, такие как аминокислоты. Напротив, виды, несущие ген D-цистеиндесульфогидразы, обитают на поверхности растений и в основном потребляют метанол и другие C₁-соединения. Однако доказательство этого предположения требует масштабных исследований колонизации органов и тканей растений различными метиловыми бактериями и анализа наличия у них генов утилизации органических кислот, сахаров, аминокислот.

5.4 Клонирование и характеристика 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминаз из *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и *Amycolatopsis methanolica* 239

Несмотря на то, что у многих бактерий обнаружена активность АЦК-деаминазы, очищены и охарактеризованы только три фермента: из *Pseudomonas putida* UW4, *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831 и из дрожжей *Cyberlindera saturnus* (таблица 5.4.1.). Описание этих ферментов служит ориентиром для вновь выделенных АЦК-деаминаз, поскольку в дальнейшем возможно их сравнение. Характеристика новых ферментов, выделенных из других бактерий, позволит выявить закономерности в их структуре и свойствах.

Исследованию ферментов, участвующих в фитосимбиозе метилотрофных бактерий, способствует наличие полных последовательностей геномов у многих штаммов рода

Methylobacterium, среди которых 16 типовых. Для более детального изучения биохимических свойств АЦК-дезаминаз были выбраны два вида, обитатели ризосферы – *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и *Amycolatopsis methanolica* 239. *Methylobacterium nodulans* – единственный клубеньковый симбионт среди представителей рода *Methylobacterium*, образующий клубеньки у бобовых растений родов *Crotalaria* и *Lotononis* (Sy et al., 2001).

Факультативно метилотрофный актиномицет *Amycolatopsis methanolica* 239 способен использовать метанол в качестве ростового субстрата через рибулозомонофосфатный путь (De Boer et al., 1990). Актиномицеты являются типичными почвенными бактериями, многие из них стимулируют развитие растений обладая АЦК-дезаминазной активностью и синтезируя ауксины, (*Streptomyces*, *Amycolatopsis*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* и др.) (Nascimento et al. 2014).

Анализ геномов *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и *Amycolatopsis methanolica* 239 при помощи программы Protein BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) выявил присутствие генов Mnod_5479 и AMETH_2787 соответственно, проявляющих наибольшее сходство с бактериальными 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминазами.

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей показал, что АЦК-дезаминазы представителей филума *Actinobacteria* образуют отдельный филогенетический кластер. AcdS из *A. methanolica* проявлял наибольшее сходство (83% идентичности) с AcdS из *Streptomyces acidiscabies* 84–104 (рисунок 5.4.1). Другой кластер формируют АЦК-дезаминазы альфапротеобактерий, в частности, представителей родов *Rhizobium* и *Methylobacterium*, ассоциированных с растениями. Также отдельный кластер образуют АЦК-дезаминазы бета- и гаммапротеобактерий, в том числе единственный хорошо изученный фермент из *Pseudomonas putida* UW4 (рисунок 5.4.1). В целом, филогения АЦК-дезаминаз различных микроорганизмов коррелирует с филогенией генов 16S рРНК.

Открытые рамки считывания генов *acdS* *M. nodulans* и *A. methanolica* клонировали в экспрессионном векторе рНУЕ. При помощи гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* и последующей металл-хелатной хроматографии, получили электрофоретически гомогенные препараты рекомбинантных белков AcdS, слитых на N-конце с убиквитином с 6 гистидиновыми остатками (рисунок 5.4.2 а и б). Слияние с убиквитином позволило при помощи деубиквитилирующей протеазы Usp2-сс получить после протеолиза ферменты AcdS с аминокислотной последовательностью, полностью соответствующей закодированной в геномах *M. nodulans* и *A. methanolica*. В обоих случаях молекулярная масса субъединицы AcdS составляла примерно 36 кДа, что соответствовало теоретически рассчитанной (рис. 5.4.2 а и б).

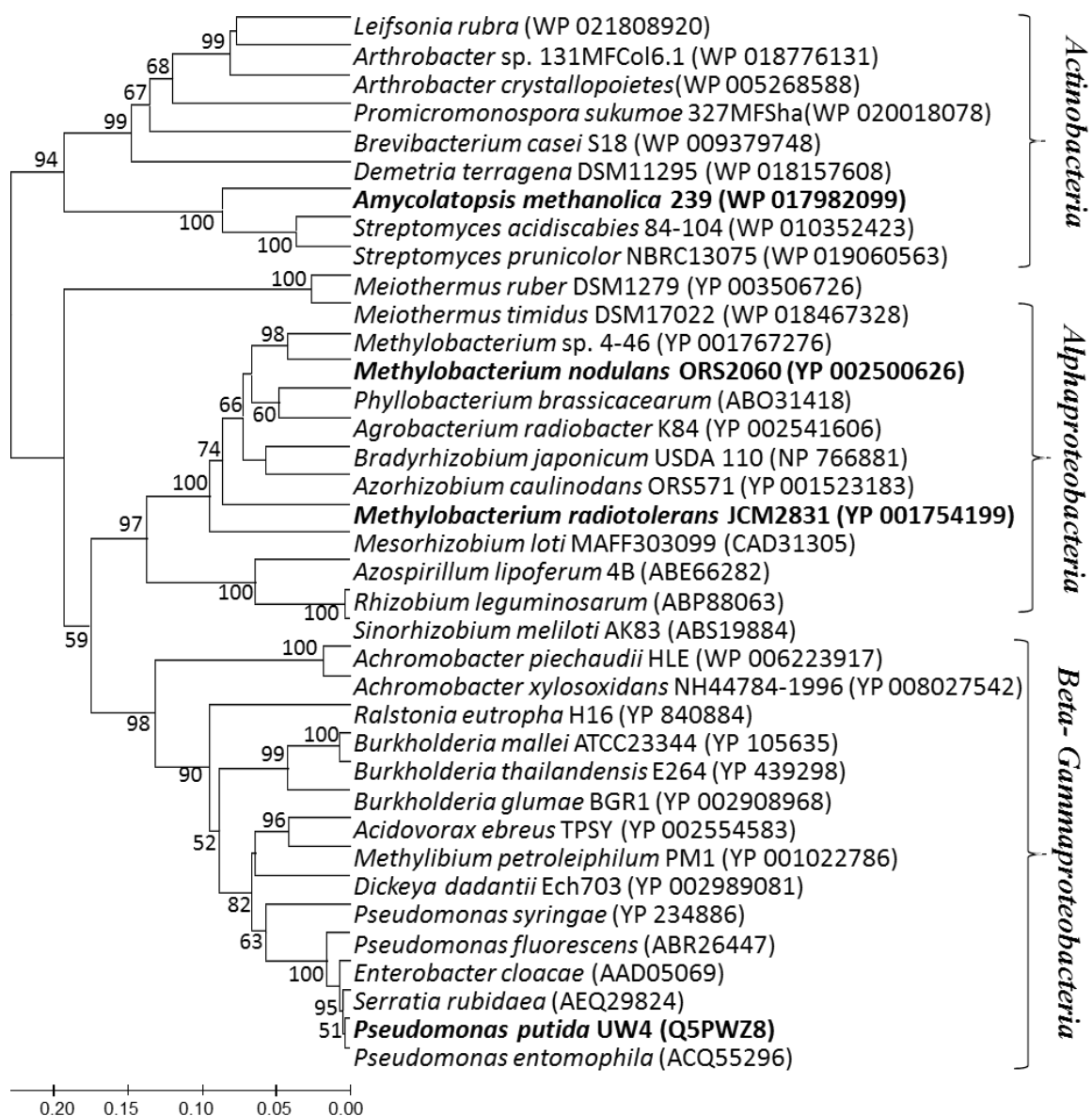


Рисунок 5.4.1 Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей AcдS.

Методом нативного ПААГ-электрофореза в полиакриламидном геле установлено, что нативная молекулярная масса активного холофермента AcдS из обоих видов составляет 117 кДа, что больше массы гомотримера (108 кДа), но значительно меньше, чем у гомотетрамера (144 кДа) (рис. 5.4.3 а и б). Однако методом гель-фильтрации доказано, что молекулярная масса холоферментов составляет 144 кДа, что соответствует массе гомотетрамера.

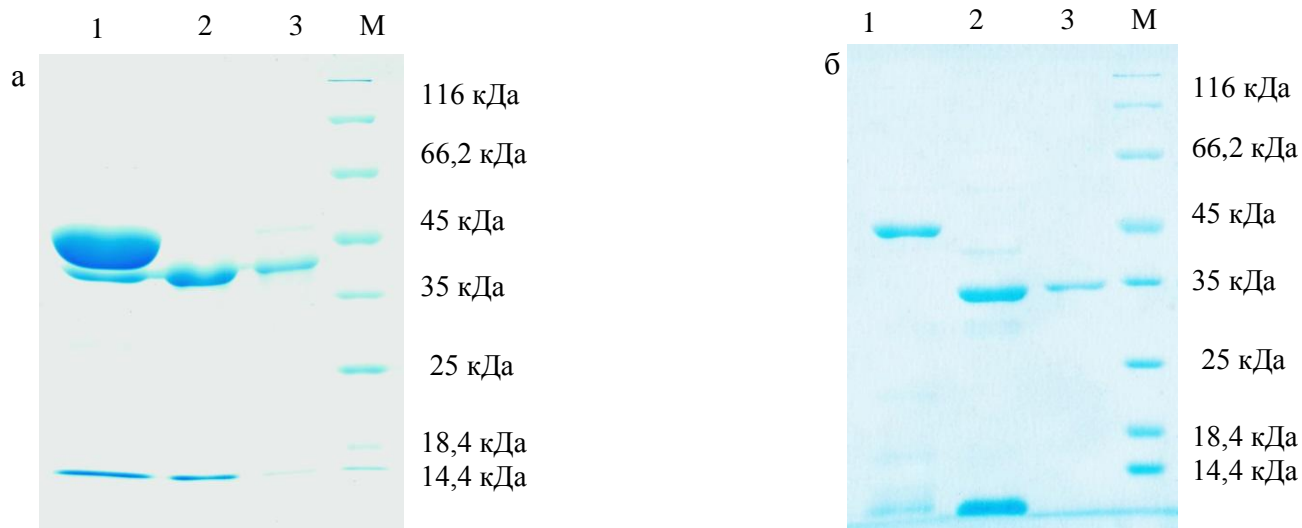


Рисунок 5.4.2 ДСН-ПААГЭ препаратов рекомбинантных белков AcSdS **а** – AcSdS из *M. nodulans* ORS2060, **б** – AcSdS из *A. methanolica* 239, после очистки при помощи металл-хелатной хроматографии (1), после обработки деубиквитирующей протеазой Usp2-cc (2), очищенного процессированного белка (3) и маркеров молекулярной массы (М, «Хеликон», Россия).

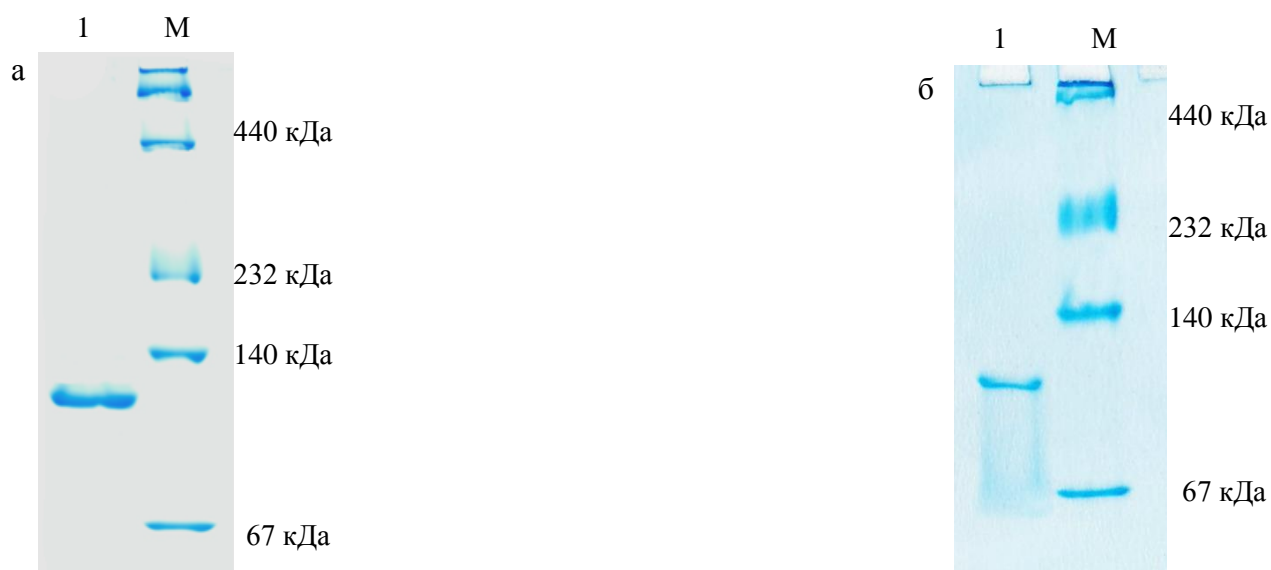


Рисунок 5.4.3 ПААГ-электрофорез препаратов AcSdS в нативных условиях. **а** – препарат AcSdS из *M. nodulans* (1), **б** – препарат AcSdS из *A. methanolica* (1) и маркеры молекулярной массы (М, «Pharmacia», Швеция).

Очищенные ферменты AcSdS имели удельную активность 0,74 и 0,3 мкмоль мин⁻¹ мг⁻¹ для *M. nodulans* и *A. methanolica*, соответственно, в реакции с АЦК (в 50 мМ Трис-НСl, рН 7,4, при 30 °С) и не проявляли активности с D- или L-цистеином (даже при высоких концентрациях белка - 1 мг/мл). Таким образом, показано, что гены *acdS* у *M. nodulans* и *A. methanolica* действительно кодируют дезаминазы АЦК. Ферменты имели пик поглощения при 420 нм и сильно ингибировались 2 мМ фенилгидразина, гидроксилamina и семикарбазида. Это означает, что

очищенные АЦК-дезаминазы являются пиридоксальфосфат-зависимыми, как и все ранее описанные гомологи (таблица 5.4.1).

