

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ имени
АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА и Ю.А. ОВЧИННИКОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ОТДЕЛ МОЛЕКУЛЯРНОЙ
БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

На правах рукописи



Лукьянова Анна Александровна

**«ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И РАЗРАБОТКА ВИДОСПЕЦИФИЧНОЙ
СИСТЕМЫ qПЦР ДЕТЕКЦИИ ФИТОПАТОГЕНОВ КАРТОФЕЛЯ
СЕМЕЙСТВА *PECTOBACTERIACEAE*»**

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

Доктор биологических наук, профессор

Котова Ирина Борисовна

Член-корр. РАН, доктор химических наук

Мирошников Константин Анатольевич,

Москва-2022

Оглавление

Список использованных сокращений:	5
Глава 1. Введение	6
Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.....	6
Цель и задачи работы	10
Объект и предмет исследования	11
Научная новизна работы.....	11
Теоретическая и практическая значимость работы	12
Методология и методы исследования.....	12
Личный вклад автора	13
Положения, выносимые на защиту	13
Степень достоверности и апробация результатов	14
Благодарности	14
Структура работы.....	15
Публикации.....	15
Глава 2. Обзор литературы	16
2.1. Картофель в истории и современном мире	16
2.2. Фитопатогены, вызывающие болезни картофеля	19
2.3. Мягкая гниль и черная ножка картофеля	22
2.3.1. Общие сведения.....	22
2.3.2. Инфекционный спектр <i>Pectobacterium</i> и развитие инфекции на растениях.....	26
2.3.3. Абиотические факторы внешней среды, влияющие на инфекционный процесс.....	32
2.3.4. Распространение МГП в окружающей среде.....	33
2.3.5. Методы борьбы с мягкой гнилью	36
2.3.6. Фаготерапия как метод борьбы с МГП	38
2.4. Таксономия семейства <i>Pectobacteriaceae</i>	41
2.5. Методы детекции и идентификации МГП	45
2.5.1. Микробиологические методы: выделение штаммов МГП из природных образцов.....	45
2.5.2. Серологические методы выявления пектобактерий.....	48

2.5.3. Методы детекции пектобактерий на основе полимеразной цепной реакции.....	50
Глава 3. Материалы и методы.....	56
3.1. Используемые микроорганизмы и условия их культивирования	56
3.2. Геномный анализ	57
3.3. Поиск видоспецифичных последовательностей и дизайн олигонуклеотидов для разработки видоспецифичных qПЦР тест-систем.....	58
3.4. Выделение геномной ДНК из бактерий.....	63
3.5. Выделение геномной ДНК из картофеля	63
3.6. Оценка концентрации и чистоты полученной ДНК.....	64
3.7. Условия проведения амплификации (ПЦР).....	64
3.8. Проведение электрофореза в агарозном геле	65
3.9. Получение компетентных клеток <i>E. coli</i>	65
3.10. Конструирование плазмид	66
3.11. Трансформация	68
3.12. Выделение плазмидной ДНК	69
3.13. Условия проведения ПЦР в реальном времени (qПЦР).....	69
3.14. Определение чувствительности и эффективности ПЦР.....	70
3.15. Тестирование системы детекции на искусственно зараженных растениях	71
3.16. Тестирование системы детекции собранных в Московской области в 2020-2021 годах.....	73
Глава 4. Результаты и обсуждение	74
3.17. Геномный анализ	74
3.18. Поиск участков участков в полногеновых геномах пектобактерии для видоспецифичной амплификации.....	85
3.19. Первичная проверка селективности детекции <i>Pectobacterium</i> разработанными наборами олигонуклеотидов.....	87
3.20. Оценка селективности детекции <i>Pectobacterium</i> разработанными наборами олигонуклеотидов в режиме qПЦР	91

3.21. Оценка чувствительности и эффективности ПЦР.....	93
3.22. Тестирование возможности детекции пектобактерий на искусственно зараженных растениях.....	102
3.23. Аprobация системы детекции на выборке образцов, собранных в Московской области в 2020-2021 годах	105
<i>Заключение</i>	<i>113</i>
<i>Выводы</i>	<i>114</i>
<i>Список литературы.....</i>	<i>115</i>
<i>Приложение 1.....</i>	<i>131</i>
<i>Приложение 2.....</i>	<i>140</i>
<i>Приложение 3.....</i>	<i>148</i>

Список использованных сокращений:

дНТФ - дезоксинуклеозидтрифосфат

МГП – мягкогнилостные пектобактерии

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СТАВ - Cetyl trimethyl ammonium bromide (Бромид цетилтриметиламмония)

FAO STAT – food and agriculture organization (продовольственная и сельскохозяйственная организация объединенных наций)

Pat – *Pectobacterium atrosepticum*

Pbr – *Pectobacterium brasiliense*

Ppar – *Pectobacterium parmentieri*

Pver – *Pectobacterium versatile*

qПЦР – количественная ПЦР в реальном времени

SDS – sodium dodecyl sulfate (додецилсульфат натрия)

Глава 1. Введение

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Стремительный рост пищевых потребностей человечества и растущий спрос на экологически чистую пищевую продукцию требуют постоянного совершенствования агропромышленного комплекса. Важными задачами являются повышение сельскохозяйственной продуктивности, быстрый и точный контроль качества производимой продукции. Кроме того, необходимо снижение количества используемых потенциально токсичных средств защиты сельскохозяйственных растений и животных от возможных инфекций, а также повышение эффективности хранения готовой пищевой продукции.

В частности, одной из важных сельскохозяйственных культур, производимых в РФ, является картофель. По данным FAOSTAT ("Продовольственная и сельскохозяйственная организация объединенных наций") Россия занимает третье место в мире по производству картофеля. Россияне потребляют в среднем 130 кг картофеля на душу населения ежегодно (FAOSTAT, 2020). Одной из существенных проблем, ведущих к экономическим потерям при картофелеводстве, являются бактериальные инфекции, приводящие к гнилостным поражениям как вегетирующих растений, так и клубней урожая. В среднем бактериальные инфекции приводят к порче 15-30% урожая ежегодно. В некоторых случаях потери при хранении и дальнейшей транспортировке могут достигать 50% (Bhat et al., 2010). Зачастую причиной развития гнилей в ходе выращивания, сбора, транспортировки и хранения картофеля являются бактерии, объединенные в семейство *Pectobacteriaceae* (Adeolu et al., 2016), в особенности представители родов *Pectobacterium* и *Dickeya*, внесенные в список 10 наиболее опасных бактериальных фитопатогенов (Mansfield et al., 2012). Фитопатогены данного семейства секретируют ферментный комплекс, включающий пектиназы, целлюлазы, протеазы и прочие ферменты, действие которых направлено на

деградацию растительной клеточной стенки. Инфекция стебля вегетирующего растения приводит к развитию заболевания, известного как черная ножка. В этом случае бактерии развиваются в сосудистой системе растения, вызывая ее характерное почернение, а сам побег вянет и желтеет. Развитие пектобактерий на клубнях приводит к развитию мягкой гнили, при которой клубень со временем разрушается и чернеет, выделяя жидкость, содержащую бактериальную биомассу (Pérombelon, 2002). Основные потери от развития мягкой гнили происходят при хранении картофеля после уборки урожая, а также при дальнейшей транспортировке.

