

КЛОНИРОВАНИЕ, СЕКВЕНИРОВАНИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ АННОТАЦИЯ HRP'-DSP-КЛАСТЕРА ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *ATROSEPTICA*

Л.Н. Валентович, А.Н. Евтушенко, Е.А. Николайчик

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Введение.

Erwinia carotovora subsp. *atroseptica* (*Eca*) – граммотрицательные бактерии, являющиеся специализированным патогеном картофеля в регионах с умеренным климатом. Многие фитопатогены, в том числе и бактерии рода *Erwinia* (а именно, *E. amylovora*) способны индуцировать реакцию гиперчувствительности (РГ) у различных растений и эта способность зависит от работы системы секреции III типа (ССТТ) [1]. У фитопатогенов ССТТ кодируется генами *hrp* (hypersensitive response and pathogenicity) и *hrc* (hrp conserved), которые вовлечены и в развитие заболевания, и в индукцию защитных реакций растения. Поскольку основной функцией ССТТ патогенных бактерий является транспорт эффекторных белков в клетки эукариотических хозяев [2], логично предположить, что и индукция РГ бактериями *Erwinia* зависит от транспорта одного или нескольких эффекторных белков (в данном случае белков авирулентности) в клетки растений посредством ССТТ.

В 2004 году была опубликована полная нуклеотидная последовательность генома одного из штаммов *Eca* – SCRI 1043, изолированного в Шотландии [3], что дало возможность использовать методы биоинформатики для поиска белков авирулентности. Поиск в геноме *Eca* SCRI 1043 гомологов известных на данный момент эффекторных белков ССТТ фитопатогенных бактерий позволил выявить только одного потенциального кандидата на роль транспортируемого в клетки растений эффектора. Белковый продукт гена *dspE* (локус ECA2113) штамма SCRI1043 имеет сходство с AvtE *P. syringae*, типичным Avt-белком, необходимым для индукции реакции гиперчувствительности, а также с белком DspE – основным фактором вирулентности *Erwinia amylovora*, секреция которого в культуральную среду (но не транслокация в клетки растений) была ранее показана [4]. Также в 2004 году было обнаружено, что инактивация гена *dspE* снижает вирулентность штамма *Eca* SCRI1039 [5].

Наличие гена *dspE* в геноме *Eca* штамма 3-2 было показано методом ПЦР и доказано, что он действительно является эффекторным белком ССТТ *Eca* [6]. В продолжение исследований, целью данной работы было установление молекулярно-генетической организации *dspE*-оперона и близлежащих локусов на хромосоме бактерий *Eca* штамма 3-2.

Методы исследования

Использованные в работе штаммы бактерий и плазмиды приведены в таблице 1. Бактерии выращивались в полноценной питательной среде (LB) при 37°C (*E. coli*) и 28°C (*Eca*). Все штаммы *Eca* являются производными изолированного в Беларуси штамма дикого типа 3-2.

Коммерческие препараты антибиотиков использовались в концентрациях (мкг/мл): ампициллин 50; рифампицин 25, стрептомицин 20, канамицин 15.

Электротрансформация клеток *E. coli* и *Eca*, а также выделение плазмидной и хромосомной ДНК из клеток бактерий выполнялись в соответствии со стандартными протоколами [12]. В данной работе были использованы ферменты и буферные системы фирм MBI Fermentas, New England Biolabs. Рестрикция, лигирование, дефосфорилирование ДНК, а также достраивание липких концов ДНК проводилось согласно протоколам фирм производителей [13, 14]. Амплификацию ДНК проводили методом полимеразной цепной реакции [12] с использованием программируемого термостата GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems). Для проведения секвенирующих реакций применяли набор реактивов

AutoRead Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) или CycleReader™ Auto DNA Sequencing Kit (MBI Fermentas) и следовали протоколам фирм производителей [13]. Анализ результатов полученной нуклеотидной последовательности проводили с помощью программного пакета ALFwin.