Исследование зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата показало, что при дезаминировании АЦК оба фермента подчиняются кинетике Михаэлиса-Ментен (рисунок 5.4.4). Значение K_m фермента из *A. methanolica* составило $1,7 \pm 0,2$ мМ, что практически соответствует этому значению для АЦКД из *M. radiotolerans* JCM 2831 ($K_m = 1,8 \pm 0,3$ мМ) (таблица 5.4.1). Для АЦКД из *M. nodulans* это значение самое низкое ($K_m = 0,80 \pm 0,04$ мМ), следовательно, данный фермент проявляет наиболее высокую субстратную специфичность к АЦК среди всех охарактеризованных ферментов. Каталитическая константа фермента из *A. methanolica* ($k_{cat} = 5,1$ мин⁻¹) значительно ниже, чем у всех ранее охарактеризованных ферментов, в то время как каталитическая константа фермента из *M. nodulans* ($k_{cat} = 111,8$ мин⁻¹) более чем в 2 раза превышает это значение для фермента из *M. radiotolerans* ($k_{cat} = 53,3$ мин⁻¹). (таблица 5.4.1). Такие различия в кинетических характеристиках могут быть связаны с различными местами обитания этих бактерий: *M. nodulans* является клубеньковым фитосимбионтом, имеющим большой доступ к АЦК, тогда как *M. radiotolerans* – филлосферная бактерия, а *A. methanolica* – свободноживущая почвенная бактерия, по-видимому, не связанная с поверхностью растений непосредственно. Помимо этого, есть свидетельства о влиянии АЦК-дезаминазной активности на нодуляцию *Sinorhizobium meliloti*, поскольку в опытах с трансконъюгантами, несущими ген *acdS* в составе плазмиды, показано увеличение клубеньков на корнях люцерны на 40% (Ma et al., 2004).

Температурный оптимум фермента смещен в область повышенной температуры (55 °С), что характерно и для фермента из *M. nodulans*, максимальную активность которого наблюдали при 50°С (рис. 5.4.5). Близкое значение было получено и для АЦК-дезаминазы из *M. radiotolerans*. Напротив, температурный оптимум гомологичных ферментов из псевдомонад находился в диапазоне 30-37°С (таблица 5.4.1).

Таблица 5.4.1. Сравнительная характеристика бактериальных 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминаз.

Параметры	<i>A. methanolica</i> 239	<i>M. nodulans</i> ORS2060	<i>M. radiotolerans</i> JCM2831	<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i> UW4	<i>Cyberlindera</i> <i>saturnus</i>
K_m , мМ	1,7±0,2	0,80±0,04	1,8±0,3	3,4±0,2	2,6
k_{cat} , мин ⁻¹	5,1±0,2	111,8±0,2	65,8±2,8	146±5	-
pH-оптимум	8,5	8,0	8,0	8,0	9,0
Температурный оптимум, °С	55	50	45	37	-
Молекулярная масса	Гомотетрамер 144 кДа	Гомотетрамер 144 кДа	Гомотетрамер 144 кДа	Гомотетрамер 168 кДа	Мономер 69 кДа
Кофактор	П и р и д о к с а л ь ф о с ф а т				
Ссылка	Данная работа	Данная работа	(Fedorov et al., 2013)	(Hontzeas et al., 2004)	(Honma, Shimomura, 1978)

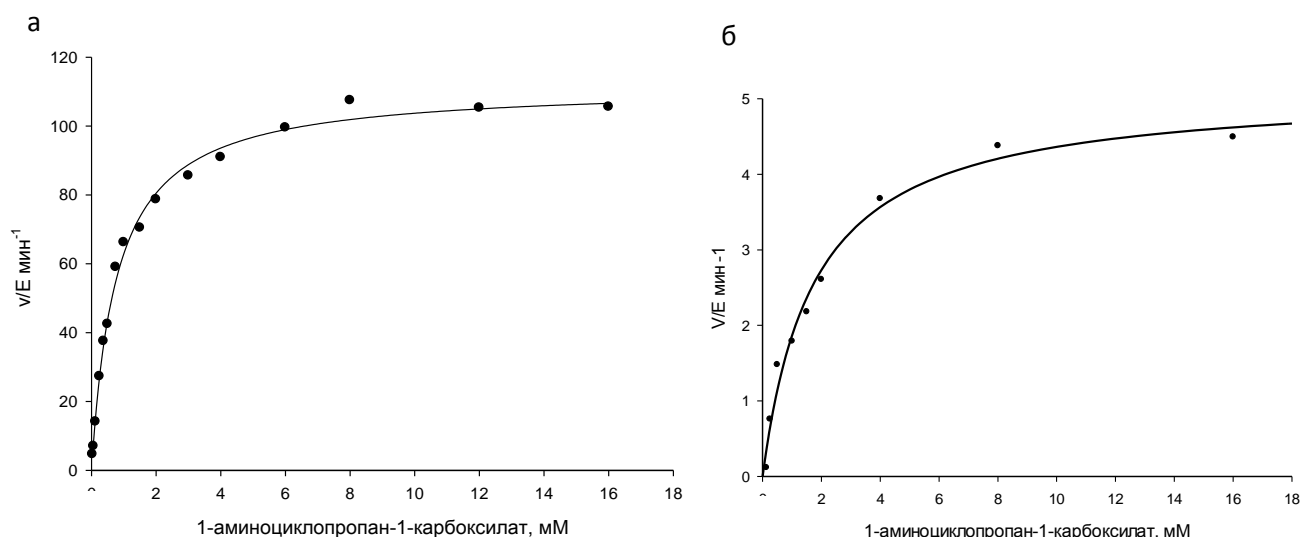


Рисунок 5.4.4 Зависимость активности АКЦ-деаминаз от концентрации АЦК: **а** – у *M. nodulans*, **б** – у *A. methanolica*.

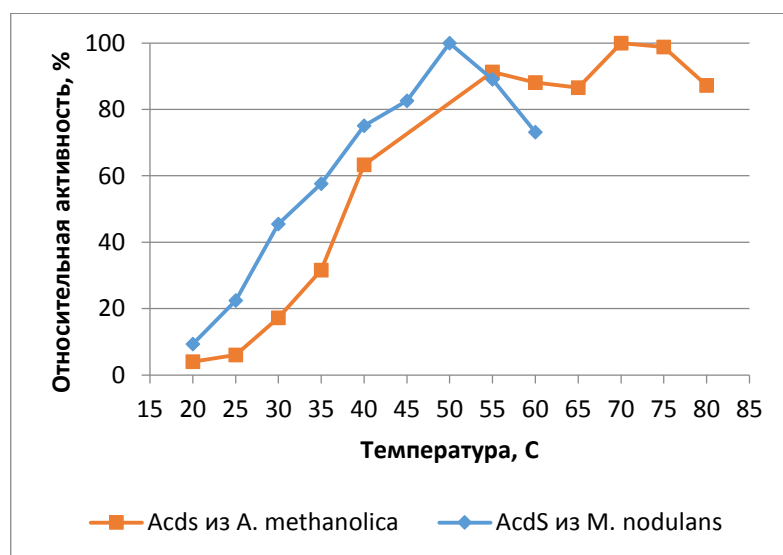


Рисунок 5.4.5 Зависимость активности от температуры АКЦ-деаминаз из *M. nodulans* и *A. methanolica*.

АЦК-деаминаза из *M. nodulans* проявляла наибольшую активность в 50 мМ TAPS при рН 8.0 (рисунок 5.4.6а). Фермент из *A. methanolica* был наиболее активен в 50 мМ Tris-HCl при рН 8.5. АЦК-деаминазы псевдомонад и *M. radiotolerans* также наиболее активны при этом значении рН. Оптимум рН *Cyberlindera saturnus* смещен в сторону повышенных значений (таблица 5.4.1).

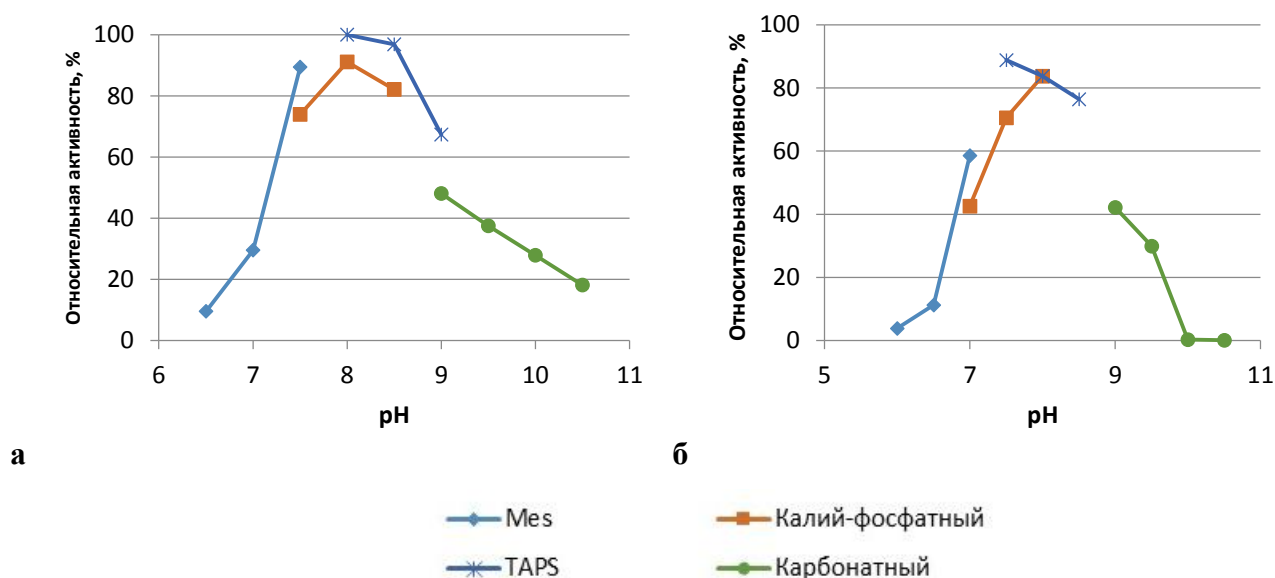


Рисунок 5.4.6 Влияние pH различных буферов на активность АЦК-деаминазы: **а** – из *M. nodulans*, **б** – из *A. methanolica*.

Итак, нами впервые клонированы и охарактеризованы рекомбинантные АЦК-деаминазы клубенькового симбионта *M. nodulans* и факультативного метилотрофного актиномицета *A. methanolica*. Наличие АЦК-деаминазы позволяет бактериям использовать помимо метанола, выделяемого растениями, 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту в качестве источника азота, и, возможно, углерода. Кроме того, активность АЦК-деаминазы бактерий-фитосимбионтов подавляет синтез этилена, увеличивает устойчивость растений к стрессовым воздействиям, при колонизации их бактериями (Ma et al., 2004; Madhaiyan et al., 2006a; Glick et al., 2007a; Glick, 2014). Полученные данные дают основание предположить, что наличие генов АЦК-деаминазы играет важную роль в формировании симбиотических отношений метилотрофных бактерий с растениями, а ее активность непосредственно связана с местообитанием различных бактерий, повышая их адаптационные возможности.

5.5 Филогенетический анализ аминокислотной последовательности регуляторного белка AcdR *M. radiotolerans*

У всех штаммов рода *Methylobacterium*, обладающих структурным геном АЦК-деаминазы, на расстоянии примерно 230 п.н. от стартового кодона гена *acdS* находится ОРС, расположенная дивергентно по отношению к гену *acdS* (рисунок 5.5.1). У *M. radiotolerans* эта ОРС размером 486 п.н. кодирует белок, состоящий из 161 аминокислотного остатка, с рассчитанной молекулярной массой 17,8 кДа. Сравнение этой аминокислотной последовательности, закодированной в ОРС, с последовательностями белков из базы данных

«GenBank» показало, что белок проявляет сходство с известными транскрипционными регуляторами Lrp-семейства (Leucine responsive protein).

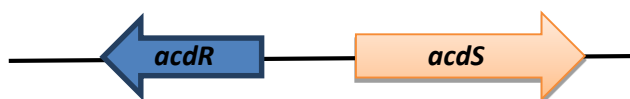


Рисунок 5.5.1 Карта генов *acdS* и *acdR* *M. radiotolerans*.

Показано, что AcdR является распространённым предположительным регулятором экспрессии АЦК-деаминазы у протеобактерий, так как в результате анализа полных геномных последовательностей в 166 из 261 случаях гены *acdR* и *acdS* обнаружены одновременно (Nascimento, et al., 2014). С другой стороны, по-видимому, существуют и альтернативные механизмы регуляции *acdS* как у протеобактерий, так и у представителей других филумов, поскольку, по крайней мере, у 17 полностью секвенированных видов, при наличии структурного гена АЦКД, ген *acdR* обнаружить не удалось (Nascimento et al., 2014). Филогения белка AcdR коррелирует с таковой белка AcdS в связи с тем, что, по-видимому, гены, кодирующие эти белки, наследуются сцепленно, однако, не исключены редкие случаи горизонтального переноса. При этом уровни идентичности аминокислотных последовательностей AcdR и AcdS различных протеобактерий указывают на значительно большую изменчивость регуляторного белка, чем самого фермента (Nascimento et al., 2014).

Нами предположено, что обнаруженная у *M. radiotolerans* полноразмерная ОРС является геном *acdR*, кодирующим белок-регулятор транскрипции гена АЦК-деаминазы (*acdS*).

На основе аминокислотных последовательностей регуляторных белков AcdR построено филогенетическое дерево представителей филума протеобактерий. При анализе аминокислотных последовательностей AcdR учитывались только те, гены которых находились в генетическом контексте предположительных генов *acdS*.

Как видно на рисунке 5.5.2 AcdR *M. radiotolerans* JCM2831 кластеризуется совместно с белками альфапротеобактерий, проявляя довольно высокий процент идентичности (от 68,4% с *Komagataeibacter medellinensis* NBRC3288 до 79,2% с *Methylobacterium variabile* DSM16961). Несмотря на это, AcdR *M. radiotolerans* образует отдельную ветвь совместно с аминокислотными последовательностями белков нескольких представителей метиловобактерий. AcdR ризосферных *Methylobacterium nodulans* и *Methylobacterium* sp. 4-46, кластеризуются совместно с белками ризобий, что можно объяснить общностью занимаемой ими экологической ниши, и, соответственно, общим происхождением.