Мер, принимаемых для предотвращения развития мягкой гнили при организации хранения (обработка складов и уборочной техники паром, растворами соединений меди или формальдегида, контроль режима температуры и влажности), зачастую бывает недостаточно. Более того, в случае развития инфекции, средств для того, чтобы остановить ее, не существует (Czajkowski et al., 2011). Основным средством контроля распространения мягкой гнили и черной ножки является сертификация семенного материала и своевременная диагностика латентной инфекции.

Дополнительной мерой для снижения потерь урожая картофеля при хранении, могла бы служить обработка клубней антимикробными агентами (Czajkowski et al., 2011). Современным биотехнологическим решением в данном случае может стать обработка складов и клубней суспензиями бактериофагов. Такой подход хорошо показал себя не только в лабораторных, но и в полевых экспериментах (Bugaeva et al., 2021; Carstens et al., 2019; Zaczek-Moczydłowska et al., 2020a). Фаготерапия позволяет снизить риск развития мягкой гнили даже при наличии бактериального инфекционного фона, а также повысить всхожесть картофеля. Однако данная технология имеет важное ограничение. Как правило, фаги специфичны к одному виду бактерий или даже к отдельным штаммам внутри вида (Miroshnikov et al., 2021). Поэтому, для использования фаготерапии необходимо понимать с точностью до вида, для какого конкретно патогена

необходимо подобрать фаговый препарат («коктейль»). Следовательно, так же, как и для отслеживания латентной инфекции, критически необходимо наличие современного, быстрого и недорогого метода видоспецифичной диагностики.

Несмотря на то, что пектолитические бактерии как таковые, известны достаточно давно, с момента описания рода *Pectobacterium* (Waldee, 1942; Nauben et al., 1998) произошло множество фундаментальных изменений в структуре и таксономическом составе этой группы бактерий. В частности, в результате анализа на тот момент достаточно разрозненной экологической группы пектолитических фитопатогенов, было описано отдельное семейство *Pectobacteriaceae* (Adeolu et al., 2016), пересмотрен состав и филогенетические отношения внутри родов *Pectobacterium* и *Dickeya* (Zhang et al., 2016), пересмотрен статус ряда видов, включая типовой вид *P. carotovorum* (Portier et al., 2019). Во время выполнения данной работы (2019-2022 годы) семейство *Pectobacteriaceae* претерпело достаточно фундаментальные изменения с точки зрения понимания состава известных ранее таксонов и, кроме того, было пополнено множеством новых родов и видов. Для большинства видов *Pectobacterium* и *Dickeya*, в том числе и наиболее опасных для растений, не существует средств видоспецифичной экспресс-диагностики, которые позволили бы быстро и недорого выявить наличие патогена, не прибегая к выделению чистых культур и секвенированию.

Наиболее частым агрессивным возбудителем черной ножки в Европе признан *P. atrosepticum* (Pat). Наиболее частым возбудителем мягкой гнили считается *P. carotovorum* (Charkowski et al., 2020). Однако стоит отметить, что за последние годы таксономический состав вида *P. carotovorum* неоднократно пересматривался и существенно сужался. Часть штаммов, ранее причисляемая к данному виду, была переописана как *P. wasabiae*, затем клада возбудителей внутри *P. wasabiae*, ассоциированная с картофелем, была выделена в отдельный вид *P. parmentieri* (Ppar) (Khayî et al., 2016). Кроме того, часть штаммов *P. carotovorum* была переописана как *P. versatile* (Pver) (Portier et al.,

2019). Этот вид, по-видимому, гораздо более часто встречается на территории Российской Федерации, чем собственно *P. carotovorum*. Другим распространенным патогеном картофеля является *P. brasiliense* (Pbr), первоначально идентифицированный как возбудитель бактериозов картофеля в Бразилии (Duarte et al., 2004). До 2012–2013 гг. *P. brasiliense* не был выявлен в странах Европы и считался характерным для стран с более теплым климатом, однако в настоящий момент данный патоген распространен не только в Европе (Waleron, et al., 2015; de Werra et al., 2015), но и в России (Voronina et al., 2018).

Традиционные методы идентификации пектобактерий подразумевают высев биоматериала, полученного из пораженных тканей растений либо природных источников (воды, почвы) на селективную среду с пектатом (CVP, crystal violet pectate medium) и дальнейшее исследование морфологии полученных штаммов, включающее в себя ряд биохимических характеристик, жирнокислотный профиль мембраны, серотип штамма и другие (Czajkowski et al., 2015). Этот подход достаточно трудоемкий, времязатратный и недостаточно точный. В настоящее время наиболее перспективной технологией детекции считается группа методов на основе амплификации ДНК. Современная система должна быть максимально быстрой, точной и включать в себя минимальное число шагов, на которых можно допустить ошибку. Таким образом, подходящим решением такой задачи было бы создание системы детекции на основе ПЦР в реальном времени (qПЦР). В силу преимуществ использования ПЦР-идентификации, безусловно, уже предпринимались попытки создания тест-систем для детекции *Pectobacteriaceae*. Однако существующие тест-системы для детекции *P. atrosepticum* (de Boer, Ward, 1995; Frechon et al., 1998) на основе классической ПЦР недостаточно точны и не позволяют количественного определения целевого патогена. ПЦР-диагностикумы для *P. parmentieri* не позволяют отличить его от *P. wasabiae*, а для *P. versatile* и *P. brasiliense* таких диагностикумов не существует.

Разработка диагностикумов для количественного видоспецифичного определения пектолитических бактерий является важной и актуальной задачей, на которой сфокусирована настоящая работа. Потенциальное использование подобных диагностических наборов облегчает мониторинг и контроль распространения возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля, позволяет провести выявление латентной (до проявления симптомов) инфекции урожая и семенного материала, а также способствует развитию фаготерапии мягкой гнили растений.

Цель и задачи работы

Целью данной работы является разработка системы детекции представителей рода *Pectobacterium* - возбудителей мягкой гнили картофеля на основе использования метода количественной ПЦР в режиме реального времени (qПЦР).