Таблица 1 – Штаммы и плазмиды

Штаммы	Характеристика	Источник/ссылка
<i>Escherichia coli</i>		
XL-1 Blue	F':::Tn10 <i>proA+B+ lacZΔM15/ recA1 endA1 gyrA96</i>	Stratagene
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>		
JN42	3-2 Rif ^r , Cm ^r (Tn9)	Коллекция кафедры микробиологии БГУ
VKE	JN42 <i>dspE</i> ::pJP5603	[6]
HW1	JN42 <i>dspF</i> ::Ω ^{Sp/Sm}	[7]
Плазмиды		
pK18	Km ^r <i>lacZα oriV_{ColE1}</i>	[8]
pFLAG-CTC	P _{tac} -RBS-MCS-FLAG <i>lacI^q Ap^r oriV_{ColE1}</i>	Sigma
pBluescript II KS	Ap ^r <i>lacZα oriV_{ColE1}</i>	Stratagene
pUC18/ pUC19	Ap ^r <i>lacZα oriV_{ColE1}</i>	[9]
pJP5603	Km ^r <i>lacZ'α, oriT_{RP4}, oriV_{R6K}</i>	[10]
pUC19::177JN	pUC19 со вставкой <i>NdeI-EcoRI</i> ПЦР-фрагмента <i>dspE</i> (487 н.п.), амплифицированного с праймерами <i>dspE1</i> и <i>dspE3</i>	Получена в этой работе
pBWB	pJP5603 со вставкой участка хромосомной ДНК штамма VKE, ограниченный сайтами для рестриктазы <i>ClaI</i> , содержащий фрагменты генов <i>hrpW</i> и <i>dspE</i>	Получена в этой работе
pBWN	pJP5603 со вставкой участка хромосомной ДНК штамма VKE, ограниченный сайтами для рестриктазы <i>NheI</i> , содержащий фрагменты генов <i>hrpW</i> и <i>dspE</i>	Получена в этой работе
pVLX1	pUC18 со вставкой <i>XbaI</i> фрагмента хромосомной ДНК штамма HW1, содержащего Ω ^{Sp/Sm} и 23 т.н.п. фрагмент <i>hrp</i> -кластера.	[11]

Поиск в нуклеотидных и белковых базах данных NCBI осуществляли с помощью программы BLASTP [15]. Для детекции слабого сходства белковых последовательностей применялся программный пакет FASTA3 [16]. Анализ свойств белковых последовательностей осуществляли с помощью программы InterProScan (Version 4.4) [17]. Поиск промоторных последовательностей для основного сигма-фактора σ^{70} проводили с помощью программы BPROM (Softberry Inc.) [18]. Субклеточную локализацию белков анализировали с помощью программы ProtComp Version 8.0 (Softberry Inc.) [19]. Поиск терминаторных структур в нуклеотидных последовательностях осуществляли с помощью программы FindTerm Version 2.8 (Softberry Inc.) [20]. Для предсказания вторичной структуры белка использовали программу GOR4 [21]. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с помощью алгоритма Нидельмана-Вунша [22], реализованного в программе ArE 1.16 [23].

Результаты и обсуждение

С целью изучения молекулярной организации *dspE*-оперона клонировали несколько соответствующих перекрывающихся фрагментов хромосомной ДНК *Eca*, а также определили их нуклеотидные последовательности.

При клонировании были применены следующие подходы:

– амплификация методом ПЦР с помощью специально рассчитанных праймеров фрагментов хромосомной ДНК *Eca* 3-2 и клонирование их в векторе pUC18/19.

– рестрикция хромосомной ДНК из клеток мутантов *Eca* (HW1, VKE), содержащей маркерные гены ($\Omega^{Sp/Sm}$, *kan* (pJP5603)) вблизи *dspE* или непосредственно в этом гене, лигирование фрагментов с pUC18/19 (или pK18, pBluescript II KS), и последующий отбор клонов с плазмидами (pBWB, pBWN, pVLX1), несущими маркерные гены. В дальнейшем был осуществлен ряд субклонирований, позволивший получить более десятка плазмид с различными фрагментами исследуемого локуса (рисунок 1) и секвенировать область хромосомной ДНК протяженностью около 8,5 т.н.п.

Полученная нуклеотидная последовательность *hrp'*-*dsp*-кластера *Eca* на 85% совпадает с последовательностью штамма SCRI1043, что позволило использовать ранее аннотированную последовательность шотландского штамма как шаблон для реконструкции *hrp'*-*dsp*-кластера *Eca* 3-2.