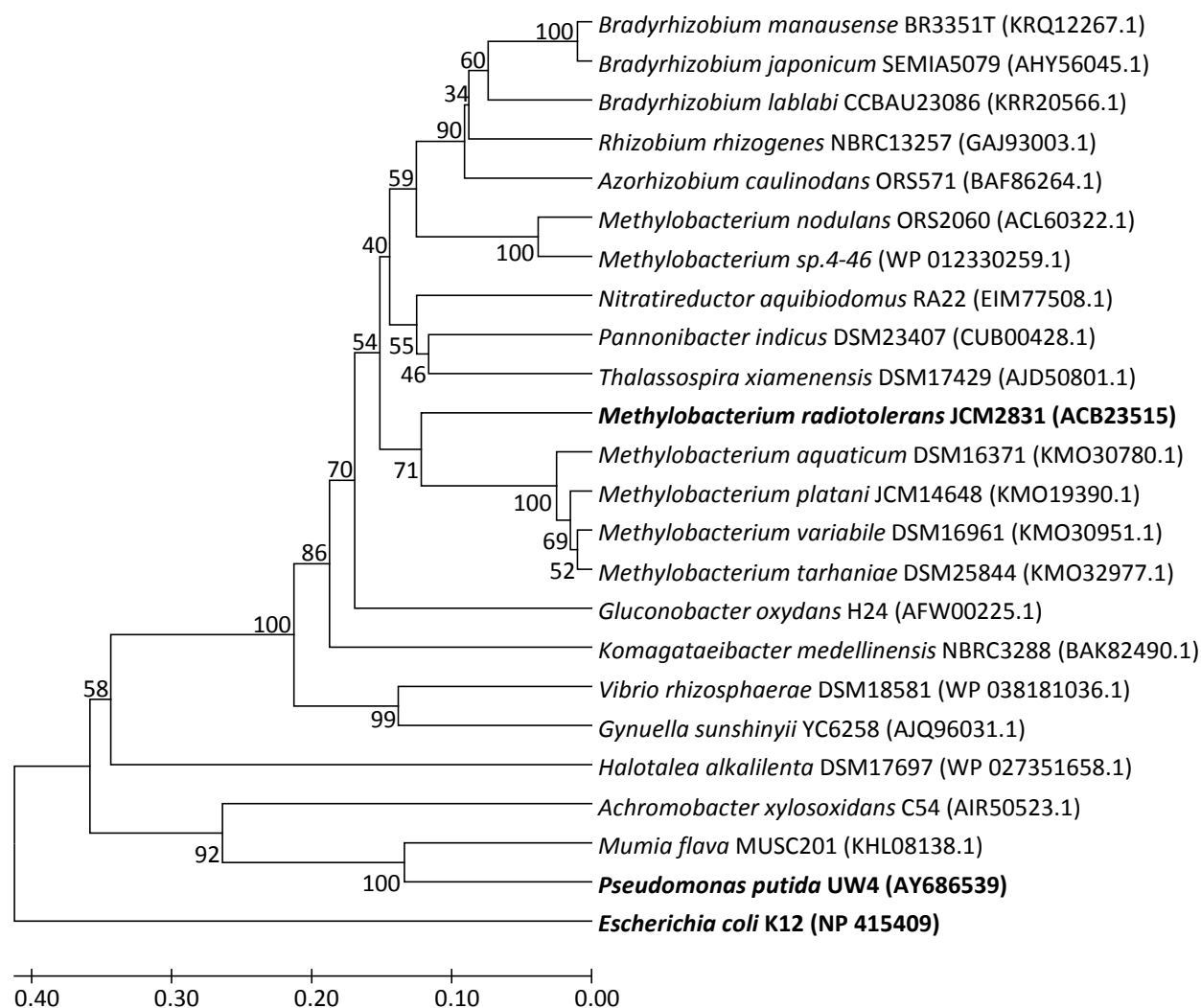


Рисунок 5.5.2 Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа последовательностей AcdR различных организмов.

Идентичность аминокислотной последовательности AcdR *M. radiotolerans* с единственным охарактеризованным белком AcdR из *P. putida* UW4 составляет 42,4%, что несколько меньше, чем с Lrp *E. coli* K12 (43,7%), который не участвует в регуляции транскрипции АЦК-деаминазы. Уровень аминокислотной идентичности между Lrp *E. coli* и AcdR *P. putida* составляет 39,1%. Однако белки AcdR образуют отдельную группу от Lrp *E. coli*. Поскольку белки AcdR *M. radiotolerans* и *P. putida* значительно отличаются по филогенетическому положению и уровню аминокислотной идентичности, представляет большой интерес характеристика AcdR метиловобактерий.

5.6 Клонирование гена и очистка белка-регулятора экспрессии АЦК-деаминазы из *M. radiotolerans* JCM2831

Для детального изучения функций регуляторного белка ген *acdR* *M. radiotolerans* JCM 2831 был клонирован в экспрессионном векторе pHUE. При помощи гетерологичной экспрессии в клетках *E. coli* и последующей металл-хелатной хроматографии, получили электрофоретически гомогенный препарат рекомбинантного белка AcdR, несущего на N-конце убиквитин и 6 гистидиновых остатков. После обработки деубиквитирующей протеазой получен препарат регуляторного белка AcdR с аминокислотной последовательностью, соответствующей закодированной в геноме *M. radiotolerans*. Молекулярная масса субъединицы AcdR составила примерно 18 кДа, что совпало с теоретически рассчитанной (рисунок 5.6.1).

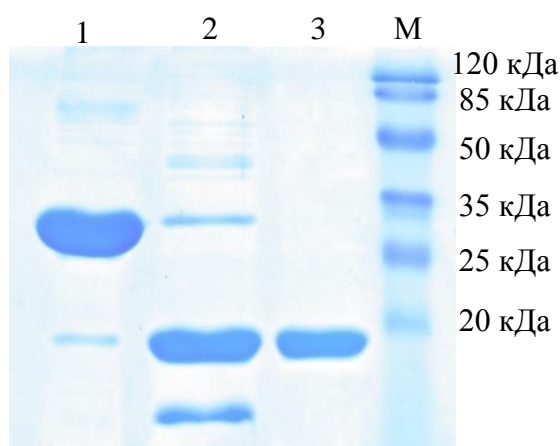


Рисунок 5.6.1 ДСН-ПААГЭ препарата рекомбинантного белка AcdR из *M. radiotolerans* (1) после обработки деубиквитирующей протеазой Usp2-сс (2), очищенного процессированного белка (3) и маркеров молекулярной массы (M, «Хеликон», Россия).

Очищенный препарат регуляторного белка использовали для определения условий и сайта связывания с фрагментом ДНК, содержащим промоторно-операторный участок гена АЦК-деаминазы *M. radiotolerans*.

5.7 Описание условий связывания AcdR с ДНК-фрагментом

С использованием ^{32}P -меченых праймеров Mrad-acdR-68r и P-acdSR, комплементарных фрагментам ДНК, находящимся на расстоянии, соответственно, 278-298 п. н. и 124-142 п. н. выше стартового кодона гена *acdS*, получили ПЦР-фрагмент, содержащий регуляторный участок гена *acdS*. Данный ПЦР-фрагмент и белок AcdR использовали в экспериментах по образованию комплексов AcdR-ДНК в присутствии АЦК.

Установлено, что добавление рекомбинантного белка AcdR приводит к уменьшению электрофоретической подвижности специфического ПЦР-фрагмента в присутствии

гетерологичной ДНК и АЦК. Для связывания 1 пкмоль ДНК *in vitro* требуется от 23 пкмоль регуляторного белка при максимальном количестве АЦК 1000 нмоль (рисунок 5.7.1).

АЦК (нмоль)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
AcdR из <i>M. radiotolerans</i> (пкмоль)	0	370	185	93	46	23	12	6	3
Меченый фрагмент ДНК (пкмоль)	1	1	1	1	1	1	1	1	1

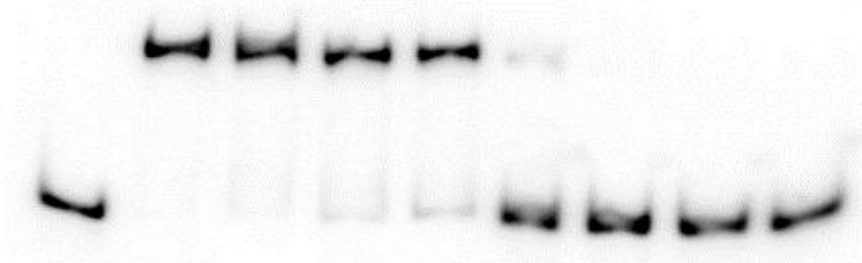


Рисунок 5.7.1 Анализ комплексов AcdR-ДНК методом задержки в геле.

Исследование зависимости связывания AcdR от концентрации АЦК показало, что связывание 1 пкмоль ДНК с 23 пкмоль AcdR начинается в присутствии не менее чем 12 нмоль АЦК (рисунок 5.7.2). Очевидно, АЦК является низкомолекулярным эффектором белка-регулятора, связывание с которым вызывает конформационные изменения в молекуле белка, в результате чего увеличивается аффинность AcdR к операторному участку ДНК. Следует обратить внимание на неполное связывание при низких концентрациях АЦК, свидетельствующее о том, что AcdR является мультимерным белком, подобно Lrp *E. coli* и, следовательно, связывание AcdR с ДНК происходит с кооперативным эффектом. По-видимому, постепенное заполнение сайтов связывания эффектором в молекуле регулятора приводит к увеличению его аффинности к операторному участку ДНК.

АЦК (нмоль)	1000	0	0,4	1,3	4	12	37	111	333	1000
AcdR из <i>M. radiotolerans</i> (пкмоль)	0	23	23	23	23	23	23	23	23	23
Меченый фрагмент ДНК (пкмоль)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

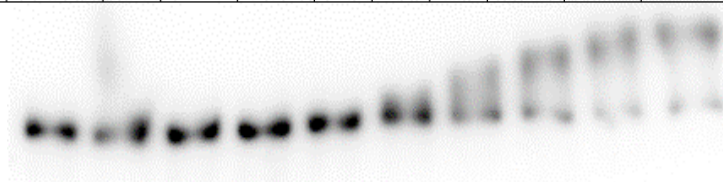


Рисунок 5.7.2 Анализ образования комплексов AcdR-ДНК в зависимости от концентрации 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата методом задержки в геле.

Для определения обратимости связывания белка AcdR с ДНК к образованному после 15 минут инкубации комплексу AcdR-ДНК добавляли немеченый ПЦР-продукт. Методом задержки в геле показано, что рекомбинантный белок AcdR *M. radiotolerans* специфично и обратимо связывается с регуляторной областью структурного гена *acdS*. Образованный комплекс ДНК-белок характеризуется довольно высокой стабильностью, поскольку он не разрушался в течение 30 минут, а время полураспада составило 1 час. (рисунок 5.7.3).

АЦК (пкмоль)	0	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
AcdR из <i>M. radiotolerans</i> (пкмоль)	39	39	39	39	39	39	39	39
Меченый фрагмент ДНК (пкмоль)	1	1	1	1	1	1	1	1
Немеченый фрагмент ДНК (пкмоль)	0	0	10	10	10	10	10	10
Время (час)	0,25	0,25	0,5	1	2	4	6	12

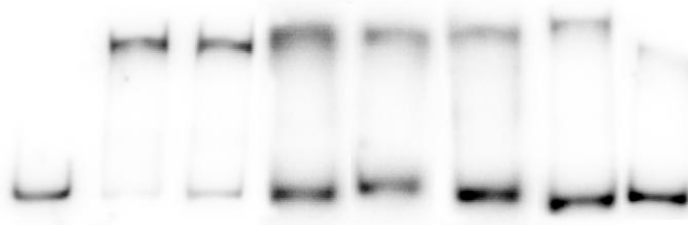


Рисунок 5.7.3 Анализ стабильности комплексов AcdR-ДНК методом задержки в геле.

ПЦР-фрагменты, содержащие регуляторный участок гена *acdS* и меченые по 5'-концу верхней или нижней цепи обработали рестриктазой EcoRI (рисунок 5.7.4). Показано, что после рестрикции ПЦР-фрагмента AcdR полностью утрачивает способность связываться с фрагментами ДНК, что указывает на присутствие в этой области сайта связывания AcdR (рисунок 5.7.5).

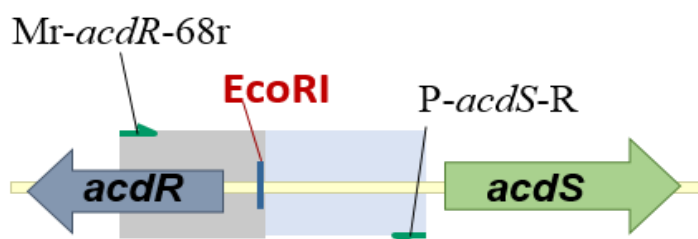


Рисунок 5.7.4 Карта локуса *acdS-acdR* *M. radiotolerans* с указанием праймеров и сайта рестрикции EcoRI.

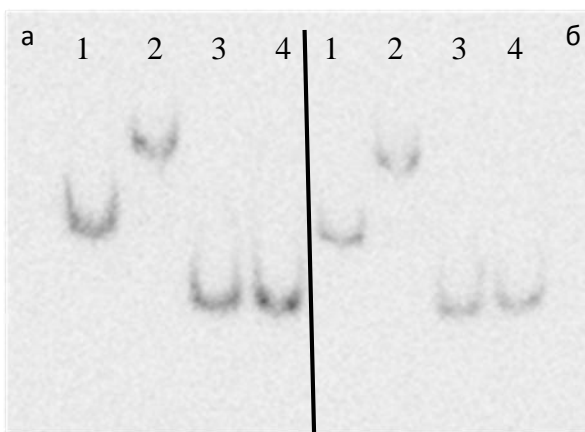


Рисунок 5.7.5 Эксперимент: **а** – с ПЦР-фрагментом, ^{32}P – меченым по верхней цепи, **б** – с ПЦР-фрагментом, ^{32}P -меченым по нижней цепи. 1 – контроль, 2. ПЦР-фрагмент, связанный белком *AcdR M. radiotolerans*, 3. после обработки фрагмента рестриктазой *EcoRI*, 4. ПЦР-фрагмент, обработанный рестриктазой *EcoRI* после добавления *AcdR*, связывание не происходит.

5.8 Получение и характеристика мутантов *M. radiotolerans* по генам *acdS* и *acdR*

Поскольку у эпифитных бактерий, таких, как *M. radiotolerans*, мутанты по генам АЦК-дезаминазы не были получены, проведение этих экспериментов может предоставить возможность описать механизм воздействия филлосферных бактерий на рост и развитие растений за счет снижения уровня этилена.

Для решения этой задачи, при помощи гомологичной рекомбинации были получены мутанты *M. radiotolerans* с делециями в гене *acdS*, кодирующем структурный ген АЦК-дезаминазы, и *acdR*, кодирующем регуляторный белок Lgr-семейства. Мутантов комплементировали как исходным вектором p7A-29, служившим отрицательным контролем, так и плазмидами, несущими нокаутированный ген (p7A-36 для гена *acdS* и p7A-136 для гена *acdR*). Поскольку синтез АЦК-дезаминазы индуцируется добавлением АЦК в питательную среду, исходный штамм JCM2831, мутанты и комплементированные мутанты тестировали на наличие АЦК-дезаминазной активности при росте либо в присутствии, либо без индуктора синтеза АЦК-дезаминазы – 2-аминоизобутирата, более дешевого аналога АЦК (рисунок 5.8.1).

Исследование ферментативной активности в бесклеточных экстрактах показало, что мутанты *M. radiotolerans* $\Delta acdS$ и $\Delta acdR$ не обладают активностью АЦК-дезаминазы как с индуктором, так и без него, в отличие от исходного штамма, в котором активность фермента проявлялась в присутствии индуктора.

Комплементированные исходным вектором мутанты $\Delta acdS/p7A-29$ и $\Delta acdR/p7A-29$ не обладали активностью АЦК-дезаминазы аналогично бесплазмидным мутантам.