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Проведение геномного анализа бактерий рода *Pectobacterium*
2. Поиск уникальных последовательностей ДНК для идентификации наиболее агрессивных (*P. atrosepticum*) и наиболее распространенных (*P. versatile*, *P. parmentieri*, *P. brasiliense*) представителей *Pectobacterium*
3. Разработка и валидация систем детекции этих видов рода *Pectobacterium*: оценка специфичности и универсальности метода, чувствительности теста и возможности детекции бактерий рода *Pectobacterium* в растительных образцах
4. Изучение образцов картофеля, собранных в Московской Области на предмет заражения *P. atrosepticum*, *P. versatile*, *P. parmentieri* и *P. brasiliense*

Объект и предмет исследования

Объектом исследования являются фитопатогенные бактерии рода *Pectobacterium*, в частности представители четырех наиболее значимых с точки зрения патогенеза картофеля видов рода *Pectobacterium*. В их число входят наиболее агрессивный возбудитель черной ножки картофеля *P. atrosepticum* и группа часто встречающихся возбудителей мягкой гнили – *P. versatile*, *P. brasiliense*, *P. parmentieri*.

Предметом исследования были филогенетические и таксономические связи представителей данного рода, разработка видоспецифичных методов детекции *P. atrosepticum*, *P. versatile*, *P. brasiliense* и *P. parmentieri* и апробация разработанного метода на образцах клубней картофеля, собранных в 2020-2021 годах в Московской области.

Научная новизна работы

В работе проведен геномный анализ фитопатогенных бактерий из рода *Pectobacterium*, обнаружены некорректно атрибутированные в NCBI Genbank штаммы семейства *Pectobacteriaceae*. Впервые апробирован алгоритм поиска видоспецифичных последовательностей, разработанный в лаборатории молекулярной биоинженерии ИБХ РАН с непосредственным участием автора данной работы, и экспериментально подтверждена его эффективность для автоматизированного поиска видоспецифичных последовательностей в базе полногеномных данных. Разработаны методы видоспецифичной диагностики *Pectobacterium versatile*, *P. brasiliense*, *P. parmentieri* и *P. atrosepticum*. Проведена валидация используемых методик не только для идентификации чистых культур бактерий, но и как диагностикум для оценки заражения растительных образцов пектобактериями с чувствительностью до 10^2 - 10^3 кл/мл, что позволяет проводить оценку растений на наличие патогена до развития симптомов черной ножки и мягкой гнили.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведение геномного анализа рода *Pectobacterium* позволяет понять филогенетические взаимосвязи внутри данного таксона и спрогнозировать возможность описания новых видов. Разработанный для проведения данного исследования алгоритм позволяет проводить автоматизированный поиск видоспецифичных участков в последовательностях бактериальных полных геномов, что было экспериментально показано на примере бактерий рода *Pectobacterium*.

Практическая значимость исследования обусловлена созданием системы детекции, позволяющей провести видоспецифичную экспресс-детекцию четырех видов рода *Pectobacterium*, возбудителей мягкой гнили и черной ножки в растении и клубнях картофеля. Метод позволяет дифференцировать *Pectobacterium versatile*, *P. brasiliense*, *P. parmentieri* и *P. atrosepticum*. Разработанный диагностикум, кроме того, позволяет проводить оценку асимптоматических растений на предмет латентной инфекции пектобактериями, что существенно облегчает контроль распространения данного типа инфекции и позволяет произвести мониторинг распространения этих патогенов с точностью до вида.

Методология и методы исследования

Автором выполнены анализ современной литературы по исследуемой теме на русском и английском языках. На основании данных литературы было проведено планирование *in silico* и *in vitro* экспериментов. В работе использовали современные методы микробиологии, молекулярной биологии и биоинформатики. Полученные данные были собраны, проанализированы и изложены в тексте данной работы.

Личный вклад автора

Автором был самостоятельно спланирован и проведен комплекс теоретических и экспериментальных исследований. Проведение экспериментов требовало кооперации с различными научными группами. Биоинформатическая часть работы была проведена совместными усилиями сотрудников лаборатории молекулярной биоинженерии ИБХ РАН, включая автора диссертационной работы. Лабораторные работы были проведены в сотрудничестве с лабораторией молекулярной диагностики ИБХ РАН, однако, все эксперименты были проведены лично автором. Сбор образцов картофеля для анализа был произведен в сотрудничестве с ИЦ «Фитоинженерия».

Автором были собраны и обработаны все полученные результаты, а также подготовлены к печати публикации.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Система qПЦР детекции, разработанная на основе четырех патогенных бактерий *Pectobacterium atrosepticum*, *P. brasiliense*, *P. parmentieri* и *P. versatile*, рекомендуется для анализа образцов растений на предмет наличия инфекций, вызываемых представителями рода *Pectobacterium*.
- 2) Диагностикум с высокой точностью позволяет идентифицировать *Pectobacterium atrosepticum*, *P. brasiliense*, *P. parmentieri* и *P. versatile*, а также обладает высокой чувствительностью (10^2 - 10^3 кл/мл), что позволяет выявлять заражение растения или клубня пектобактериями до проявления симптомов, то есть на стадии латентной инфекции, которая по состоянию на 2020-2021 годы составила 29 % в товарном картофеле Московской области.
- 3) Наиболее распространенными видами рода *Pectobacterium* в Московской области являются *P. versatile*, выявленный в 15% образцов клубней, и *P. brasiliense*, обнаруженный в 7% образцов, тогда как *Pectobacterium atrosepticum* наряду с *P. parmentieri* встречается только в 3% образцов.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертационная работа является самостоятельным научным исследованием соискателя. Достоверность полученных результатов обусловлена значительным количеством проведенных экспериментальных исследований и статистической обработкой результатов. Достоверность результатов также подтверждается публикациями в высокорейтинговых рецензируемых международных журналах. Результаты данной работы были представлены на пяти конференциях: «IX Международная школа молодых учёных по молекулярной генетике Геномика 21 века» (2021 год, Россия, Москва), «IV Всероссийский съезд по защите растений с международным участием Фитосанитарные технологии в обеспечении независимости и конкурентоспособности АПК России» (2019 год, Россия, Санкт-Петербург), XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов 2021 (2021 год, Россия, Москва), «III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов» (2022 год, Россия, Сочи), IEEE Ural-Siberian Conference on Computational Technologies in Cognitive Science, Genomics and Biomedicine (CSGB) (2021 год, Новосибирск, Россия).