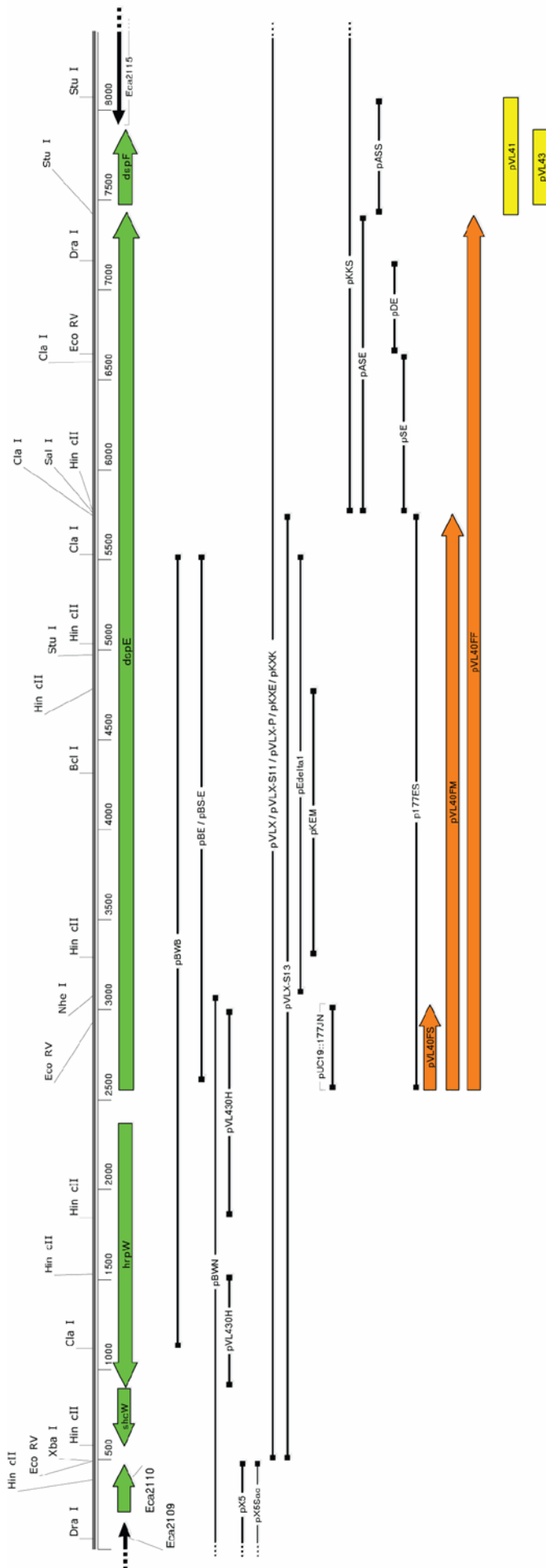
Исследуемый фрагмент ДНК содержит 55% G+C пар – существенно выше, чем в среднем для генома *Eca* SCRI1043 (50,97% [3]) и секвенированных в нашей лаборатории фрагментов генома *Eca* 3-2 протяженностью около 50 т.н.п. (51%), что указывает на возможное расположение *hrp'*-*dsp*-кластера в пределах «острова патогенности» [24].

В дальнейшем в пределах полученной нуклеотидной последовательности был проведен поиск возможных кодирующих белки открытых рамок считывания (ОРС). Выявленные ОРС были сопоставлены с аннотированными локусами штамма SCRI1043 и названы так же, как и соответствующие им гомологи (с нижним индексом, соответствующим названию штамма) – *Eca*2109₃₋₂, *Eca*2110₃₋₂, *Eca*2111₃₋₂ (*shcW*₃₋₂), *hrpW*₃₋₂, *dspE*₃₋₂, *dspF*₃₋₂, *Eca*2115₃₋₂ (рисунок 1).

ОРС *Eca*2110₃₋₂. Перед ОРС *Eca*2110₃₋₂ есть сайт связывания рибосом (AGGAGG), в положении -8 до старт кодона, которая отличается от канонической только одним нуклеотидом – AGAAGG. Перед ОРС не удалось обнаружить никакой промоторной последовательности, вероятно транскрипция данной рамки происходит в составе оперона с удаленного промотора. *Eca*2110₃₋₂ кодирует небольшой белок (88 а. о.) с расчетной молекулярной массой 8442,59 Да и pI 6,37. Идентичность аминокислотной последовательности в сравнении с *Eca*2110_{SCRI1043} составляет 92% – 81 из 88 а. о. При сравнении ОРС *Eca*2110₃₋₂ с белками организмов других видов удалось установить сходство с рядом предполагаемых продуктов ОРС из бактерий рода *Vibrio*, например с VF_1912 *Vibrio fischeri* ES114 (EMBLCDs:AAW86407, 94 а. о., идентичность 67% (63 из 94 а. о.)), а также *Photorhabdus luminescens* (plu1930 – идентичность 55% (52 из 94 а. о.)), *Aeromonas salmonicida* (ASA_1565 – идентичность 55% (51 из 92 а. о.)). Большинство найденных белков описаны как "гипотетический белок", и имеют в своем составе консервативный домен COG4104 с неизвестной функцией, который в основном характерен для протеобактерий [25].

С помощью программы InterProScan удалось обнаружить в структуре предполагаемого белка, кодируемого ОРС *Eca*2110₃₋₂, два PAAR мотива (22-51 а. о. и 52-81 а. о.). Данный мотив характерен для бактериальных мембранных белков, где он встречается парами. Также данный мотив обнаружен в виде триплетов или тандемных повторов у ряда гипотетических белков [26].