Комплементированный мутант $\Delta acdR/p7A-136$ в присутствии индуктора проявлял активность АЦК-деаминазы на уровне штамма дикого типа, однако, в отсутствие индуктора, в отличие от исходного штамма JCM2831, также наблюдали активность фермента. Это связано, по-видимому, с избыточной концентрацией регуляторного белка в клетках комплементированного штамма, что облегчает инициацию транскрипции с промотора *acdS* даже в отсутствие индуктора. Комплементированный мутант $\Delta acdS/p7A-36$ проявлял очень высокую ферментативную активность независимо от индуктора, что неудивительно, поскольку ген *acdS* в нём находится под контролем сильного конститутивного промотора метанолдегидрогеназы *mxaF* (таблица 5.8.1 и рисунок 5.8.1).

Таблица 5.8.1 Значения активности АЦК-деаминазы нмоль/мин/мг белка (\pm стандартное отклонение) у дикого штамма, мутантов и комплементированных мутантов *M. radiotolerans* по генам *acdS* и *acdR*.

	JCM2831	$\Delta acdS$	$\Delta acdR$	$\Delta acdS/p7A-29$	$\Delta acdR/p7A-29$	$\Delta acdS/p7A-36$	$\Delta acdR/p7A-136$
С индукцией	0,56 ($\pm 0,7$)	0,11 ($\pm 0,4$)	0,15 ($\pm 0,02$)	0,07 ($\pm 0,03$)	0,05 ($\pm 0,06$)	3,1 ($\pm 0,01$)	0,6 ($\pm 0,08$)
Без индукции	0,13 ($\pm 0,05$)	0,07 ($\pm 0,02$)	0,09 ($\pm 0,02$)	0,06 ($\pm 0,01$)	0,011 ($\pm 0,03$)	2,8 ($\pm 0,07$)	0,31 ($\pm 0,08$)

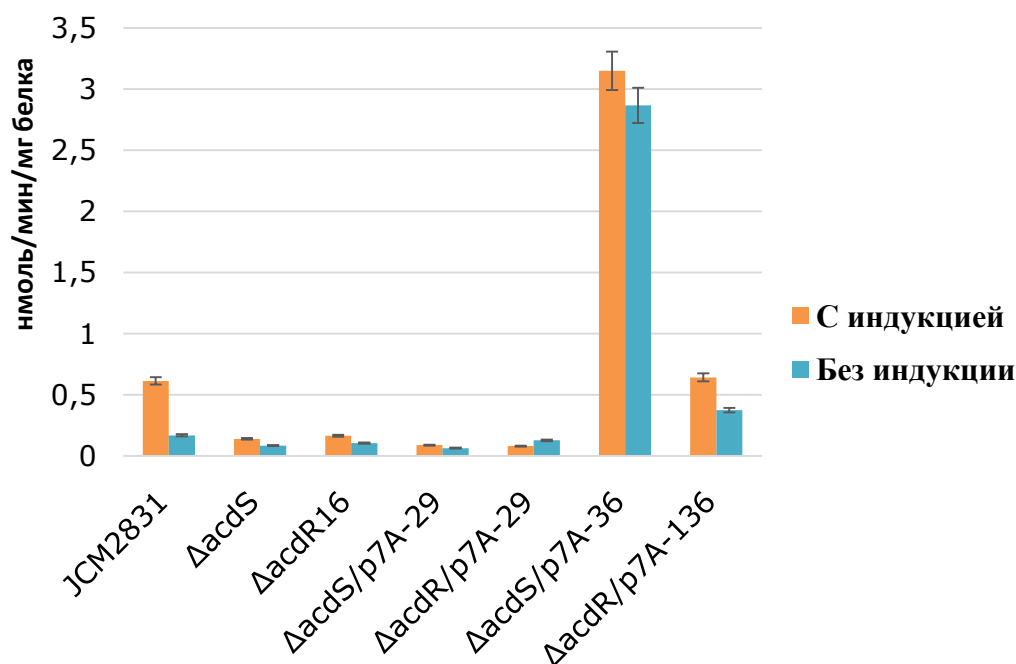


Рисунок 5.8.1 Определение активности AcdS у дикого штамма, мутантов и комплементированных мутантов *M. radiotolerans* по генам *acdS* и *acdR*.

5.9 Определение функциональной активности AcdR в клетках *E. coli*

Для исследования функциональной активности AcdR использовали модифицированный метод определения промоторных областей (Novakova et al., 1998; Rezuchova, Kormanec, 2001). Ген *acdR* *M. radiotolerans* клонировали в плазмиде pAC5mut2 под контролем ИПТГ-индуцибельного промотора P_{trc} . Промоторную область гена *acdS* *M. radiotolerans* клонировали в плазмиде pSB40N, совместимой с pAC5mut2 и несущей *lacZa* в качестве репортерного гена. Этими векторами трансформировали клетки *E. coli* XL1. В качестве контроля использовали трансформанты, содержащие плазмиды pSB40N:*PacdS* и pAC5mut2 (рисунок 5.9.1).

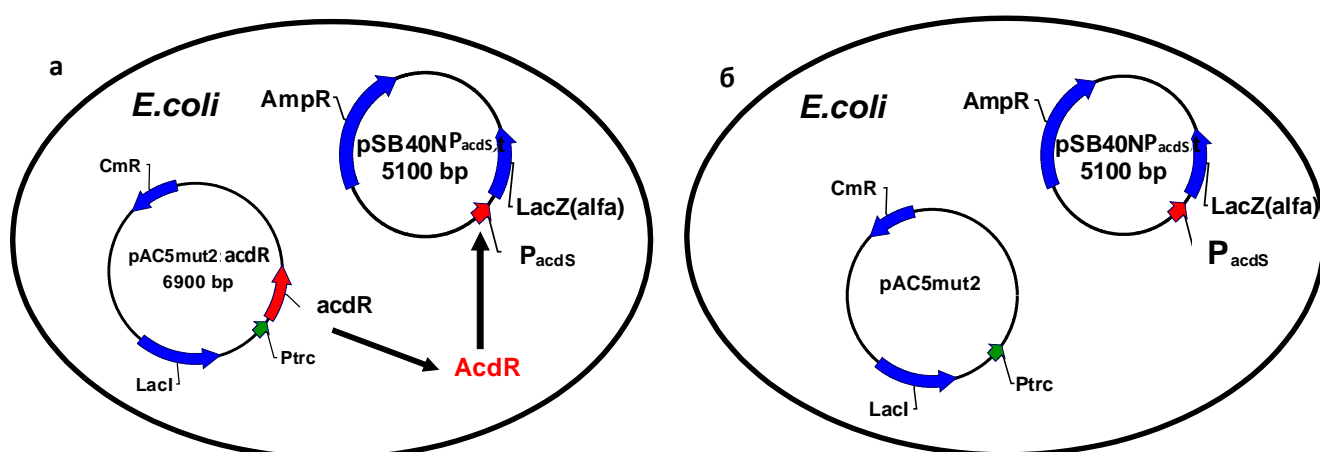


Рисунок 5.9.1 Схема эксперимента по определению функциональной активности белка AcdR *M. radiotolerans*, **а** – эксперимент, **б** – контроль.

Обнаружено, что при росте на среде LB в присутствии хромогенного красителя X-gal клетки не окрашивались в синий цвет (рисунок 5.9.2). Это указывает на то, что ген *lacZa* не транскрибировался с промоторной области гена *acdS* РНК-полимеразой *E. coli*.

Добавление в среду ИПТГ привело к появлению окраски у клеток *E. coli* XL1-Blue, содержащих векторы pAC5mut2:*acdR* и pSB40N:*PacdS* (рисунок 5.9.2). Это объясняется тем, что ИПТГ индуцирует экспрессию гена *acdR*, продукт которого связывается с последовательностью промотора *acdS* гена *M. radiotolerans*, что приводит к активации транскрипции гена *lacZa*. Кроме того, клетки окрашивались только при росте на среде с добавлением индуктора – 2-аминоизобутирата.

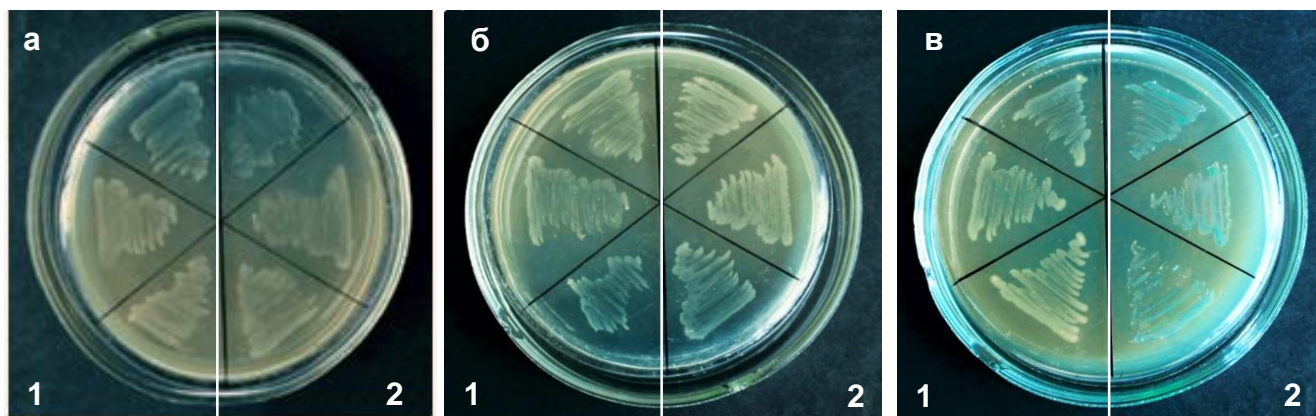


Рисунок 5.9.2 Клетки *E. coli* XL1, содержащие плазмиды pAC5mut2/pSB40N:P_{acdS} (1) и AC5mut2:acdR/pSB40N:P_{acdS} (2), в присутствии X-gal (а), в присутствии X-gal и 2-аминоизобутирата (б), X-gal/ИПТГ и 2-аминоизобутирата (в).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что регуляторный белок AcdR *M. radiotolerans* является активатором транскрипции гена *acdS* в присутствии индукторов (АЦК или 2-аминоизобутирата). На рисунке 5.9.3 показана модель транскрипционной регуляции гена *acdS*, заметно отличающаяся от изученной к настоящему моменту регуляции транскрипции *acdS* у *P. putida* UW4 (Cheng et al., 2008), приведённой на рисунке 1.4.3 (Глава 1).

Основное отличие предложенной модели регуляции транскрипции АЦКД от ранее исследованной в том, что AcdR у *M. radiotolerans*, по-видимому, является единственным регуляторным белком, участвующим в связывании промотора *acdS* и его активации. Напротив, у *P. putida* UW4, два белка AcdR и AcdB координированно регулируют экспрессию гена АЦК-деаминазы. Несмотря на то, что показано, что AcdR и AcdB связываются с операторным участком гена *acdS* *P. putida*, точные сайты связывания этих белков неизвестны, поэтому остаются неясными детали регуляции этого гена у псевдомонад. Например, какой из двух регуляторных белков облегчает образование «открытого комплекса» РНК-полимераза-ДНК. Помимо этого, методами поиска *in silico* в промоторе гена *acdS* *P. putida* обнаружены предположительные сайты связывания белков CRP (в аэробных условиях) и FNR (в анаэробных условиях) с промотором (Cheng et al., 2008). Интересно, что у псевдомонад АЦК не влияет на связывание AcdR с ДНК, тогда как этот комплекс диссоциирует в присутствии лейцина. AcdB, принадлежащий к группе фосфодиэстераз, напротив, связывается исключительно при наличии АЦК в реакционной смеси, а добавление лейцина не приводит к распаду образовавшегося AcdB-ДНК. Однако в присутствии лейцина комплекс AcdR-AcdB-ДНК разрушается, останавливая транскрипцию гена, кодирующего АЦКД (Cheng et al. 2008).

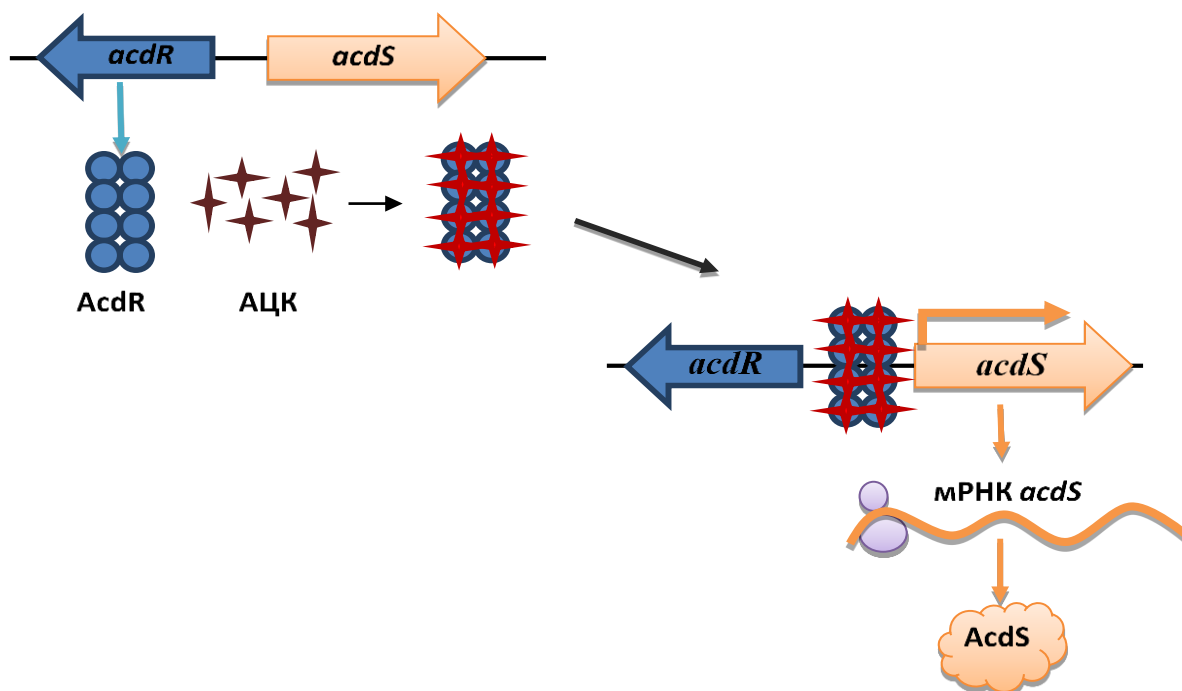


Рисунок 5.9.3 Гипотетическая модель регуляции транскрипции *acdS* у *M. radiotolerans*.