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность член-корр. РАН д.х.н. Мирошникову Константину Анатольевичу и д.б.н., проф. Котовой Ирине Борисовне за руководство данной работой, всестороннюю методическую и моральную поддержку. Всем сотрудникам и студентам лаборатории молекулярной биоинженерии ИБХ РАН, в которой была сделана данная работа. В первую очередь Евсееву Петру Владимировичу за неоценимую помощь в выполнении данной работы; а также Сыкилинде Нине Николаевне, Шнейдеру Михаилу Марковичу, Комаревцеву Сергею Константиновичу, Токмаковой Анне Дмитриевне и Горносталь Екатерине Алексеевне.

Автор благодарит и выражает искреннюю признательность Стахееву Александру Александровичу за помощь в выполнении экспериментальной части данной работы. Автор выражает благодарность д.б.н. Цавкеловой Елене Аркадьевне за критическое обсуждение материала данной диссертации и ценные рекомендации, которые позволили существенно улучшить оформление и подачу изложенного в работе материала.

Отдельную благодарность автор выражает своей семье за напутствие и моральную поддержку, которые сопровождали меня все эти годы. Я благодарю моих родителей, Бобровскую Марину Васильевну и Бобровского Александра Федоровича, а также моего мужа, Лукьянова Дмитрия Александровича.

Структура работы

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», и «Список литературы». Работа изложена на 150 страницах, содержит 31 рисунок, 10 таблиц и 3 Приложения. Список литературы включает 115 источников, из них 6 на русском и 109 на иностранных языках.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ. Среди них 4 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова, 1 монография и 5 тезисов докладов на конференциях. В статьях, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Глава 2. Обзор литературы

2.1. Картофель в истории и современном мире

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) является одним из важнейших для человечества источников пищи. По распространённости картофель уступает только зерновым и рисовым культурам. На родине картофеля, в Южной Америке, этот корнеплод возделывали, по разным оценкам, от семи до десяти тысяч лет назад (Рореное et al., 1989). В Европу картофель был завезен в последней четверти XVI века, но популярность обрел лишь спустя полтора столетия. Благодаря неприхотливости растения и богатому питательному составу клубней этот корнеплод занял важную нишу в большинстве европейских и ряде азиатских кухонь, не раз спасая от голода население Европы (Басиев и др., 2007). Пищевая ценность картофеля обусловлена не только богатым содержанием в клубнях питательных веществ, включающих 10-26% крахмала и 1,4-3% белков, но и значительным содержанием витамина С, калия, фосфора и других жизненно важных микроэлементов в легко усваиваемой форме (Усанова и др., 2018).

Значимость картофеля для человека не ограничивается его непосредственным использованием в пищу. Картофель является важной агротехнической и кормовой культурой. С агротехнической точки зрения, картофель используется как ведущая пропашная культура, после интенсивного возделывания которой остается свободная от сорняков, рыхлая и окультуренная почва, пригодная для выращивания других сельскохозяйственных культур. Высокая урожайность картофеля делает его экономически выгодной кормовой культурой. С одного гектара земли в среднем можно получить 150-200 центнеров картофеля либо всего 30-50 центнеров зерна. Кроме того, по перевариваемости органического вещества сельскохозяйственными животными, картофель занимает лидирующее место наряду с другими кормовыми корнеплодами. Дополнительно картофель

служит сырьем для получения ряда других важных продуктов, таких как спирт или крахмал (Усанова и др., 2018).

Благодаря неприхотливости к внешним условиям, высокой урожайности и хорошим пищевым качествам, картофель долгое время был основной пищевой культурой в умеренных широтах. В настоящее время картофель выращивают практически по всему земному шару более чем в 125 странах (Рисунок 1). По данным "Продовольственной и сельскохозяйственной Организации объединённых наций" мировой урожай картофеля составляет порядка 360 миллионов тонн в год, а занятая под картофелеводство площадь превышает 16,4 миллиона гектар (FAOSTAT, 2020). Мировой рынок картофеля в 2020 году составил 4,36 миллиарда долларов США (Potatoes OEC, 2020).

Основная доля полученного урожая картофеля (порядка 80%) приходится на Евразию. Российская Федерация является одним из крупнейших производителей картофеля, занимая третье место в мире, а потребление картофеля в нашей стране составляет 130 кг на человека в год. В настоящее время структура производства картофеля в Российской Федерации включает 16% производства крупными агрохолдингами, 13% производства фермерскими хозяйствами и 71% приходится на небольшие частные хозяйства (Усанова и др., 2018).