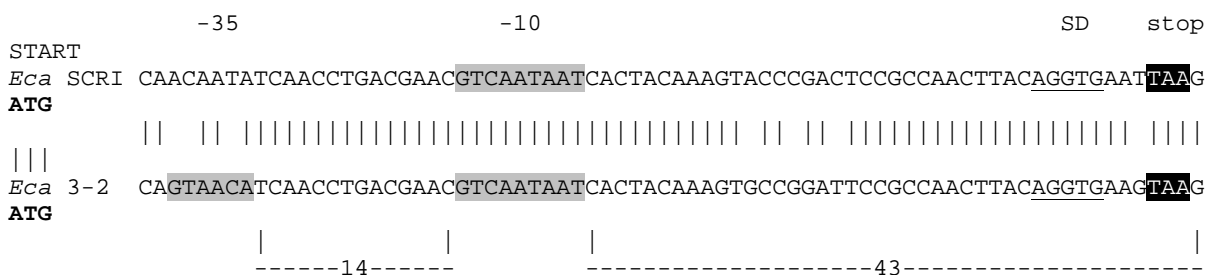
Стоит заметить, что предполагаемый белковый продукт ОРС *Eca*2110 богат глицином (18 а. о. – 20,45%), не содержит остатков ароматических аминокислот, содержит только один остаток цистеина и предположительно секретируется (по расчетам программы ProtComp Version 8), что частично напоминает свойства харпинов.



На рисунке отмечены значимые для клонирования и субклонирования рестрикционные сайты. Полностью секвенированные гены (ORF) отмечены стрелками зеленого цвета, частично секвенированные – стрелками черного цвета. Ниже отмечены плазмиды, которые несут соответствующие участки ДНК хромосомы *Eca* 3-2.

Рисунок 1 – Генетическая карта секвенированного локуса хромосомы *Eca* 3-2

ОРС Eca2111₃₋₂. Перед ОРС Eca2111₃₋₂ есть промоторные последовательности -10 и -35 для основного сигма-фактора σ^{70} и сайт связывания рибосом (SD) (рисунок 2), однако старт-кодон (ATG) ОРС Eca2111₃₋₂ следует непосредственно за стоп-кодonom гена *hrpW*₃₋₂, что подразумевает возможность сопряженной трансляции этих двух генов и, соответственно, транскрипции Eca2111₃₋₂ с промотора, предшествующего гену *hrpW*₃₋₂. Интересно, что в геноме *Eca* SCR11043 отсутствует консервативная -35 последовательность перед ОРС Eca2111_{SCR11043}, что говорит о менее вероятной транскрипции с данного промотора.



Перед старт-кодonom ATG обозначен стоп-кодон впереди идущего гена *hrpW*.
Рисунок 2 – Сравнение последовательностей ДНК из штаммов *Eca* SCR11043 (SCR1) и 3-2, предшествующей ОРС Eca2111

На расстоянии 28 н.п. после стоп-кодона ОРС Eca2111₃₋₂ (TAA) локализуется последовательность р-независимого терминатора (рисунок 3).

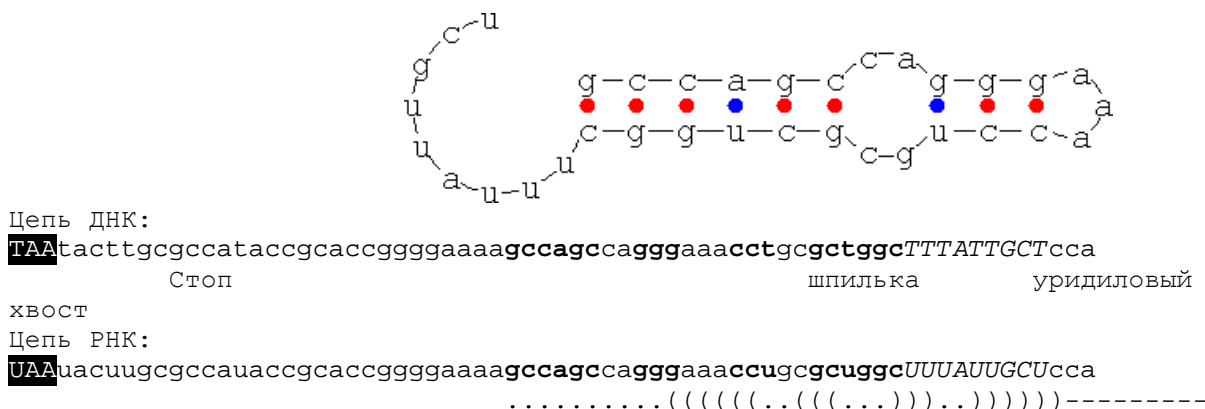
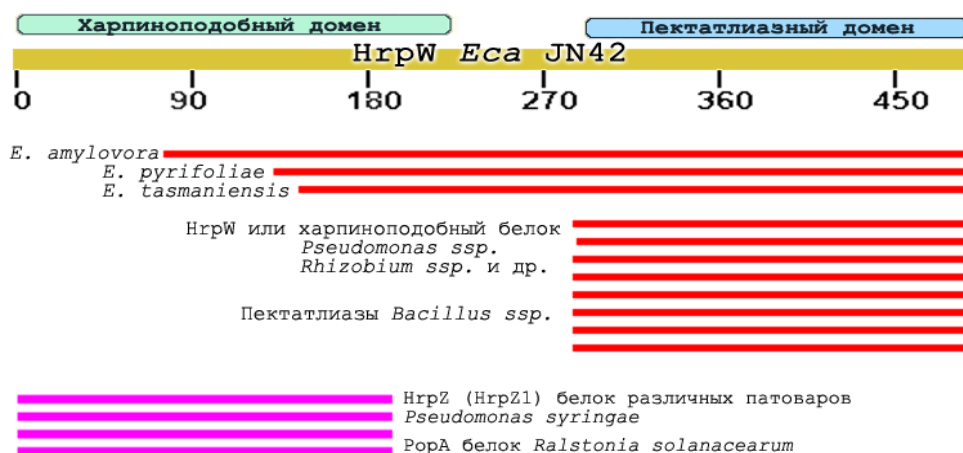