В случае регуляции транскрипции гена *acdS* *M. radiotolerans* нами установлено, что белок AcdR, в присутствии АЦК, по-видимому, является достаточным для активации транскрипции *acdS*. Кроме того, показано, что активность АЦК-деаминазы у нокаут-мутантов по гену *acdR* утрачивалась, полностью восстанавливаясь при комплементации данной мутации, что полностью согласуется с ранее полученными данными для *Rhizobium leguminosarum* (Ma et al., 2003). Помимо этого, добавление восьмикратного избытка лейцина в реакционную смесь ингибирующего влияния на связывание AcdR с ДНК, в отличие от псевдомонад, не оказывает. Однако вероятность регуляции дополнительными транскрипционными факторами (например, CRP или FNR) экспрессии *acdS* у метиловобактерий не исключена, несмотря на то, что гомологичных *acdB* из *P. putida* регуляторных генов у *M. radiotolerans* не обнаружено. Дополнительное значение исследованиям транскрипционной регуляции гена *acdS* придаёт тот факт, что для регуляторных белков Lrp-семейства характерна плеiotропия. Соответственно, белок AcdR может регулировать экспрессию многих генов бактерий. В связи с тем, что АЦК синтезируется только растениями и секретируется в межклеточное пространство, где может проникать внутрь клеток бактерий-фитосимбионтов, связываясь с регуляторными белками AcdR, вполне вероятно существование механизма влияния растений на метаболизм симбиотических бактерий посредством секреции АЦК.

Таким образом, в данной работе выявлено, что механизмы транскрипционной регуляции гена *acdS* у гаммапротеобактерии *P. putida* UW4 и альфапротеобактерии *M. radiotolerans* JCM 2831, несмотря на участие в обоих случаях регуляторного белка AcdR из Lrp-семейства, значительно отличаются, что свидетельствует о многообразии систем регуляции экспрессии *acdS*, кодирующего важный для симбиоза бактерий и растений фермент – АЦК-деаминазу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многие виды аэробных метилотрофных бактерий являются фитосимбионтами, способными использовать не только выделяемый растениями метанол, но и 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту за счет активности фермента АЦК-дезаминазы. Деаминарование АЦК, предшественника стрессового фитогормона этилена, приводит к снижению концентрации последнего в растениях, что повышает их устойчивость к биотическим стрессам, увеличивает толерантность к абиотическим неблагоприятным факторам, а также стимулирует рост и развитие (Glick, 2014). Несмотря на очевидную роль АЦК-дезаминазы для симбиоза бактерий и растений, этот фермент исследован слабо, а его транскрипционная регуляция для альфапротеобактерий ранее не изучалась. Кроме того, изучение АЦК-дезаминаз затруднено высоким уровнем сходства их аминокислотных последовательностей с ферментом катаболизма растительной аминокислоты D-цистеина - D-цистеиндисульфогидразой, которая тоже участвует в формировании ассоциации с растениями, приводя к образованию сероводорода. Как показано в последнее время, сероводород индуцирует многие протекторные системы растений (Wang et al., 2012; Li, 2013; Li, Zhu, 2014; Li et al., 2014), а также действует как фунгицид, повышая устойчивость к фитопатогенам (Soutourina et al., 2001).

У типовых штаммов аэробных метилотрофных бактерий из рода *Methylobacterium* проведен детальный анализ распространения генов АЦК-дезаминазы и D-цистеиндисульфогидразы. Наличие этих ферментов является конкурентным преимуществом бактерий-фитосимбионтов и свидетельствует об их потенциальной способности стимулировать рост и развитие растений. Показано, что распределение генов *acdS* и *dcyD* среди бактерий рода *Methylobacterium* подчиняются определенным филогенетическим закономерностям, так как обнаружены две группы видов, содержащих ген *acdS* и одна – ген *dcyD*. Разработанная нами система ПЦР-детекции генов АЦК-дезаминазы и D-цистеиндисульфогидразы позволит проводить анализ новых изолятов и расширить спектр метилотрофов-фитосимбионтов.

В данной работе изучены рекомбинантные АЦК-дезаминазы из *M. nodulans* и *A. methanolica*. Проведен сравнительный анализ их биохимических свойств, в результате которого было выдвинуто предположение о том, что наличие АЦК-дезаминазы является одним из адаптационных механизмов ассоциации бактерий с растениями и ее активность обусловлена экологической нишей, занимаемой бактерией. *M. nodulans* является клубеньковым фитосимбионтом, имеющим большой доступ к АЦК, соответственно, имеет наибольшую активность АЦК-дезаминазы, тогда как *A. methanolica* – свободноживущая почвенная бактерия,

не связанная с поверхностью растений непосредственно, по-видимому, обладает значительно более низкой активностью этого фермента.

Итак, нами охарактеризован транскрипционный регулятор AcdR гена АЦК-дезаминазы *M. radiotolerans* JCM 2831. Установлено, что аминокислотные последовательности белков AcdR метиловобактерий кластеризуются совместно с белками альфапротеобактерий и филогенетически значительно отличаются от охарактеризованного AcdR из гаммапротеобактерии *P. putida* UW4. Показано, что белок AcdR из *M. radiotolerans* JCM2831 связывает фрагмент ДНК, содержащий промоторно-операторный участок гена *acdS*, и в присутствии эффектора 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата является активатором транскрипции гена АЦК-дезаминазы. Отличие предлагаемой модели транскрипционной регуляции гена *acdS* от ранее исследованной у *P. putida* UW4, возможно, связано с тем, что метиловобактерии легко проникают в ткани растений, где им доступны различные метаболиты, тогда как *P. putida* обитает в ризосфере. Помимо этого, разнообразие моделей может быть связано с плейотропной природой регулятора AcdR.

Для подтверждения участия *acdR* в регуляции *acdS* получены делеционные и комплементированные мутанты по этим генам. Выявлено, что активность АЦК-дезаминазы у нокаут-мутантов отсутствует, тогда как комплементация мутации приводит к восстановлению её функции. Кроме того, функция AcdR как активатора транскрипции гена *acdS* показана в гетерологичной системе на основе *E. coli*.

Таким образом, исследование свойств АЦК-дезаминазы, а также регуляции экспрессии этого фермента позволило получить новые данные о механизмах воздействия метилотрофных бактерий на растения. Проведенная работа является основой для дальнейших молекулярно-биохимических исследований организации и регуляции фитосимбиоза у аэробных метиловобактерий.

Следует отметить, что аэробные метилотрофные бактерии не патогенны для человека, животных и растений, что делает перспективным их практическое использование в качестве экологически безопасного средства для стимуляции роста растений, повышения их устойчивости к патогенам, удлинения срока хранения плодов и цветов, а также в процессах фиторемедиации.

ВЫВОДЫ

1. В результате ПЦР-скрининга с помощью вырожденных олигонуклеотидных праймеров 28 штаммов аэробных метиловых бактерий гены АЦК-дезаминаз (*acdS*) обнаружены у типовых штаммов видов *Methylobacterium brachiatum*, *M. fujisawaense*, *M. goesingense*, *M. gregans*, *M. longum*, *M. marchantiae*, *M. phyllosphaerae*, *M. tardum*, гены D-цистеиндесульфогидраз (*dcyD*) – у *M. aminovorans*, *M. gnaphalii*, *M. gossipiicola*, *M. rhodesianum*, *M. salsuginis*, *M. suomiense*, *M. thiocyanatum*, *M. trifolii*, *M. zatmanii*.

2. Анализ секвенированных и представленных в GenBank аминокислотных последовательностей белков AcdS и DcyD метиловых бактерий выявил, что из 48 видов *Methylobacterium* в геноме 29 видов присутствуют гены *acdS* и *dcyD*. Ген *acdS* обнаружен у 18 видов, *dcyD* – у 13, при этом два вида обладают обоими генами. В геномах 17 видов исследуемые гены не найдены. Филогенетический анализ показал, что аминокислотные последовательности AcdS образуют два кластера, а аминокислотные последовательности DcyD – один, что коррелирует с филогенией гена 16S рРНК соответствующих видов.

3. Клонированы гены *acdS* и охарактеризованы рекомбинантные 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминазы из клубенькового симбионта *Methylobacterium nodulans* ORS 2060 и факультативно метилотрофной актинобактерии *Amycolatopsis methanolica* 239. Определены основные свойства этих ферментов: AcdS *M. nodulans* – гомотетрамер с молекулярной массой 144 кДа, K_m $0,8 \pm 0,04$ мМ, k_{cat} $111,8 \pm 0,02$ мин⁻¹, оптимумы pH 8,0 и температуры 50°C. *A. methanolica* гомотетрамер с молекулярной массой 144 кДа, K_m $1,7 \pm 0,2$ мМ, k_{cat} $5,1 \pm 0,2$ мин⁻¹, оптимумы pH 8,5 и температуры 55 °C.

4. Впервые получены делеционные и комплементированные мутанты *M. radiotolerans* по генам *acdS* и *acdR*. Установлено, что в отличие от исходного штамма JCM 2831, делеционные мутанты не обладают активностью АЦК-дезаминазы, тогда как у мутантов, комплементированных плазмидами, несущими соответствующие гены, активность восстановилась.

5. Клонирован ген *acdR* *M. radiotolerans* JCM 2831 и получен препарат рекомбинантного белка AcdR. Впервые для альфапротеобактерий показано, что AcdR из *M. radiotolerans* JCM 2831 специфически и обратимо в присутствии эффектора 1-аминоциклопропан-1-карбоксилата связывает фрагмент ДНК, содержащий промоторно-операторный участок гена *acdS* и является активатором транскрипции гена АЦК-дезаминазы.

Список сокращений и условных обозначений

GSH – восстановленный глутатион
SAM – S-аденозилметионин
 k_{cat} – каталитическая константа
 K_m – константа Михаэлиса-Ментен
АТФ – аденозинтрифосфат
АЦК – 1-аминоциклопропан-1-карбоксилат
АЦКД – 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдезаминаза
ДЭАЭ-целлюлоза – Диэтиламиноэтилцеллюлоза
ДСН-ПААГЭ – электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом Na
дНТФ – дезоксирибонуклеозидтрифосфат
ДХФИФ – дихлорфенолиндифенол
ДЦДГ – D-цистеиндесульфогидраза
ИПТГ – изопропил-1-тио- β -D-галактопиранозид
ИУК – индолилуксусная кислота
КОЕ – колониеобразующая единица
МДГ – метанолдегидрогеназа
НАД⁺/НАДН₂ – окисленный/восстановленный никотинамиддинуклеотид
НАДФ⁺/НАДФН₂ – восстановленный никотинамиддинуклеотидфосфат
ОРС – открытая рамка считывания
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РБФ – рибулозо-1,5-бисфосфат
РБФК/О (Рубиско) - рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа
РМФ – рибулозомонофосфат
РОФМ – розовоокрашенные факультативные метилотрофы
рРНК – рибосомная РНК
СРРБ – стимулирующие рост растений бактерии
ТГФ – тетрагидрофолат
тРНК – транспортная РНК
ФГА – 3-фосфоглицериновый альдегид
ФДГ – формиатдегидрогеназа
ФЕП – фосфоенолпируват
ФМС – феназинметосульфат
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агафонова Н.В., Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Облигатный метилотроф *Methylobacillus arboreus* Iva^T синтезирует фитогормон – гибберелловую кислоту GA₃ // Микробиол. 2018. Т. 87. №1.
2. Агафонова Н.В., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Повышение устойчивости растений гороха к окислительному стрессу, вызванному паракватом, при колонизации аэробными метиловыми бактериями // Прикл. биохим. и микробиол. 2016. Т. 52. № 2. С. 210–216.
3. Доронина Н.В. Биоразнообразие и таксономия аэробных метиловых бактерий // Автореф. дисс. докт. биол. наук. Пущино. 1999. 32 с.
4. Доронина Н.В., Иванова Е.Г., Сузина Н.Е., Троценко Ю.А. Метанотрофы и метиловыми бактериями обнаружены в тканях древесных растений в зимний период // Микробиол. 2004. Т. 73. № 6. С. 817–824.
5. Доронина Н.В., Иванова Е.Г., Троценко Ю.А. Новые данные о способности метиловых бактерий и метанотрофов синтезировать ауксины // Микробиол. 2002. Т.71, №1. С. 130–132,
6. Доронина Н.В., Кудинова Л.В., Троценко Ю.А. *Methylovorus mays* – новый вид аэробных облигатных метиловых бактерий, ассоциированных с растениями // Микробиол. 2000. Т. 69. № 5. С. 712–716.
7. Доронина Н.В., Торгонская М.Л., Федоров Д.Н., Троценко Ю.А. Аэробные метиловыми бактериями – перспективные объекты современной биотехнологии (обзор) // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. №2. С. 111–121.
8. Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Новый термотолерантный алкалофильный метилотроф рода *Paracoccus*, ассоциированный с растениями // Микробиол. 2000. Т. 69. № 5. С. 706–711.
9. Екимова Г.А. Федоров, Д.Н., Доронина, Н.В., Троценко, Ю.А. 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминаза аэробного факультативно метилотрофного актиномицета *Amycolatopsis methanolica* 239 // Микробиология. 2015. Т. 84. №. 4. С. 493–493.
10. Иванова Е.Г., Доронина Н.В., Шепеляковская А.О., Ламан А.Г., Бровко Ф.А., Троценко Ю.А. Аэробные метилотрофные бактерии как фитосимбионты // Микробиол. 2000. Т. 69. № 6. С. 764– 69.
11. Капаруллина Е.Н., Доронина Н.В., Мустахимов И.И., Агафонова Н.В., Троценко Ю.А. Биоразнообразие аэробных метиловых бактерий, ассоциированных с филлосферой растений Южного Подмосковья // Микробиология. 2017. Т. 86. № 1. С. 107-113.
12. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. Киев: Основа, 2010. 351 с.

13. Кулаева О. Этилен в жизни растений // Соросовский образовательный журнал 1998. № 11. С. 78–84.
14. Моргун В.В., Коць С.Я., Кириченко Е.В. Рост стимулирующие ризобактерии и их практическое применение // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41. № 3. С. 187–207.
15. Полевой В.В. Гормональная система растений. Фитогормоны. // Л.: изд-во «ЛГУ». 1982. С. 125–143.
16. Романовская В.А., Столяр С.М., Малашенко Ю.П. Распространение бактерий рода *Methylobacterium* в различных экосистемах Украины // Мікробіол. журн. 1996. Т. 58. № 3. С. 3 – 10.
17. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Хмелина В.Н., Понаморева О.Н. Биология и биотехнология аэробных метилотрофов. Тула: Изд-во ТулГУ, 2009.
18. Троценко Ю.А., Доронина Н.В. Биология аэробных метиловых бактерий-деструкторов галометанов // Микробиология. 2003. Т. 72. № 2. С. 149–160.
19. Троценко Ю.А., Доронина Н.В., Торгонская М.Л. Аэробные метиловых бактерии // Под. ред. В.Ф. Гальченко. Пушино: ОНТИ ПНЦ РАН, 2010. С. 222–224.
20. Троценко Ю.А., Иванова Е.Г., Доронина Н.В. Аэробные метилотрофные бактерии как фитосимбионты // Микробиол. 2001. Т. 70, № 6. С. 725–736.
21. Федоров Д.Н., Бут С.Ю., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Влияние экзогенной индолилуксусной кислоты на активность ферментов центрального метаболизма у *Methylobacterium extorquens* AM1 // Микробиол. 2009. Т. 78. № 6. С. 844–846.
22. Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Клонирование и характеристика индолил-3-пируватдекарбоксилазы из *Methylobacterium extorquens* AM1 // Биохимия. 2010. Т. 75. № 12. С. 1651–1661.
23. Федоров Д.Н., Доронина Н.В., Троценко Ю.А. Фитосимбиоз аэробных метиловых бактерий: новые факты и гипотезы // Микробиол. 2011. Т. 80. № 4. С. 435–446.
24. Шепеляковская А.О., Доронина Н.В., Ламан А.Г., Бровка Ф.А., Троценко Ю.А. Новые данные о способности аэробных метилотрофных бактерий синтезировать цитокинины // Докл. РАН. 1999. Т. 368. № 4. С. 555–557.
25. Шихсаидов М.В. Клонирование и характеристика 1-аминоциклопропан-1-карбоксилатдеаминазы из *Methylobacterium radiotolerans* JCM 2831 и D-цистеиндисульфогидразы из *Methylobacterium extorquens* AM1: Магистерская диссертация // ПушГУ. Пушино, 2010. 54 с.