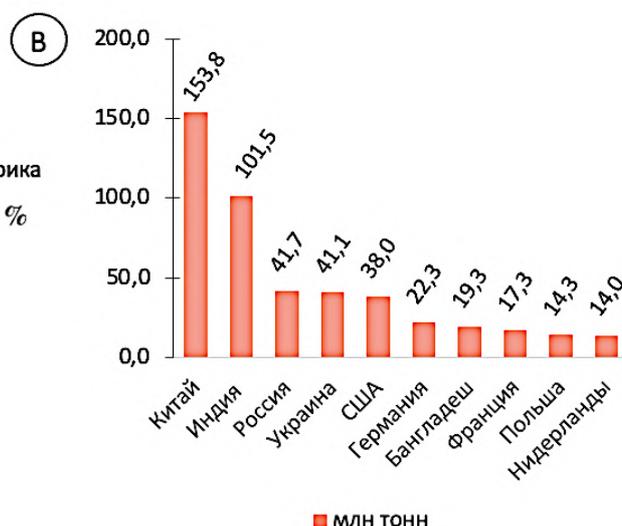
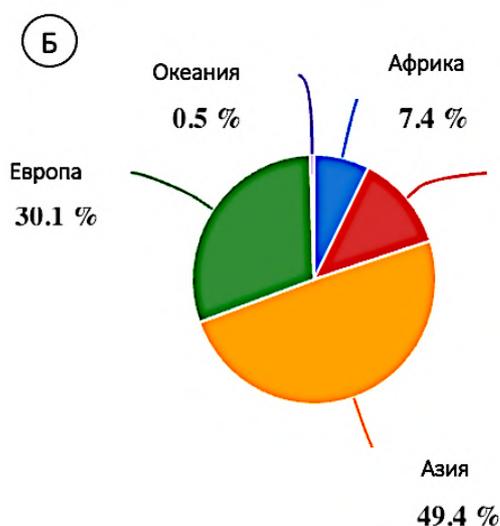
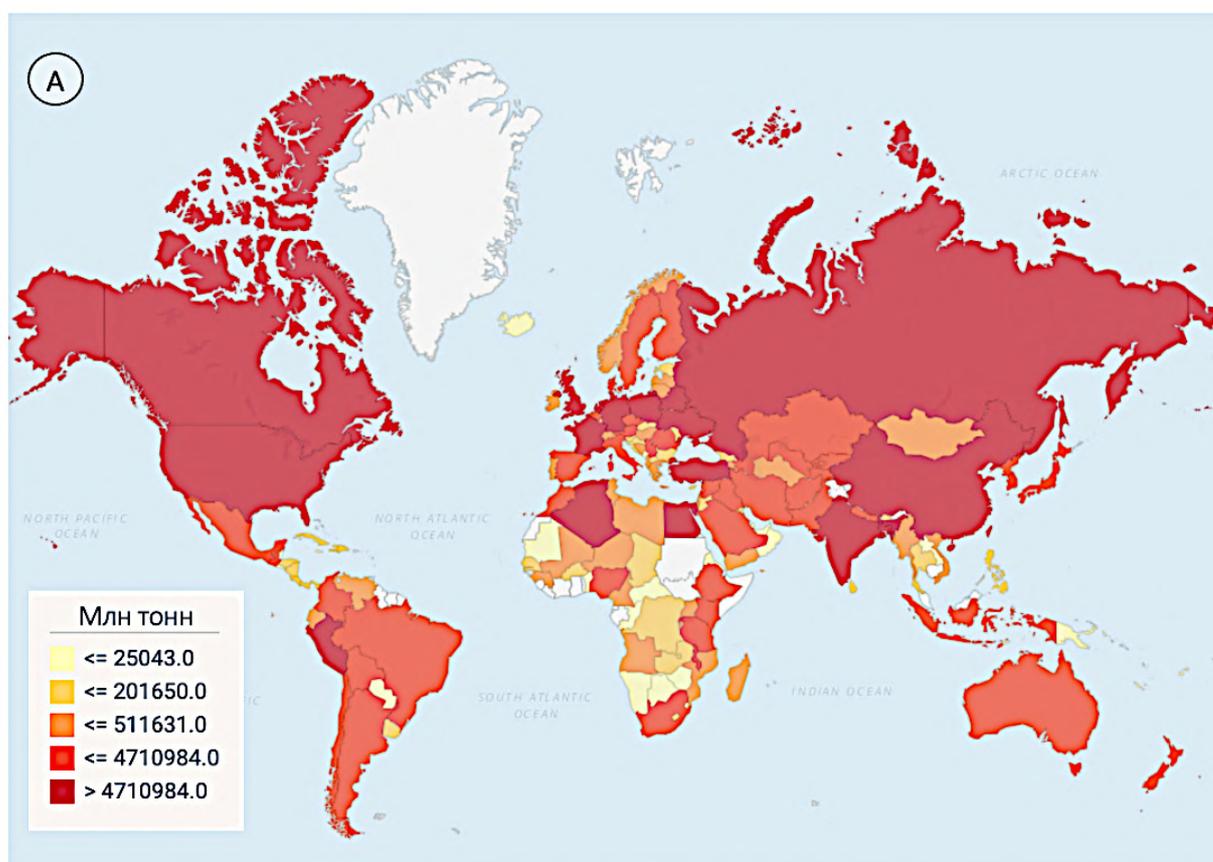


Рисунок 1. Производство картофеля в период с 2019 по 2020 год по данным FAOSTAT. (А) – Производство картофеля по странам мира, млн тонн/год, (Б) – доля каждого континента по производству картофеля, (В) – десять основных стран-производителей картофеля

Любопытно, что за последние 20 лет площадь, отведенная под выращивание картофеля в мире, снизилась на 17%, в то время как общая масса

урожая увеличилась на 11%, что объясняется повышением урожайности с 169 ц/га в 2000 году до 218 ц/га в 2020 году. В то же время в Российской Федерации эти значения составили 105 ц/га и 179 ц/га соответственно (FAOSTAT, 2020). Таким образом, несмотря на увеличение урожайности картофеля в РФ за последние 20 лет, представляется возможным еще больше повысить данный показатель до среднемирового уровня, особенно с учетом того, что агроклиматические характеристики основных зон возделывания картофеля позволяют это сделать.

В целях дальнейшего повышения урожайности картофеля необходимы не только грамотный подбор сортов и строгое соблюдение агротехнических рекомендаций для каждого региона, но и внимательное отношение к оценке здоровья семенного материала и своевременный мониторинг распространения потенциальных вредителей.

2.2. Фитопатогены, вызывающие болезни картофеля

Картофель – высоко востребованная и активно возделываемая культура во всем мире, однако интенсивное культивирование, активные импорт и экспорт семенного и урожайного материала неизбежно ведут и к распространению различных фитопатогенов, а также к развитию болезней, которые могут повлечь за собой серьезные потери как вегетирующих растений, так и собранного урожая картофеля. В частности, в истории известны достаточно драматичные случаи картофельных эпифитотий. Например, Ирландский картофельный голод, произошедший в 1845-1849 годах в связи с массовым заражением картофеля фитофторозом (возбудитель – оомицет *Phytophthora* sp.). Заражение привело к потере существенной части урожая и, в свою очередь, к гуманитарной катастрофе, унесшей жизни существенной части населения как в Ирландии, так и за ее пределами (O’Neil, 1945).

Ежегодно от насекомых-вредителей и инфекционных болезней растений теряется порядка 22% мирового урожая. При недостаточном контроле зараженный на поле картофель, попадая на хранение, может инфицировать большую партию на складе, что в итоге приводит к серьезным потерям в ходе хранения и транспортировки (Bhat et al., 2010). В настоящий момент известно порядка 160 болезней и вредителей картофеля, среди которых на грибные инфекции приходится порядка 50, на бактериальные – 10 и еще 40 на вирусные (van der Wolf, e Boer, 2007). Наибольший вред среди них наносят болезни, вызванные бактериальными инфекциями, поражающие клубни и вегетирующие растения картофеля. Из всех потерь, доля происходящих в результате бактериальных инфекций картофеля оценивается от 25 до 75% (Игнатов и др., 2018). Бактерии, вызывающие заболевания картофеля, входят в десятку наиболее опасных фитопатогенов в мире, занимая три места из десяти. В этот список входит возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля – *Ralstonia solanacearum*, а также два возбудителя мягкой гнили, принадлежащие к родам *Pectobacterium* и *Dickeya* (Mansfield et al., 2012).