Рисунок 3 – Последовательность р-независимого терминатора у *Eca* 3-2, идущая после ОРС Eca2111₃₋₂ (по данным программы FindTerm)

ОРС Eca2111₃₋₂ кодирует небольшой белок (107 а. о.) с расчетной молекулярной массой 12,102 кДа и рI 6,39. Идентичность аминокислотной последовательности в сравнении с Eca2111_{SCR11043} составляет 85% – 91 из 107 а. о. При сравнении ОРС Eca2111₃₋₂ с белками организмов других видов выявлено сходство аминокислотной последовательности с предполагаемым продуктом ORFC из *Erwinia pyrifoliae* (EMBL: AAS45454; 110 а. о.; идентичность 43% (41 из 95 а. о.)), а также предполагаемым шапероном HrpW *Erwinia amylovora* (EMBL: AAF63401; 109 а. о.; идентичность 39% (39 из 100 а. о.)).

В аннотации к геному *Eca* SCR11043 указано, что локус Eca2111_{SCR11043} (EMBL: YP_050206) кодирует возможный шаперон HrpW [3]. Такому предположению соответствует то, что ОРС Eca2111₃₋₂ располагается сразу за геном *hrpW*₃₋₂, белковый продукт ОРС Eca2111₃₋₂ имеет молекулярный вес менее 16 кДа, богат лейцином (9,35% –

InterProScan как пектатлиазный домен [29] (рисунок 6). Анализ N-концевой последовательности позволяет выявить невысокую, но существенную степень сходства (27-32%) с харпинами HrpZ и HrpW различных патоваров *Pseudomonas syringae*, а также с харпинподобным белком PopA *Ralstonia solanacearum*. Интересно отметить, что HrpW обоих штаммов *Eca* имеет 50 дополнительных а. о. на самом N-конце белка по сравнению с HrpW из других бактерий, причем эти "дополнительные" аминокислотные остатки сохраняют некоторое сходство с HrpZ. Известно, что именно самый N-конец субстратов ССТТ кодирует сигнал, необходимый для их секреции (а зачастую и для транслокации в клетки эукариотического хозяина), за которым во многих случаях следует сайт связывания специфического секреторного шаперона, и, соответственно первые несколько десятков аминокислотных остатков субстратов ССТТ несут важнейшую смысловую нагрузку. Таким образом, харпинподобный домен белка HrpW бактерий *Eca*, возможно, имеет больше функционального сходства с HrpZ, чем с HrpW других бактерий.