26. Abanda-Nkpwatt D., Müsch M., Tschiersch J., Boettner M. Schwab W. Molecular interaction between *Methylobacterium extorquens* and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site // *Journal of experimental botany*. 2006. V. 57. №. 15. P. 4025–4032.
27. Abe K., Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator // *J. Neuro-sci*. 1996. V. 16 (3). P. 1066–1071.
28. Ali B., Sabri A.N. Hasnain S. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.) // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010. V. 26. P.1379–1384.
29. Ali S., Charles T.C., Glick B.R. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase // *Plant Physiol. Biochem*. 2014. V. 80. P. 160–167.
30. Almeida D.M., Dini-Andreote F., Camargo Neves A.F., Ramos R.T.J., Andreote F.D., Carneiro A.R., Silva, A. Draft genome sequence of *Methylobacterium mesophilicum* strain SR1.6/6, isolated from *Citrus sinensis* // *Genome Announcements*. 2013.V. 1, № 3. Article ID e00356-13.
31. Andreote F.D., Carneiro R.T., Salles J.F., Marcon J., Labate C.A., Azevedo J.L., W.L. Araújo. Culture independent assessment of rhizobiales-related alphaproteobacteria and the diversity of *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic eucalyptus // *Microbial. Ecology*. 2009. V. 57. № 1. P. 82–93.
32. Andreote F.D., Lacava P.T., Gai C.S. Araujo W.L., Maccheroni W.Jr., van Overbeek L.S., van Elsas J.D., Azevedo J.L. Model plants for studying the interaction between *Methylobacterium mesophilicum* and *Xylella fastidiosa* // *Can. J. Microbiol*. 2006. V. 52. № 5. P. 419–426.
33. Anthony C. The biochemistry of methylotrophs // London: Acad. Press, 1982. 251p.
34. Aragón I.M., Pérez-Martínez I., Moreno-Pérez A., Cerezo M., Ramos C. New insights into the role of indole-3-acetic acid in the virulence of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* // *FEMS Microbiol Lett*. 2014. V. 356. P. 184–192.
35. Araújo W.L., Marcon J., Maccheroni W.Jr., van Elsas J.D., van Vuurde J.W.L., Azevedo J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants // *Appl. Environ. Microbiol*. 2002. V. 68. № 10. P. 4906–4914.
36. Ardanov P., Lyastchenko S., Karppinen K., Häggman Hel., Kozyrovska N., Pirttilä A.M. Effects of *Methylobacterium* sp. one mergence, yield, and disease prevalence in cultivars of potato (*Solanum tuberosum* L.) were associated with the endophytic microbial community // *Plant Soil*. 2016. V. 405 (1). P. 299–310.
37. Arshad M., Frankenberger W.T. Jr. Ethylene: Agricultural sources and applications // Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 2002. P. 450.

38. Austin B., Goodfellow M. *Pseudomonas mesophilica*, a new species of pink bacteria isolated from leaf surfaces // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 1979. V. 29. №. 4. P. 373–378.
39. Barnawal D., Bharti N., Maji D., Chanotiya C.S., Kalra A. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase-containing rhizobacteria protect *Ocimum sanctum* plants during waterlogging stress via reduced ethylene generation. // Plant Physiol. Biochem. 2012. V. 58. P. 227–235.
40. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical biochemistry. 1976. V. 72. №. 1–2. P. 248–254.
41. Broek A.V., Gysegom P., Ona O., Hendrickx N., Prinsen E., Van Impe J., Vanderleyden J. Transcriptional analysis of the *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression // Mol. Plant Microbe Interact. 2005. V. 18. P. 311–323.
42. Cassán F., Bottini R., Schneider G., Piccoli P. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA₂₀ and metabolize the resultant aglycones to GA₁ in seedlings of rice dwarf mutants // Plant Physiology. 2001. V. 125. №. 4. P. 2053–2058.
43. Cassán F., Bottini R., Schneider G., Piccoli P. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA₂₀ and metabolize the resultant aglycones to GA₁ in seedlings of rice dwarf mutants // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 2053–2058.
44. Catanzariti A.M., Soboleva T.A., Jans D.A., Board P.G., Baker, R.T. An efficient system for high level expression and easy purification of authentic recombinant proteins // Protein Science. 2004. V. 13. №. 5. P. 1331–1339.
45. Cervantes-Martí J., López-Dí S. Detection of the effects of *Methylobacterium* in *Agave tequilana* Weber var. azul by laser-induced fluorescence // Plant Sci. 2004. V. 166. №. 4. P. 889–892.
46. Cheng X., Ruyter-Spira C., Bouwmeester H. The interaction between strigolactones and other plant hormones in the regulation of plant development // Front Plant Sci. 2013. V. 4. P. 199.
47. Cheng Z., Duncker B.P., McConkey B.J., Glick B.R. Transcriptional regulation of ACC deaminase gene expression in *Pseudomonas putida* UW4 // Canadian journal of microbiology. 2008. V. 54. №. 2. P. 128–136.
48. Chinnadurai C., Balachandar D., Sundaram S. Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase producing methylobacteria from phyllosphere of rice and their role in ethylene regulation // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2009. V. 25. №. 8. 1403–1411.

49. Contesto C., Desbrosses G., Lefoulon C., Béna G., Borel F., Galland M., Touraine, B. Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on *Arabidopsis indicata* that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria // *Plant science*. 2008. V. 175. №. 1. P. 178–189.
50. Corpe W.A., Rheem S. Ecology of the methylotrophic bacteria living on leaf surface // *FEMS Microbiol. Ecol.* 1989. V. 62. P. 243–250.
51. Costacurta A., Keijers V., Vanderleyden J. Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase gene // *Molecular and General Genetics*. 1994 V. 243. № 4. P. 463-472.
52. De Boer, L., Dijkhuizen L., Grobben G., Goodfellow M., Stackebrandt E., Parlett J.H., Whitehead D., Witt D. *Amycolatopsis methanolica* sp. nov., a facultatively methylotrophic actinomycete // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1990. V. 40. №. 2. P. 194–204.
53. de los Rios S., Perona J.J. Structure of the *Escherichia coli* leucine-responsive regulatory protein Lrp reveals a novel octameric assembly // *Journal of molecular biology*. 2007. V. 366. №. 5. P. 1589–1602.
54. De Rybel B., Mähönen A.P., Helariutta Y., Weijers D. Plant vascular development: from early specification to differentiation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016. V. 17. № 30.
55. Dedysh S.N., Smirnova K.V., Khmelenina V.N., Suzina N.E., Liesack W., Trotsenko Y.A. Methylotrophic autotrophy in *Beijerinckia mobilis*// *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 3884–3888.
56. Deka H., Deka S., Baruah C. Plant growth promoting rhizobacteria for value addition: mechanism of action // *Plant-growth promoting rhizobacteria (pgpr) and medicinal plants*. Springer. New York. 2015. P. 305–321.
57. Dennis J.J., Zylstra G.J. Plasposons: modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes // *Applied and Environmental Microbiology*. 1998. V. 64. №. 7. P. 2710–2715.
58. Dodd I.C., Zinovkina N.Y., Safronova V.I., Belimov A.A. Rhizobacterial mediation of plant hormone status // *Ann Appl. Biol.* 2010. V. 157. P. 361–379.
59. Dourado M.N., Aparecida Camargo Neves A., Santos D. S., Araújo W. L. Biotechnological and agronomic potential of endophytic pink-pigmented methylotrophic *Methylobacterium* spp // *BioMed research international*. 2015. V. 2015.
60. Dourado M.N., Ferreira A., Araújo W.L., Azevedo J.L., Lacava P.T. The diversity of endophytic methylotrophic bacteria in an oil-contaminated and an oil-free mangrove ecosystem and their tolerance to heavy metals // *Biotechnology ResearchInternational*, 2012. V. 2012.
61. Duca D., Lorv J., Patten C., Rose D., Glick B. Microbial indole-3-acetic acid and plant growth // *Anton Van Leeuwenhoek*. 2014. V. 106. P. 85–125.

62. Egamberdieva D. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat // *Acta Physiol. Plant.* 2009. V. 31. P. 861–864.
63. Fahad S., Hussain S., Bano A., Saud S., Hassan S., Shan D., Khan F.A., Khan F., Chen Y.T., Wu C., Tabassum M.A., Chun M.X., Afzal M., Jan A., Jan M.T., Huang J.L. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2015b. V. 22. P. 4907–4921.
64. Fahad S., Hussain S., Matloob A., Khan F.A., Khaliq A., Saud S., Hassan S., Shan D., Khan F., Ullah N., Faiq M., Khan M.R., Tareen A.K., Khan A., Ullah A., Ullah N., Huang J.L. Phytohormones and plant responses to salinity stress: a review // *Plant Growth Regul.* 2015a. V. 75. P. 391–404.
65. Fall R. Cycling of methanol between plants, methylotrophs and the atmosphere. // *Microbial Growth on C1 Compounds*, Springer 1996. P. 343-350.
66. Fall R. Cycling of methanol between plants, methylotrophs and the atmosphere // *Microbial growth on C₁-compounds* Kluwer Acad. Publ. 1996. P. 343–350.
67. Fedorov D.N., Ekimova G.A., Doronina N.V., Trotsenko Y.A. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminases from *Methylobacterium radiotolerans* and *Methylobacterium nodulans* with higher specificity for ACC // *FEMS Microbiol. Lett.* 2013. V. 343. № 1. P. 70–76.
68. Frenkel C., Peters J.S., Tieman D.M., Tiznado M.E., Handa A.K. Pectin methylesterase regulates methanol and ethanol accumulation in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 4293–4295.
69. Gadalla M.M., Snyder S.H. Hydrogen sulfide as a gasotransmitter // *J. Neurochem.* 2010. V. 113. P. 14–26.
70. Galbally I.E., Kirstine W. The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol // *J. Atmospheric Chemistry.* 2002. V. 43. P. 195–229.
71. Gamalero E., Glick B.R. Bacterial modulation of plant ethylene levels. // *Plant Physiol.* 2015. V. 169. № 13. P. 13–22.
72. Gan H. M., Chew T. H., Hudson A. O., Savka M. A. Genome sequence of *Methylobacterium* sp. strain GXF4, axylem-associated bacterium isolated from *Vitis vinifera* L. grapevine // *Journal of Bacteriology.* 2012. V. 194. № 18. P. 5157–5158.
73. Glick B.R., Cheng Z., Czarny J., Duan J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria // *Eur. J. Plant Pathol.* 2007. V. 119, № 3. P. 329–339.
74. Glick B.R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world // *Microbiol Res* 2014. V. 169. P. 30–39.
75. Glick B.R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. // *Scientifica.* V. 2012.

76. Glick B.R., Todorovic B., Czarny J., Cheng Z., Duan J. McConkey B. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase // *Crit. Rev. Plant Sci.* 2007. V. 26. P. 227–242.
77. Green P.N., Ardley J.K. Review of the genus *Methylobacterium* and closely related organisms: a proposal that some *Methylobacterium* species be reclassified into a new genus, *Methylorubrum* gen. nov // *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 2018.
78. Grobelak A., Napora A., Kacprzak M. Using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth // *Ecological Engineering.* 2015. V. 84. P. 22–48.
79. Guo H., Xiao T., Zhou H., Xie Y., Shen W. Hydrogen sulfide: a versatile regulator of environmental stress in plants // *Acta Physiol. Plant.* 2016. V. 38:16. DOI 10.1007/s11738-015-2038-x.
80. Gupta S., Seth R., Sharma A. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Play a Role as Phytostimulators for Sustainable Agriculture // *Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture.* Springer Singapore. 2016. P. 475–493.
81. Hancock J.T., Whiteman M. Hydrogen sulfide and cell signaling: Team player or referee? // *Plant Physiol. Biochem.* 2014. V. 78. P. 37–42.
82. Harder W., Dijkhuizen L. Physiological responses to nutrient limitation // *Annual Reviews in Microbiology.* 1983. V. 37. №. 1. P. 1–23.
83. Hector J.F., Kloosperman H., Dijkhuizen L. Nicotinprotein methanol dehydrogenase enzymes in gram-positive methylotrophic bacteria // *J. Molecular Catalysis B. Enzymatic.* 2000. V. 8. P. 103–109.
84. Hedden P., Thomas S.G. Gibberellin biosynthesis and its regulation // *Biochem. J.* 2012. V. 444. P. 11–25.
85. Henco K. *The QIAexpressionist: The High Level Expression and Protein Purification System.* QIAGEN Press, Hamburg. 1992.
86. Holland M.A., Long R.L.G., Polacco J.C. *Methylobacterium* spp.: phylloplane bacteria involved in cross-talk with the plant host // *Phyllosphere Microbiology.* St. Paul, Minn: American Phytopathological Society. 2002. V. 125. P. 325.
87. Holland M.A. *Methylobacterium* and plants // *Recent Res. Devel. Plant Physiol.* 1997. V. 1. P. 207–213.
88. Honma M., Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid // *Agric. Biol. Chem.* 1978. V. 42. P. 1825–1831.
89. Hontzeas N., Richardson A.O., Belimov A., Safronova V., Abu-Omar M.M., Glick B.R. Evidence for horizontal transfer of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase genes // *Applied and Environmental Microbiology.* 2005. V. 71. №. 11. P. 7556–7558.