Как правило, бактериальные поражения картофеля содержат не только патоген, но и большое разнообразие сопутствующих микроорганизмов, вносящих негативный вклад в колонизацию и разрушение растительной ткани. Это могут быть бактерии, прежде всего, относящиеся к родам *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Streptomyces*. Однако, наибольшую проблему составляет достаточно ограниченный список возбудителей, вызывающих развитие массовых инфекций, приносящих колоссальные потери. Так, например, среди бактериозов картофеля одним из наиболее вредоносных можно назвать бурую гниль картофеля, вызываемую *Ralstonia solanacearum*. Это неспорообразующие грамотрицательные палочки, особенно сильно вредящие производству картофеля в тропических и субтропических регионах, способные также развиваться и средних широтах (van der Wolf, de Boer, 2007). Из экономически значимых культур, помимо картофеля, этот патоген поражает банан, растения из семейства тыквенных, баклажаны, эвкалипт,

имбирь, арахис, шелковицу, табак, помидоры и многие декоративные растения.

Таксон *Ralstonia solanacearum* включает в себя достаточно широкое разнообразие фенотипически различных штаммов, изначально описанных как различные расы и биовары, затем описанные как принадлежащие к четырём филотипам, из которых филотип ПВ (ранее раса 3/биовар 2) широко ассоциирован с инфекциями картофеля и имеет более низкую относительно остальных штаммов температуру развития инфекции (27 °С против 35 °С; Charkowski et al., 2020). Развитие патогена на растении приводит к увяданию листьев, потемнению до коричневого цвета ксилемы в стебле и выделению кремообразной бактериальной биомассы из сосудистой системы. Активное выделение экзополисахарида блокирует сосуды растения. На срезах зараженных клубней наблюдается побурение и некроз сосудистого кольца. При сильном развитии болезни клубень также может потемнеть снаружи. По некоторым оценкам, эпифитотии *Ralstonia solanacearum* на одном только картофеле приводят к убыткам до 1 млрд долларов в год по всему миру на посевных площадях более 1,5 млн га в примерно 80 странах (Elphinstone, 2005). В Российской Федерации этот патоген отнесен к карантинным, поэтому в результате принимаемых мер по отбраковке ввозимого зараженного материала, распространен на территории страны незначительно.

Среди наиболее распространенных в Российской Федерации возбудителей бактериозов картофеля отмечают также грамположительных актиномицетов *Clavibacter michiganensis* (Игнатов и др., 2018). Так, согласно исследованию, в котором было проверено 1495 образцов отечественного и зарубежного происхождения, было показано, что 32,8% партий отечественных образцов и 6,5% зарубежных образцов были латентно инфицированы данной бактерией (Зайцев и др., 2016). *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* – возбудитель кольцевой гнили картофеля был впервые описан еще в 1905 году в Германии. Распространяется в основном через латентно зараженный семенной картофель, а также может сохраняться месяцами в сухой прохладной

среде, что позволяет бактериям распространяться через поверхности сельскохозяйственного инвентаря (Charkowski et al., 2020). Патоген поражает сосуды ксилемы, активно секретируя ферментный комплекс, включающий целлюлазы, протеазы, ксиланазы и другие литические ферменты, которые приводят к разрушению ткани сосудов, а также к возникновению характерной кольцевой гнили с образованием полостей в клубне (Eichenlaub, Gartemann, 2011). Как и в случае с *Ralstonia solanacearum*, борьба с *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* подразумевает строгий контроль семенного материала и соблюдение карантинных мер.

Поскольку возбудители гнилей картофеля наносят колоссальный ущерб в случае вспышки инфекции, они входят в Перечень карантинных объектов на территории РФ и список А2 организации карантина и защиты растений (ЕОКЗР). Таким образом, ведется комплексная борьба с этими вредителями, включающая строгий карантин ввозимого и вывозимого биоматериала, а также выбраковку зараженного семенного картофеля (Игнатов и др., 2018).

2.3. Мягкая гниль и черная ножка картофеля

2.3.1. Общие сведения

Наряду с возбудителем кольцевой гнили существенный урон наносят мягкая гниль и черная ножка картофеля, возбудителями которых являются бактерии родов *Pectobacterium* и *Dickeya*. С помощью метода иммунофлуоресцентного анализа показано, что в 35,01% отечественного семенного картофеля присутствует *Pectobacterium* sp., а 13,97% инфицированы *Dickeya* sp. (Зайцев и др., 2016).

Развитие черной ножки несет за собой целый ряд последствий, таких как изреживание, снижение продуктивности и урожайности, увядание растений, быстрая порча урожайных клубней на складе. Недобор урожая, связанный с развитием данных патогенов, может достигать 50-75%. Поражение 5%

растений в вегетативной фазе в дальнейшем приводит к потере 20% и более клубней в период хранения (Игнатов и др., 2018). В то же время возбудители мягкой гнили картофеля, несмотря на достаточно существенный экономический ущерб, карантину не подлежат, а следовательно, свободно распространяются по территории РФ. Крайне негативный вклад в бесконтрольность такого распространения вносит ввоз из-за рубежа посевного материала, который зачастую бывает заражен различными видами *Pectobacterium* и *Dickeya* (Зайцев и др., 2016), что безусловно увеличивает разнообразие бактерий данной группы в Российской Федерации. Кроме того, значительную часть картофеля выращивают в частных хозяйствах, где контроль не осуществляется.

При этом экономический ущерб, связанный с возбудителями черной ножки и мягкой гнили, весьма существенен и оценивается в миллионах долларов ежегодно (Charkowski et al., 2020). Таким образом, широкая распространенность, разнообразие пектобактерий и массовый характер заболеваний картофеля, вызванных возбудителями мягкой гнили и черной ножки, определяют их высокую вредоносность. Кроме того, бактерии этой группы поражают и другие сельскохозяйственно-важные, а также декоративные растения.

Основные возбудители мягкой гнили и черной ножки – это бактерии, входящие в состав родов *Pectobacterium* и *Dickeya*. Оба рода принадлежат к сформированному в 2016 году семейству *Pectobacteriaceae* внутри порядка *Enterobacterales* (Adeolu et al., 2016). Это грамотрицательные подвижные палочки, образующие на питательном агаре бесцветные колонии (Рисунок 2).