Обозначена гомология с пектатлиазным доменом и харпиноподобным доменом, полосами показано сходство с белками HrpW, HrpZ и PopA из других бактерий, а также с пектатлиазами *Bacillus ssp.*

Рисунок 6 – Схематическое обозначение частей белка HrpW из *Eca* 3-2

В нашей лаборатории белок HrpW₃₋₂ был ранее частично очищен и экспериментально охарактеризован – было показано, что он термостабилен, способен секретироваться с помощью ССТТ и при инъекции в высокой концентрации в листья табака индуцирует реакцию гиперчувствительности [28]. Эти свойства, а также состав его аминокислотной последовательности (отсутствие остатков цистеина, много остатков глицина (17,76%), но мало ароматических кислот (2,65%), низкое значение pI (4,53)) делают этот белок типичным представителем класса харпинов. На настоящий момент это единственный из четырех известных нам субстратов ССТТ бактерий *Eca* 3-2, секрецию которого в культуральную среду удалось детектировать *in vitro*. Возможно, N-концевая элонгация этого белка на 50 а. о. у бактерий *Eca* (в сравнении с другими видами бактерий) способствует его эффективной секреции. Конкретная функция, которую белок HrpW выполняет при взаимодействии с растениями, не показана ни для одной бактерии из тех, у которых обнаружен этот белок. Инактивация гена *hrpW* у бактерий *Eca* 3-2 также не оказывает заметного влияния на их фенотип [7].

Ген *dspE*. Ген *dspE*₃₋₂ находится под контролем сигма-фактора HrpL, о чем свидетельствует наличие характерных -10 и -35 промоторных последовательностей и кодирует крупный белок (1627 а. о.) с расчетной молекулярной массой 173,41 кДа и pI 6,3. Идентичность аминокислотной последовательности в сравнении с DspE_{SCRI1043} составляет 89% – 1444 а. о. из 1618 а. о., причем следует заметить, что в начале белка DspE₃₋₂ присутствует последовательность из 17 а. о. (Ala-Pro-Arg-Ala-Pro-Arg-Asp-Ser-Leu-Ala-

Ser-Gly-Gly-Pro-Ile-Gln-Ser – 87-104 а. о. от начала), которая полностью отсутствует у DspE_{SCRI1043}.

При сравнении DspE₃₋₂ с белками организмов других видов удалось установить сходство с белком DspE из *Erwinia chrysanthemi* 3937 ([30]; 1625 а. о.; идентичность 41% (703 из 1676 а. о.)), а также с DspA/E из *Erwinia tasmaniensis* (EMBL: CA095588; 1811 а. о.; идентичность 40% (644 из 1590 а. о.)). Ряд сходных с DspE белков был выявлен у граммотрицательных фитопатогенных бактерий, а также у сапрофитной бактерии *P. fluorescens*, однако не удалось найти ни одного похожего белка у трех видов ксантомонад с известными геномными последовательностями, что означает отсутствие у них данного типа эффектора ССТТ.

Из литературных данных известно [31, 5, 32, 33], что почти все белки семейства AvrE/DspE играют важную роль во взаимоотношениях бактерий с растениями и часто являются факторами вирулентности. Все белки данного семейства имеют большой размер (от 154 кДа у *P. fluorescens* – до 198 кДа у *E. pyrifoliae*) и аминокислотную последовательность, лишенную какой-либо гомологии с изученными белками и мотивами, что существенно затрудняет функциональную характеристику этого белка. Ранее нами были получены данные о транслокации DspE из бактерий *Eca* в клетки табака, а также показана его необходимость для индукции реакции гиперчувствительности на ряде растений сем. *Solanaceae*, что позволило нам охарактеризовать этот белок как первый Avr-белок *E. carotovora* [6]. При взаимодействии с устойчивыми растениями помимо индукции локальной реакции гиперчувствительности DspE активирует также и системные защитные реакции [34], но при заражении растений-хозяев этот белок скорее всего является важным фактором вирулентности, способствующим успешному для патогена протеканию начальных стадий инфекции. В сопутствующей статье [35] мы приводим данные в пользу того, что при заражении клубней картофеля белок DspE₃₋₂ блокирует защитные реакции растения-хозяина, способствуя успешному инфицированию растения патогеном.

Ген *dspF*.

Расположенный непосредственно за *dspE*₃₋₂ ген *dspF*₃₋₂ кодирует белок (140 а. о.) с расчетной молекулярной массой 15,55 кДа и р I_{5,75}. Перед ОРС DspF₃₋₂ не удалось идентифицировать промоторную последовательность, однако был найден сайт связывания рибосом (AGGAG). Такая организация короткой (35 н.п.) области между генами *dspE*₃₋₂ и *dspF*₃₋₂ свидетельствует в пользу сопряженной транскрипции генов *dspE*₃₋₂ и *dspF*₃₋₂, осуществляемой с HrpL-зависимого промотора перед *dspE*₃₋₂, но независимой трансляции двух ОРС оперона *dspEF*.