90. Hontzeas N., Zoidakis J., Glick B.R., Abu-Omar M.M. Expression and characterization of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase from the rhizobacterium *P. putida* UW4: a key enzyme in bacterial plant growth promotion // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004. V. 1703. P. 11–19.
91. Iguchi H., Yurimoto H., Sakai Ya. Interactions of methylotrophs with plants and other heterotrophic bacteria // *Microorganisms*. 2015. V. 3. P. 137–151.
92. Ikeda S., Okubo T. Anda M., Nakashita H., Yasuda M., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Eda S., Momiyama A. Community- and genome-based views of plant-associated bacteria: plant–bacterial interactions in soybean and rice // *Plant and Cell Physiology*. 2010. V. 51. №. 9. P. 1398–1410.
93. Iqbal N., Umar S., Khan N.A., Khan M.I.R. A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism // *Environ. Exp. Bot.* 2014. V. 100. P. 34–42.
94. Ito H., Iizuka H. Taxonomic studies on a radio-resistant *Pseudomonas*: Part XII. Studies on the microorganisms of cereal grain // *Agricultural and biological chemistry*. 1971. V. 35. № 10. P. 1566–1571.
95. Ivanova E.G., Doronina N.V., Trotsenko Yu.A. *Hansschlegelia plantiphila* gen. nov. sp. nov., a new aerobic restricted facultative methylotrophic bacterium associated with plants // *Syst. Appl. Microbiol.* 2007. V. 30. P. 444–452.
96. Javid M.G., Sorooshzadeh A., Moradi F., Sanavy S.A.M.M., Allahdadi I. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants // *Aust. J. Crop. Sci.* 2011. V. 5. P. 726–734.
97. Jin Z., Xue S., Luo Y., Tian B., Fang H., Li H., Pei Y. Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis* // *Plant Physiol. Biochem.* 2013. V. 62. P. 41–46.
98. Jin Z.P., Shen J.J., Qiao Z.J., Yang G.D., Wang R., Pei Y.X. Hydrogen sulfide improves drought re-sistance in *Arabidopsis thaliana* // *Biochem. Bio-phys. Res. Commun.* 2011. V. 414. P. 481–486.
99. Jourand P., Giraud E., Béna G., Sy A., Willems A., Gillis M., Dreyfus B., de Lajudie P. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004. V. 54. № 6. P. 2269–2273.
100. Jourand P., Renier A., Rapior S., de Faria S.M., Prin Y, Galiana A., Giraud E. Dreyfus B. Role of methylotrophy during symbiosis between *Methylobacterium nodulans* and *Crotalaria podocarpa* // *Molecular plant-microbe interactions*. 2005. V. 18. №. 10. P. 1061–1068.
101. Kakimoto T. Biosynthesis of cytokinins // *J. Plant Res.* 2003. V. 116. P. 233–239.
102. Kane S.R. Chakicherla A.Y., Chain P.S., Schmidt R., Shin M.W., Legler T.C., Scow K.M., Larimer F.W., Lucas S.M., Richardson P.M. Whole-genome analysis of the methyl tert-butyl ether-

- degrading beta-proteobacterium *Methylibium petroleiphilum* PM1 // Journal of bacteriology. 2007. V. 189. №. 5. P. 1931–1945.
103. Kang Y.S., Kim J., Shin H.D., Nam Y.D., Bae J.W., Jeon C.O., Park, W. *Methylobacterium platani* sp. nov., isolated from a leaf of the tree *Platanus orientalis* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2007. V. 57. №. 12. P. 2849–2853.
104. Kende H. Ethylene biosynthesis // Annu. Rev. Plant. Biol. 1993. V. 44. № 1. P. 283–307.
105. Keppler F., Hamilton J.T., McRoberts W.C., Vigano, I., Braß M., Röckmann T. Methoxyl groups of plant pectin as a precursor of atmospheric methane: evidence from deuterium labelling studies // New Phytologist. 2008. V. 178. №. 4. P. 808–814.
106. Keppler F., Hamilton J.T.G., Brass M., Roeckmann T. Methane emissions from terrestrial plants under aerobic conditions // Nature. 2006. V. 439. P. 187–191.
107. Khan A.L., Waqas M., Hussain J., Al-Harrasi A., Hamayun M., Lee I-J. Phytohormones enabled endophytic fungal symbiosis improve aluminum phytoextraction in tolerant *Solanum lycopersicum*: an examples of *Penicillium janthinellum* LK5 and comparison with exogenous GA 3 // J. Hazard. Mater. 2015. V. 295. P. 70–78.
108. Knief C., Frances L., Cantet F., Vorholt J.A. Cultivation-independent characterization of *Methylobacterium* populations in the plant phyllosphere by automated ribosomal intergenic spacer analysis // Applied and environmental microbiology. 2008. V. 74. №. 7. P. 2218–2228.
109. Knief C., Ramette A., Frances L., Alonso-Blanco C., Vorholt J.A. Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere // ISME J. 2010. V. 4. P. 719–728.
110. Koenig R.L., Morris R.O., Polacco J.C. tRNA is the source of low-level trans-zeatin production in *Methylobacterium* spp. // J. Bacteriol. 2002. V. 184. P. 1832–1842.
111. Kolb S. Aerobic methanol-oxidising Bacteria in soil // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 300. P. 1–10.
112. Krog A., Heggeset T.M.B., Müller J.E.N., Kupper C.E., Schneider O., Vorholt J.A., Ellingsen T.E., Brautaset T. Methylo-trophic *Bacillus methanolicus* encodes two chromosomal and one plasmid born NAD⁺ dependent methanol dehydrogenase paralogs with different catalytic and biochemical properties // PLoS ONE 2013. V. 8 (3). e59188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059188>
113. Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg, G.V. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction // Molecular Plant-Microbe Interactions Journal. 2004. V. 17. № 1. P. 6–15.
114. Kurosawa E. Experimental studies on the nature of the substance secreted by the «bakanae» fungus // Nat. Hist. Soc. Formosa. 1926. V. 16. P. 213–227.

115. Kwak M.J., Jeong H., Madhaiyan M., Lee Y., Sa T.M., Oh T.K., Kim J.F. Genome information of *Methylobacterium oryzae*, a plant-probiotic methylotroph in the phyllosphere // PLoS ONE. 2014. V. 9. e106704.
116. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. №. 5259. P. 680–685.
117. Lai D.W., Mao Y., Zhou H., Li F., Wu M., Zhang J., He Z., Cui W., Xie Y. Endogenous hydrogen sulfide enhances salt tolerance by coupling the reestablishment of redox homeostasis and preventing salt-induced K⁺ loss in seedlings of *Medicago sativa* // Plant Sci. 2014. V. 225. P. 117–129.
118. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I. M., Wilm A. Lopez R. Clustal W and Clustal X version 2.0 // Bioinformatics. 2007. V. 23. №. 21. P. 2947–2948.
119. Lee H.S., Madhaiyan M., Kim C.W., Choi S.J., Chung K.Y., Sa T.M. Physiological enhancement of early growth of rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by production of phytohormone of N₂-fixing methylotrophic isolates // Biology and Fertility of Soils. 2006. V. 42. №. 5. P. 402–408.
120. Lee K.H., Madhaiyan M., Poonguzhali S., Kang B.G., Lee Y.-J., Chung J.-B., Sa T.-M. Effect of co-inoculation of methylotrophic *Methylobacterium oryzae* with *Azospirillum brasilense* and *Burkholderia pyrrocinia* on the growth and nutrient uptake of tomato, red pepper and rice // Plant Soil. 2010. V. 328. P. 71–82.
121. Leonard P.M., Smits S.H., Sedelnikova S.E., Brinkman A.B., de Vos W.M., van der Oost J., Rafferty J.B. Crystal structure of the Lrp-like transcriptional regulator from the archaeon *Pyrococcus furiosus* // The EMBO journal. 2001. V. 20. №. 5. P. 990–997.
122. Li S.P., Hu K.D., Hu L.Y., Li Y.H., Jiang A.M., Xiao F., Han Y., Liu Y.S., Zhang H. Hydrogen sulfide alleviates postharvest senescence of broccoli by modulating antioxidant defense and senescence-related gene expression // J. Agric. Food Chem. 2014. V. 62. P. 1119–1129.
123. Li Z.G. Hydrogen sulfide: a multifunctional gaseous molecule in plants // Russ. J. Plant Physiol. 2013. V. 60. P. 733–740.
124. Li Z.G., Zhu L.P. Hydrogen sulfide donor sodium hydrosulfide-induced accumulation of betaine is involved in the acquisition of heat tolerance in maize seedlings // Braz. J. Bot. 2014, DOI 10.1007/s40415-014-0106-x
125. Lidstrom M.E. Aerobic methylotrophic prokaryotes // The prokaryotes. Springer New York, 2006. P. 618–634.
126. Lidstrom M., Balows A., Truper H., Dworkin M., Harder W., Schleifer K. The aerobic methylotrophic bacteria // The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, 1992. V. I. P. 431–445.

127. Lisjak M., Teklic T., Wilson I.D., Whiteman M., Hancock J.T. Hydrogen sulfide: environmental factor or signalling molecule? // *Plant Cell Environ.* 2013. V. 36. P. 1607–1616.
128. Liu C.H. Wang, S.A., Ruszczycky, M.W., Chen H., Li K., Murakami K., & Liu, H.W. Studies of 1-Amino-2, 2-difluorocyclopropane-1-carboxylic Acid: Mechanism of Decomposition and Inhibition of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid Deaminase // *Organic letters.* 2015. V. 17. №. 13. P. 3342 – 3345.
129. Loganathan P. Myung H., Muthusamy G., Lee K.J., Seralathan K.K., Oh B.T. Effect of heavy metals on *acdS* gene expression in *Herbas pirillium* sp. GW103 isolated from rhizosphere soil // *Journal of basic microbiology.* 2015. T. 55. №. 10. C. 1232–1238.
130. Long R., Morris R., Polacco J. Cytokinin production by plant-associated methylotrophic bacteria // *The Amer. Soc. Plant Physiol.* 1997. Abstr. № 1168.
131. Lynch J.M., Whipps J.M. Substrate flow in the rhizosphere // *Plant and soil.* 1990. V. 129. № 1. P. 1–10.
132. Ma W., Charles T.C., Glick B.R. Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa // *Applied and Environmental Microbiology.* 2004. V. 70. №. 10. P. 5891–5897.
133. Ma W., Guinel F.C., Glick B.R. *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase promotes nodulation of pea plants // *Applied and Environmental Microbiology.* 2003. V. 69. №. 8. P. 4396–4402.
134. MacMillan J., Suter P.J. The occurrence of gibberellin A₁ in higher plants-isolation from the seed of runner bean (*Phaseolus multiflorus*) // *Natur. wissen schaften.* 1958. V. 45. P. 46.
135. Madhaiyan M., Poonguzhali S., Kwon S.W., Sa T.M. *Methylobacterium phyllosphaerae* sp. nov., a pink-pigmented, facultative methylotroph from the phyllosphere of rice // *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 2009. V. 59. №. 1. P. 22–27.
136. Madhaiyan M., Poonguzhali S., Sa T. Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase containing *Methylobacterium oryzae* and interactions with auxins and ACC regulation of ethylene in canola (*Brassica campestris*) // *Planta.* 2007. V 226. № 4. P. 867–876.
137. Madhaiyan M., Poonguzhali S., Senthilkumar M., Lee J.-S., Lee K.-C. *Methylobacterium gossipiicola* sp. nov., a pink pigmented, facultatively methylotrophic bacterium isolated from the cotton phyllosphere // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2012. V. 62. № 1. P. 162–167.
138. Madhaiyan M., Poonguzhali S., Senthilkumar M., Seshadri S., Chung H., Yang J., Sundaram S., Sa T. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co-47 (*Oryza sativa* L.) by *Methylobacterium* spp. // *Bot. Bull. Acad. Sin.* 2004. V. 45. № 2. P. 315–324.

139. Madhaiyan M., Poonguzhali S., Sundaram S., Sa T. A new insight into foliar applied methanol influencing phylloplane methylotrophic dynamics and growth promotion of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) // Environ. Exp. Bot. 2006a. V. 57. P. 168–176.
140. Madhaiyan M., Suresh Reddy B.V., Anandham R., Senthikumar M., Poonguzhali S., Sundaram S., Sa T. Plant growth promoting *Methylobacterium* induces defense responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared with rot pathogens // Curr. Microbiol. 2006b. V. 53. P. 270–276.
141. Manulis S., Haviv-Chesner A., Brandl M.T., Lindow S.E., Barash I. Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophila* // Molecular Plant-Microbe Interactions. 1998 V. 11 №7. P. 634–642.
142. Martínez C., Espinosa-Ruiz A., Prat S. Gibberellins and plant vegetative growth. // Annu. Plant. Rev. 2016. V. 49. P. 285–322.
143. Marx C. J., Lidstrom M. E. Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other Gram-negative bacteria // Microbiology. 2001. V. 147. №. 8. P. 2065–2075.
144. McDonnell L., Plett J.M., Andersson-Gunneras S., Kozela C., Dugardeyn J., Van Der Straeten D., Glick B.R., Sundberg B., Regan S. Ethylene levels are regulated by plant encoded 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase // Physiol. Plant. 2009. V. 136. P. 94–109.
145. McDonnell L., Plett J.M., Andersson-Gunnerås S., Kozela C., Dugardeyn J., Van Der Straeten D., Glick B.R. Ethylene levels are regulated by a plant encoded 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase // Physiologia plantarum. 2009. V. 136. №. 1. P. 94–109.
146. Meena K.K., Kumar M., Kalyuzhnaya M.G., Yandigeri M.S., Singh D.P., Saxena A.K., Arora D.K. Epiphytic pink-pigmented methylotrophic bacteria enhance germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*) by producing phytohormone // Antonie Van Leeuwenhoek. 2012. V. 101. P. 777–786.
147. Miller C.O., Skoog F., Okumura F.S., Von Saltza M.H. Strong F. Structure and synthesis of kinetin1. // J. Am. Chem. Soc. 1955. V. 77. P. 2662–2663.
148. Minguet E.G., Alabadí D., Blázquez M.A. Gibberellin implication in plant growth and stress responses. // Phytohormones: a window to metabolism, signaling and biotechnological applications. Springer. New York. 2014. P. 119–161.
149. Moosvi S.A., McDonald I.R., Pearce D.A., Kelly D.P., Wood A.P. Molecular detection and isolation from Antarctica of methylotrophic bacteria able to grow with methylated sulfur compounds // Syst. Appl. Microbiol. 2005. V. 28. P. 541–554.
150. Müller, D.B., Vogel, C., Bai Y., Vorholt J.A. The plant microbiota: systems-level insights and perspectives // Annual Review of genetics. 2016. V. 50. P. 211–234.
151. Murrell J, McDonald I. Methylotrophy // Encyclopedia of microbiology. 2000. V 3. P. 245–255.