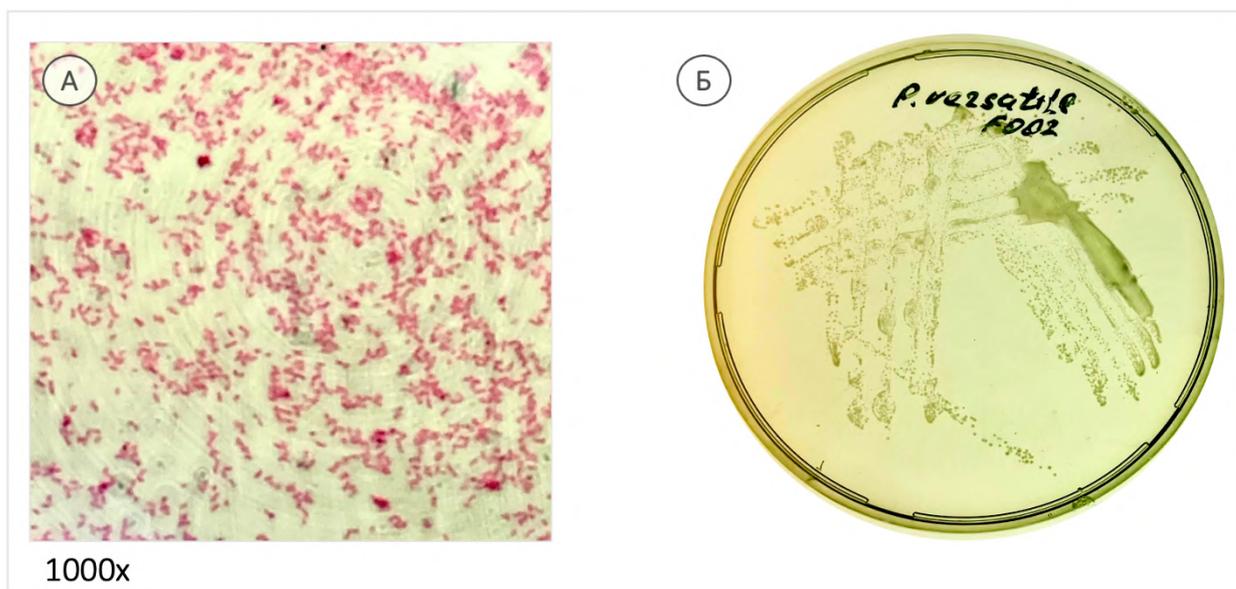


Рисунок 2. *Pectobacterium versatile* штамм F002: (А) – окрашенные по Граму клетки при увеличении 1000х (Б) – внешний вид колоний на питательной среде LB; рост в течение 24 ч при температуре 28 °С

Морфологически возбудители мягкой гнили и черной ножки крайне похожи друг на друга и в основном отличаются спектром растений-хозяев и генетическими особенностями (Pérombelon, 2002). В Таблице 1 отражены биохимические особенности описанных к настоящему времени видов *Pectobacterium*, патогенных для картофеля.

Как видно из Таблицы 1, различия между видами минимальны и, кроме того, могут варьировать между штаммами внутри одного вида. Поэтому, как правило, их объединяют в общую группу мягкогнилостных пектобактерий (МГП) или soft rot *Pectobacteriaceae* (SRP). Устаревшее название, пектолитические эрвинии (soft rot *Erwinias*, SRE) связано с тем, что все представители этой группы были изначально описаны именно как принадлежащие к роду *Erwinia*.

2.3.2. Инфекционный спектр *Pectobacterium* и развитие инфекции на растениях

Мягкогнилостные пектобактерии поражают широкий круг растений. Виды рода *Pectobacterium* заражают растения из 20 семейств двудольных и 12 семейств однодольных, причем зачастую видоспецифично, когда один изолят патогенен для конкретного семейства или порядка растений (Ma et al., 2007; Charkowski, 2018). Представители рода *Pectobacterium* чаще, чем рода *Dickeya*, встречаются на растениях капусты, хлопка и манго, в то время как представители рода *Dickeya* чаще, чем рода *Pectobacterium*, ассоциированы с растениями риса и кукурузы. Некоторые виды, такие как *P. atrosepticum*, *P. betavascularum* и *P. parmentieri*, по-видимому, имеют очень узкий спектр хозяев, а *P. aroidearum* оказывается более вирулентен для однодольных, чем другие виды рода *Pectobacterium* (Nabhan et al., 2013).

Виды рода *Pectobacterium* встречаются на всех континентах, где выращивают картофель, и, вероятно, присутствуют в виде сапрофитов в почве и воде (Pérombelon, 2002).

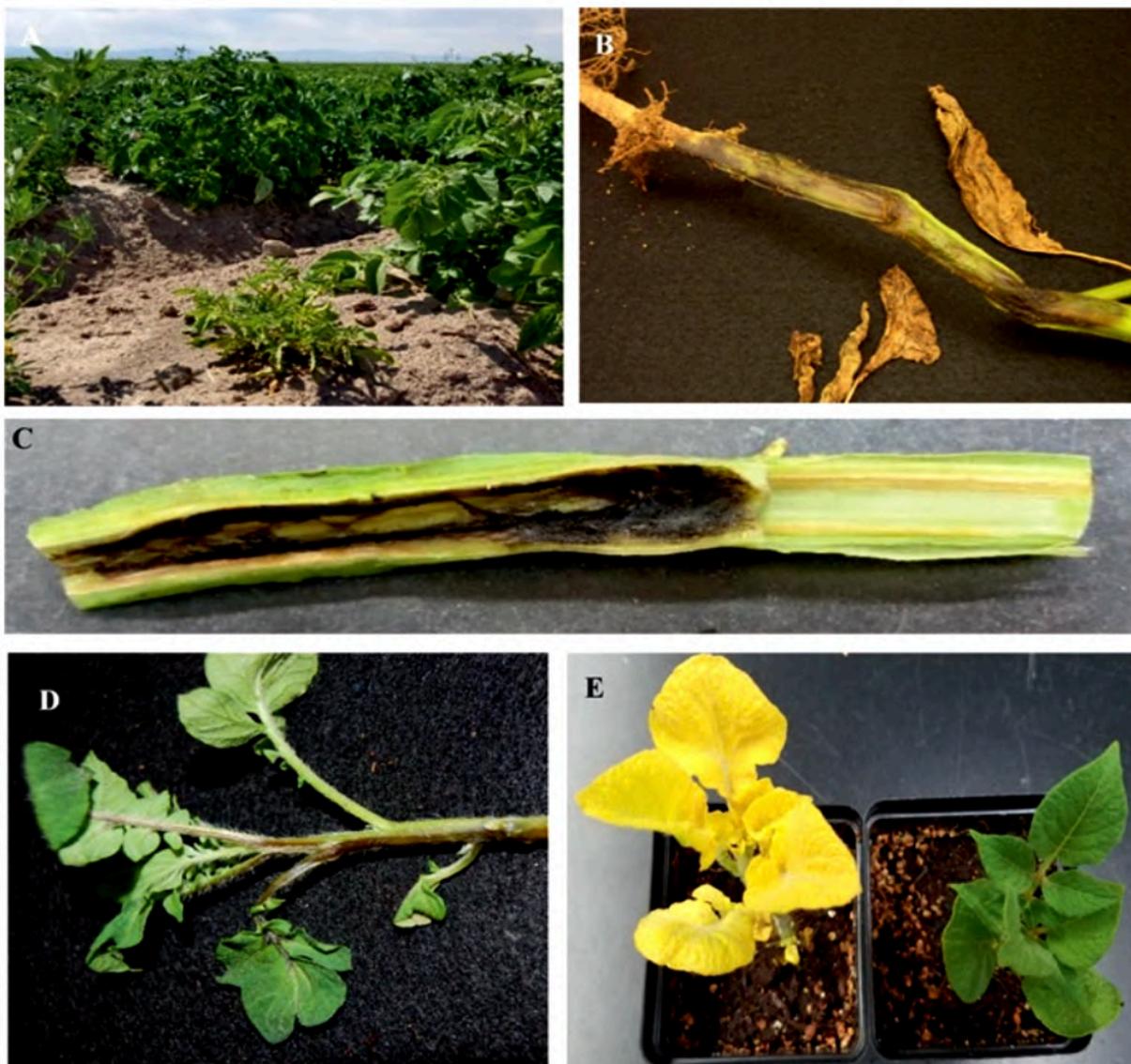
В Европе наиболее частым возбудителем черной ножки признан *P. atrosepticum*, в то время как наиболее частым возбудителем мягкой гнили при хранении является *P. carotovorum* (Charkowski et al., 2020). Однако стоит отметить, что за последние годы состав *P. carotovorum* неоднократно пересматривался и существенно сужался. Часть штаммов, ранее причисляемая