Идентичность аминокислотных последовательностей белков DspF из бактерий *Eca* штаммов 3-2 и SCRI1043 составляет 87% – 122 из 140 а. о. Из белков других видов бактерий наибольшее сходство DspF₃₋₂ имеет с белком DspF из *Erwinia pyrifoliae* (EMBL: AAS45451; 139 а. о.; идентичность 46% (60 из 130 а. о.)), а также с Dsp В из *Erwinia amylovora* (EMBL: CAA74157; 139 а. о.; идентичность 45% (61 из 133 а. о.)). Большинство найденных белков описаны как «шаперон ССТТ». Роль субстратспецифических шаперонов в работе ССТТ к настоящему времени окончательно не выяснена, а наиболее часто приписываемыми им функциями являются стабилизация субстратов ССТТ и их направление на секрецию [36]. Нам не удалось установить влияния продукта DspF₃₋₂ на стабильность DspE₃₋₂, однако было показано негативное влияние повышенных доз гена *dspF* на секрецию DspE [11]. Таким образом, возможной функцией белка DspF является предотвращение преждевременной транслокации эффекторного белка DspE в клетки растений.

Выводы

Таким образом, биоинформационный и экспериментальный анализ *hrp'-dsp*-кластера бактерий *Eca* позволяет заключить, что исследуемый локус относится к «острову патогенности» и содержит гены субстратов системы секреции III типа и вспомогательных компонентов этого секреторного аппарата. Локус содержит дивергентно транскрибируемые опероны *dspEF* и *hrpWshcW*. Каждый оперон содержит протяженный ген потенциального эффектора, за которым следует небольшой ген, продукт которого, скорее всего, является специфичным для этого эффектора шапероном. Перед первым геном каждого оперона расположен HrpL-зависимый промотор, а внутренние промоторы не детектируются. Кроме того, расположение старт-кодона *shcW* непосредственно за стоп-кодоном *hrpW* свидетельствует о возможности сопряженной трансляции этих генов.

Список литературы

1. Gene for pathogenicity and ability to cause the hypersensitive reaction cloned from *Erwinia amylovora* / Walters K. [et al.] // *Physiological and molecular plant pathology* – 1990. – Vol. 36, № 6. – P. 509-521.
2. Cornelis, G. R. Type III secretion: a bacterial device for close combat with cells of their eukaryotic host / G.R. Cornelis // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* – 2000. – Vol. 355, № 1397. – P. 681-93.
3. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors / K.S. Bell [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2004. – Vol. 101, № 30. – P. 11105-10.
4. *Erwinia amylovora* secretes DspE, a pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the Hrp (type III secretion) pathway / A.J. Bogdanove [et al.] // *Journal of Bacteriology* – 1998. – Vol. 180, № 8. – P. 2244-7.
5. Use of a pooled transposon mutation grid to demonstrate roles in disease development for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* putative type III secreted effector (DspE/A) and helper (HrpN) proteins / M.C. Holeva [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* – 2004. – Vol. 17, № 9. – С. 943-50.
6. Белок DspE транслоцируется фитопатогенными бактериями *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в клетки *Nicotiana tabacum* и является необходимым для индукции реакции гиперчувствительности / Е. Николайчик [и др.] // *Доклады НАН Беларуси* – 2005. – Том. 49, № 5. – P. 81-85.
7. Анализ роли внеклеточных компонентов системы секреции III типа *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* в транслокации белковых факторов вирулентности бактерий в клетки растений / Е.А. Николайчик [и др.] // *Труды Белорусского государственного университета* – 2008. – Том. 2, – С. 200-213.
8. Pridmore, R. D. New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker / R.D. Pridmore // *Gene* – 1987. – Vol. 56, № 2-3. – P. 309-12.
9. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis / J. Norrander [et al.] // *Gene* – 1983. – Vol. 26, № 1. – P. 101-6.
10. Penfold, R. J. An improved suicide vector for construction of chromosomal insertion mutations in bacteria / R.J. Penfold, J.M. Pemberton // *Gene* – 1992. – Vol. 118, № 1. – P. 145-6.
11. Влияние дополнительных копий гена *dspF* *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* на транслокацию белков DspE-Сya и Av Pto-Сya в клетки растений и развитие реакции гиперчувствительности / Л.Н. Валентович [и др.] // *Труды Белорусского государственного университета* – 2008. – Том. 2, – С. 190-199.
12. Ausubel, F.M. *Current Protocols in Molecular Biology*, New York: John Wiley & Sons, Inc., 1994.
13. Support: Documents in PDF format [Электронный ресурс] / Fermentas. – 2009. – Режим доступа: <http://fermentas.com/techinfo/techinfo.pdf.htm#Catalog>. – Дата доступа: 25.01.2009.