152. Nagasawa T., Ishii T., Kumagai H. Yamada H. D-cysteine desulfhydrase of *Escherichia coli* // The FEBS Journal. 1985. V. 153. №. 3. P. 541–551.
153. Nalayani P., Anandham R., Raj S.P., Chidambaram P. Pink pigmented facultative methylotrophic bacteria (PPFMB) – a potential bioinoculant for cotton nutrition // Cotton Res. J. 2014. V. 6. P. 50–53.
154. Nascimento F.X., Rossi M.J., Soares C.R., McConkey B.J., Glick, B.R. New insights into 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase phylogeny, evolution and ecological significance // PLoS One. 2014. V. 9. №. 6. e99168.
155. Nawaz M., Mabubu J.I., Hua H. Current status and advancement of biopesticides: Microbial and botanical pesticides // Journal of Entomology and Zoology Studies. 2016. V. 4. №. 2. P. 241–246.
156. Nelson S.K., Steber C.M. Gibberellin hormone signal perception: down-regulating DELLA repressors of plant growth and development // Annu. Plant. Rev. 2016. V. 49. P. 153–188.
157. Nemecek-Marshall, M., MacDonald, R.C., Franzen, J.J., Wojciechowski, C.L., Fall R. Methanol emission from leaves (enzymatic detection of gas-phase methanol and relation of methanol fluxes to stomatal conductance and leaf development) // Plant Physiology. 1995. V. 108. №. 4. P. 1359–1368.
158. Neumann K.-H., Kumar A., Jafargholi I. Plant cell and tissue culture – a tool in biotechnology, principles and practice // Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2009. P. 227–233.
159. Nikolic B., Schwab H., Sessitsch A. Metagenomic analysis of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene (*acdS*) operon of an uncultured bacterial endophyte colonizing *Solanum tuberosum* L // Archives of microbiology. 2011. V. 193. №. 9. P. 665–676.
160. Nováková R., Ševčíková B., Kormanec J. A method for the identification of promoters recognized by RNA polymerase containing a particular sigma factor: cloning of a developmentally regulated promoter and corresponding gene directed by the *Streptomyces aureofaciens* sigma factor RpoZ // Gene. 1998. V. 208. №. 1. P. 43–50.
161. Nukui N., Minamisawa K., Ayabe S.I., Aoki T. Expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase gene requires symbiotic nitrogen-fixing regulator gene *nifA2* in *Mesorhizobium loti* MAFF303099 // Applied and environmental microbiology. 2006. V. 72. №. 7. P. 4964–4969.
162. O’Brien J.A., Benkova E. Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. P. 451.
163. Olanrewaju O.S., Glick BR., Babalola O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2017.V. 33. №. 11. P. 197.
164. Omer Z.S., Tombolini R., Gerhardson B. Plant colonization by pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria PPFMs // FEMS Microbiol. Ecology. 2004. V. 47. №. 3. P. 319–326.

165. Oxender D.L., Quay S.C. Regulation of leucine transport and binding proteins in *Escherichia coli* // Journal of cellular physiology. 1976. V. 89. №. 4. P. 517–521.
166. Papenbrock J., Riemenschneider A., Kamp A., Schulz-Vogt H.N., Schmidt A. Characterization of cysteine-degrading and H₂S-releasing enzymes of higher plants-from the field to the test tube and back // Plant Biology. 2007. V. 9. № 5. P. 582–588.
167. Patten C.L., Glick B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid // Can. J. Microbiol. 1996. V. 42. P. 207–220.
168. Peel B.D., Quayle J.R. Microbial growth on C₁ compounds. Isolation and characterization of *Pseudomonas* AM1 // Biochem. J. 1961. V. 81. P. 465–469.
169. Piccoli P., Bottini R. Metabolism of 17,17-[2H₂] gibberellins A₂₀ to 17,17-[2H₂] gibberellin A₁ by *Azospirillum lipoferum* cultures // AgriScientia. 1994. V. XI. P. 13–15.
170. Pirttilä A.M., Laukkanen H., Pospiech H., Myllylä R., Hohtola A. Detection of intracellular bacteria in the buds of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization // Applied and Environmental Microbiology. 2000. V. 66. №. 7. P. 3073–3077.
171. Pohjanen J., Koskimäki J.J., Sutela S., Ardanov P., Suorsa M., Niemi K., Sarjala T., Häggman H., Pirttilä A.M. Interaction with ectomycorrhizal fungi and endophytic *Methylobacterium* affects nutrient uptake and growth of pine seedlings *in vitro* // Tree Physiol. 2014. V. 34. № 9. P. 993–1005.
172. Poonguzhali S., Madhaiyan M., Yim W.J., Kim K.A., Sa T.M. Colonization pattern of plant root and leaf surfaces visualized by use of green-fluorescent marked strain of *Methylobacterium suomiense* and its persistence in rhizosphere // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. V. 78. P. 1033–1043.
173. Prayitno J., Rolfe B. R. Mathesius U. The ethylene-insensitive sickle mutant of *Medicago truncatula* shows altered auxin transport regulation during nodulation // Plant Physiology 2006. V. 142. № 1. P. 168–180.
174. Prigent-Combaret C., Blaha D., Pothier J.F. Vial, L., Poirier M.A., Wisniewski-Dyé F., Moënnelocoz, Y. Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucine-responsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other Proteobacteria // FEMS microbiology ecology. 2008. V. 65. №. 2. P. 202–219.
175. Prinsen E., Costacurta A., Michiels K., Vanderleyden J., Van Onckelen H. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway // Molecular Plant Microbe Interactions. 1993. V. 6. P. 609–609.
176. Redford A.J., Bowers R.M., Knight R., Linhart Y., Fierer N. The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves // Environmental microbiology. 2010. V. 12. №. 11. P. 2885–2893.

177. Reinhold-Hurek B., Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes // *Current opinion in plant biology*. 2011. V. 14. № 4. P. 435–443.
178. Rennenberg H. The fate excess of sulfur in higher plants // *Annu. Rev. PlantPhysiol*. 1984. V. 35. P. 121–153.
179. Rezuchova B., Kormanec J. A two-plasmid system for identification of promoters recognized by RNA polymerase containing extracytoplasmic stress response σ E in *Escherichia coli* // *Journal of microbiological methods*. 2001. V. 45. № 2. P. 103–111.
180. Riemenschneider A., Wegele R., Schmidt A., Papenbrock J. Isolation and characterization of a D-cysteine desulphydrase protein from *Arabidopsis thaliana* // *The FEBS journal*. 2005. V. 272. № 5. P. 1291–1304.
181. Sakakibara H. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation // *Annu. Rev. Plant. Biol*. 2006. V. 57. P. 431–449.
182. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. third // Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
183. Sarwar M. Microbial insecticides-an ecofriendly effective line of attack for insect pests management // *International Journal of Engineering and Advanced Research Technology*. 2015. V. 1 № 2. P. 4–9.
184. Schaefer J.K., Goodwin K.D., McDonald I.R., Murrell J.C., Oremland R.S. *Leisingera methylohalidivorans* gen. nov., sp. nov., a marine methylotroph that grows on methyl bromide // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 2002. V. 52. P. 851–859.
185. Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G., Pühler, A. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum* // *Gene*. 1994. V. 145. № 1. P. 69–73.
186. Schäfer M., Brütting C., Meza-Canales I.D., Großkinsky D.K., Vankova R., Baldwin I.T., Meldau S. The role of cis-zeatin-type cytokinins in plant growth regulation and mediating responses to environmental interactions. // *J. Exp. Bot*. 2015 V. 66. P. 4873–4884.
187. Seshasayee A.S.N., Luscombe N.M. Small-molecule-mediated Signalling in Bacteria // *Bacterial Gene Regulation and Transcriptional Networks*. 2013. P. 83.
188. Ševčíková H., Erb T. J., Fuchs G., Methanol assimilation in *Methylobacterium extorquens* AM1: demonstration of allenzymes and their regulation // *PLoS ONE*. 2010. V. 5. № 10.
189. Sheng F., Xia J.J. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria // *Chemosphere*. 2006. V. 64. P. 1036–1042.

190. Shimada T., Saito N., Maeda M., Tanaka K., Ishihama A. Expanded roles of leucine-responsive regulatory protein in transcription regulation of the *Escherichia coli* genome: Genomic SELEX screening of the regulation targets // *Microbial Genomics*. 2015. V. 1. № 1.
191. Shishkina V.N., Trotsenko Y.A. Multiple enzymic lesions in obligate methanotrophic bacteria // *FEMS microbiology letters*. 1982. V. 13. №. 3. P. 237–242.
192. Simon R., Priefer U., Pühler A. A broad host range mobilization system for invivo genetic-engineering-transposon mutagenesis in gram-negative bacteria // *Bio-technology*. 1983 V. 1. № 9.
193. Singh R.P., Shelke G.M., Kumar A., Jha P.N. Biochemistry and genetics of ACC deaminase: A weapon to «stress ethylene» produced in plants // *Frontiers in Microbiology*. 2015. V. 6.
194. Someya T., Nonaka S., Nakamura K., Ezura H. Increased 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity enhances *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene delivery into plant cells // *Microbiologyopen*. 2013. V. 2. №. 5. P. 873–880.
195. Soutourina J., Blanquet S., Plateau P. Role of D-cysteine desulphydrase in the adaptation of *Escherichia coli* to D-cysteine // *Journal of Biological Chemistry*. 2001. V. 276. №. 44. P. 40864–40872.
196. Spaepen S., Vanderleyden J. Auxin and plant-microbe interactions // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011. V. № 4 3: a001438.
197. Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling // *FEMS Microbiol. Rev.* 2007. V. 31. P. 425–448.
198. Strøm T., Ferenci T., Quayle J. R. The carbon assimilation pathways of *Methylococcus capsulatus*, *Pseudomonas methanica* and *Methylosinus trichosporium* (OB3B) during growth on methane // *Biochemical Journal*. 1974. V. 144. №. 3. P. 465–476.
199. Sun Y., Cheng Z., Glick B.R. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutation alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* // *PsJN. FEMS microbiology letters*. 2009. V. 296. № 1. P. 131–136.
200. Sy A., Giraud E, Jourand P, Garcia N., Willems A., De Lajudie P., Prin Y., Neyra M., Gillis M., Boivin-Masson C. Methylo-trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes // *Journal of bacteriology*. 2001. V. 183 № 1. P. 214–220.
201. Sy, A., Timmers A.C., Knief C., Vorholt J.A. Methylo-trophic metabolism is advantageous for *Methylobacterium extorquens* during colonization of *Medicago truncatula* under competitive conditions // *Applied and environmental microbiology*. 2005. V. 71. № 11. P. 7245–7252.
202. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 // *Molecular biology and evolution*. 2013. V. 30. №. 12. P. 2725–2729.
203. Todorovic B., Glick B.R. The interconversion of ACC deaminase and D-cysteine desulphydrase by directed mutagenesis // *Planta*. 2008. V. 229. №. 1. P. 193–205.

204. Trotsenko Y.A., Murrell J.C. Metabolic Aspects of Aerobic Obligate Methanotrophy // Advances in applied microbiology. 2008. V. 63. P. 183–229.
205. Tully R.E., van Berkum P., Lovins K.W., Keister D.L. Identification and sequencing of a cytochrome P450 gene cluster from *Bradyrhizobium japonicum* // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1398. P. 243–255.
206. Uchiumi T., Ohwada T., Itakura M., Mitsui H., Nukui N., Dawadi P., Saeki, K. Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome // Journal of bacteriology. 2004. V. 186. №. 8. P. 2439–2448.
207. Van de Poel B., Van Der Straeten D. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene! // Frontiers in plant science. 2014. V. 5.
208. Vera-Sirera F., Gomez M.D., Perez-Amador M.A. DELLA-proteins, a group of GRAS transcription regulators, mediate gibberellin signaling. In DH Gonzalez, Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects // Academic Press, San Diego, 2015. P. 313-328.
209. Vorholt J.A. Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylotrophic bacteria // Arch. Microbiol. 2002. V. 178. P. 239–249.
210. Vorholt J.A. Microbial life in the phyllosphere // Nat. Rev. Microbiol. 2012. V. 10. № 12. P. 828 – 840.
211. Walsh C., Pascal Jr. R.A., Johnston M., Raines R., Dikshit D., Krantz A., Honma, M.I. Mechanistic studies on the pyridoxal phosphate enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas* sp. // Biochemistry. 1981. V. 20. №. 26. P. 7509–7519.
212. Wang G.-L., Que F., Xu Z.-S., Wang F., Xiong A.-S. Exogenous gibberellin altered morphology, anatomic and transcriptional regulatory networks of hormones in carrot root and shoot. // BMC plant biol. 2015.V. 15. № 1. P. 290.
213. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed // Physiol. Rev. 2012. V. 92. P. 791–896.
214. Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed // Physiol. Rev. 2012. V. 92. P. 791–896.
215. Wani S. H., Kumar V., Shriram V., Kumar S.S. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants // Crop J. 2016. V. 4. P. 162–176.
216. Whipps J., Hand P., Pink D., Bending G.D. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype // Journal of Applied Microbiology. 2008. V. 105. №. 6. P. 1744–1755.
217. Xu J., Li X-L., Luo L. Effects of engineered *Sinorhizobium meliloti* on cytokinin synthesis and tolerance of alfalfa to extreme drought stress // Appl. Environ. Microbiol. 2012 V. 78. P. 8056–8061.

218. Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation // *Annu. Rev. Plant. Biol.* 2008. V. 59. P. 225–251.
219. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors // *Gene*. 1985. V. 33. №. 1. P. 103–119.
220. Yim W., Seshadri S., Kim K., Lee G., Sa T. Ethylene emission and PR protein synthesis in ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. inoculated tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) challenged with *Ralstonia solanacearum* under greenhouse conditions // *Plant Physiol. Biochem.* 2013. V. 67. P. 95–104.
221. Yim W., Woo S., Kim K., Sa T. Regulation of ethylene emission in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and red pepper (*Capsicum annuum* L.) inoculated with ACC deaminase producing *Methylobacterium* spp. // *Korean J. Soil SciFert.* 2012. V. 45. P. 37–42.
222. You Y-H., Yoon H.; Kang S.-M., Shin J.-H., Choo Y.-S., Lee I.-J., Lee J.-M., Kim J.-G., Fungal diversity and plant growth promotion of endophytic fungi from six halophytes in Suncheon Bay // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 22. P. 1549–1556.
223. Zaichko N.V., Melnik A.V., Yoltukhivskyy M.M., Olhov-skiy A.S., Palamarchuk I.V. Hydrogen sulfide: me-tabolism, biological and medical role // *Ukr. Bio-chem. J.* 2014. V. 86. № 5. P. 5–25.
224. Zaidi A., Ahmad E., Khan M.S., Saif S., Rizvi A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: current perspective // *Sci Horti* 2015. V. 193. P. 231–239.
225. Zhang H., Hu L.Y., Li P., Hu K.D., Jiang C.X., Luo J.P. Hydrogen sulfide alleviated chromium toxicity in wheat // *Biol. Plant.* 2010. V. 54. P. 743–747.
226. Zhang W., Zhang T., Wu S., Wu M., Xin F., Dong W., Ma J., Zhang M., Jiang M. Guidance for engineering of synthetic methylotrophy based on methanol metabolism in methylotrophy // *RSC Adv.* 2017. V. 7. P. 4083–4091.