14. New England Biolabs [Электронный ресурс] / New England Biolabs. – 2009. – Режим доступа: <http://www.neb.com/nebecomm/default.asp>. – Дата доступа: 26.01.2009.
15. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S.F. Altschul [et al.] // *Nucleic Acids Research* – 1997. – Vol. 25, № 17. – P. 3389-402.
16. Pearson, W. R. Flexible Sequence Similarity Searching with the FASTA3 Program Package / W.R. Pearson // *Bioinformatics Methods and Protocols* – 1999. – Vol. 132 – P. 185-219.
17. Zdobnov, E. M. InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro / E.M. Zdobnov, R. Apweiler // *Bioinformatics* – 2001. – Vol. 17, № 9. – P. 847-848.
18. SoftBerry - BPROM [Электронный ресурс] / SoftBerry. – 2009. – Режим доступа: <http://www.softberry.ru/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>. – Дата доступа: 25.01.2009.
19. SoftBerry - ProtCompB [Электронный ресурс] / SoftBerry. – 2009. – Режим доступа: <http://www.softberry.ru/berry.phtml?topic=rcompb&group=programs&subgroup=proloc>. – Дата доступа: 25.01.2009.
20. SoftBerry - FindTerm [Электронный ресурс] / SoftBerry. – 2009. – Режим доступа: <http://www.softberry.ru/berry.phtml?topic=findterm&group=programs&subgroup=gfindb>. – Дата доступа: 25.01.2009.
21. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence / J. Garnier [et al.] // *Methods in Enzymology* – 1996. – Vol. 266, – P. 540-53.
22. Needleman, S. B. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins / S.B. Needleman, C.D. Wunsch // *Journal of Molecular Biology* – 1970. – Vol. 48, № 3. – P. 443-453.
23. ApE- A Plasmid Editor [Электронный ресурс] / Department of Biology in the College of Science, University of Utah. – 2009. – Режим доступа: <http://www.biology.utah.edu/jorgensen/wayned/apel/>. – Дата доступа: 25.01.2009.
24. Hacker, J. Pathogenicity islands and the evolution of microbes / J. Hacker, J.B. Kapur // *Annual Review of Microbiology* – 2000. – Vol. 54, – P. 641-79.
25. COG4104 [Электронный ресурс] / National Center for Biotechnology Information. – 2009. – Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/grace/wiew.cgi?COG4104>. – Дата доступа: 25.01.2009.
26. InterPro: IPR008727 PAAR [Электронный ресурс] / European Bioinformatics Institute. – 2009. – Режим доступа: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/DisplayIproEntry?ac=IPR008727>. – Дата доступа: 25.01.2009.
27. The ShcA protein is a molecular chaperone that assists in the secretion of the HopPsyA effector from the type III (Hrp) protein secretion system of *Pseudomonas syringae* / K. van Dijk [et al.] // *Molecular Microbiology* – 2002. – Vol. 44, № 6. – P. 1469-81.
28. Характеристика харпина HrpW бактерий *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. / Лагоненко А. Л. [и др.] // Доклады НАН Беларуси – 2006. – Том. 50, № 1. – С. 70-73.
29. InterPro: IPR004898 Pectate lyase, catalytic [Электронный ресурс] / European Bioinformatics Institute. – 2009. – Режим доступа: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/DisplayIproEntry?ac=IPR004898>. – Дата доступа: 25.01.2009.
30. ABF-0019012 (ECH3937 v6b) Feature Annotation / Genome Evolution Laboratory of University of Wisconsin-Madison. – 2009. – Режим доступа: http://asap.ahabs.wisc.edu/asap/feature_info.php?LocationID=WIS&SequenceVersionID=41&FeatureID=19012&FeatureDate=20040414130716. – Дата доступа: 25.01.2009.
31. DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via the Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way / S. Gaudriault [et al.] // *Molecular Microbiology* – 1997. – Vol. 26, № 5. – P. 1057-69.

32. Genetic organization of the *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* hrp gene cluster and sequence analysis of the hrpA, hrpC, hrpN, and wtsE operons / R.D. Frederick [et al.] // *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* – 2001. – Vol. 14, № 10. – P. 1213-22.
33. Lorang, J. M. Characterization of avrE from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: a hrp-linked avirulence locus consisting of at least two transcriptional units / J.M. Lorang, N.T. Keen // *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* Vol. 8, № 1. – P. 49-57.
34. DspE-зависимая системная индукция PR-генов растений *Solanum lycopersicum* при контакте с бактериями *Pectobacterium carotovorum* / Николайчик Е.А. [и др.] // *Материалы международной научной конференции "Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты"* – Минск, 2008. – С. 16-18.
35. Фитопатоген *Pectobacterium carotovorum* использует систему секреции III типа для блокирования системного защитного ответа растения-хозяина / Е.А. Николайчик [и др.] // *Труды БГУ* – 2009. –
36. The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems / C. Parsot [et al.] // *Current Opinion in Microbiology* – 2003. – Vol. 6, № 1. – P. 7-14.