к данному виду, была сначала отнесена к *P. wasabiae*, однако затем ассоциированная с картофелем клада возбудителей была обозначена как *P. parmentieri* (Khayl et al., 2016). Кроме того, часть штаммов *P. carotovorum* была выделена в отдельный вид *P. versatile* (Portier et al., 2019), по-видимому, гораздо более часто встречающийся на территории Российской Федерации, чем собственно *P. carotovorum*.

Еще одним распространенным патогеном картофеля является *P. brasiliense*, первоначально идентифицированный как возбудитель бактериозов картофеля в Бразилии (Duarte et al., 2004). До 2012–2013 гг. *P. brasiliense* не был выявлен в странах Европы, однако в настоящий момент данный патоген распространен не только в Европе (Waleron et al., 2015; de Werra et al., 2015), но и в России (Voronina et al., 2018).

Представители МГП вызывают черную ножку и мягкую гниль картофеля (Рисунок 3). Черная ножка – это некроз стебля, который распространяется снизу вверх от зараженного семенного клубня по сосудистой системе, что сопровождается почернением сосудистой системы. Растение при этом увядает, либо может пожелтеть, что в конечном итоге приведет к гибели. Если МГП проникают в дочерние клубни, то развиваются симптомы мягкой гнили (Pérombelon, 2002).

Признаки черной ножки



Признаки черной ножки



Рисунок 3. Симптомы черной ножки (А-Е) и мягкой гнили (F-G) клубней, вызванные бактериями из рода *Pectobacterium* на картофеле. (А) – растения с черной ножкой ниже здоровых и имеют закрученные листья; (В) – почернение

стебля снаружи; (C) – гниение сердцевины стебля, ксилема коричневого цвета; (D) – коричневая или черная гниль может распространиться на листья (E) или листья становятся ярко-желтыми из-за хлороза; (F) – клубни со вздутыми чечевичками и признаками гниения; (G) – мягкая гниль на дочернем клубне (источник: Charkowski et al., 2020, с изменениями).

Латентное заражение семенных клубней мягкой гнилью широко распространено в большинстве образцов посевного материала, варьируя от недетектируемой концентрации клеток ($<10^1$ кл/г кожуры) до $\sim 10^6$ кл/г кожуры. Как правило, бактерии располагаются межклеточно, в чечевичках и микротрещинах, обычно вне слоя феллодермы и в меньшей степени, в сосудистой системе (ксилеме). В ткани растения клетки бактерий пребывают в состоянии покоя до наступления благоприятных для развития инфекции условий. Как правило, в начале мацерации (процесс расслоения, размягчения и обводнения тканей) концентрация клеток превышает 10^7 кл/г кожуры (Pérombelon, 2002).

Развитие симптомов мягкой гнили начинается при достижении бактериальной биомассой определенной плотности, что происходит за счет чувства кворума (quorum-sensing), механизма межклеточной коммуникации, запускающей экспрессию определенных групп генов после достижения определенной концентрации клеток бактерий в популяции. Впервые этот процесс был описан на примере биолюминесценции культуры *Vibrio fischeri*, которая начинает испускать свет при высокой плотности (Nealson et al., 1970). Другие процессы, такие как формирование биопленок или инициация патогенеза зачастую регулируются подобным образом.

Процесс регуляции инициации патогенеза за счёт межклеточной коммуникации между бактериальными клетками описан для многих почвенных фитопатогенов (von Bodman et al., 2003). У граммотрицательных бактерий медиатором чувства кворума, как правило, выступает N-ацил-гомосеринлактон (Fuqua et al., 2001). Для МГП N-ацил-гомосеринлактон также

был показан важным фактором патогенности, определяющим начало развития гнили на растениях (Andersson et al., 2000).

Мягкая гниль клубня начинается на чечевичках клубня, апикальном конце столона картофеля, побега и/или в ранах, процесс интенсифицируется во влажных условиях. Ткань клубня мацерируется до кремообразной консистенции, чернеет на воздухе и приобретает неприятный гнилостный запах. В недостаточно проветриваемых холодильных камерах гниение распространяется на соседние клубни, когда жидкость из инфицированных клубней попадает на здоровые клубни, заражая их, что может приводить к появлению массивных очагов гниения и значительным потерям урожая (Czajkowski et al., 2011).

Механизм патогенеза основан, прежде всего, на секреции микроорганизмами литических ферментов, разрушающих клеточные стенки и ткани растения. Ферментный комплекс включает многочисленные пектиназы, целлюлазы, протеазы и ксиланазы, обладающие различными свойствам., а также набор литических ферментов, зависящий от условий внешней среды. Например, в лабораторных условиях в присутствии рамнозы секретируются рамногалактоуронатлиазы, а в присутствии феруловой кислоты – ферулоил эстераза FaeD (Charkowski et al., 2011).

Считается, что из различных ферментов наиболее важными в патогенезе являются пектиназы, ответственные за мацерацию тканей и, косвенно, гибель клеток (Pérez-Mendoza et al., 2011). Мацерация происходит за счет деградации пектина в срединной пластинке между клетками (Рисунок 4).

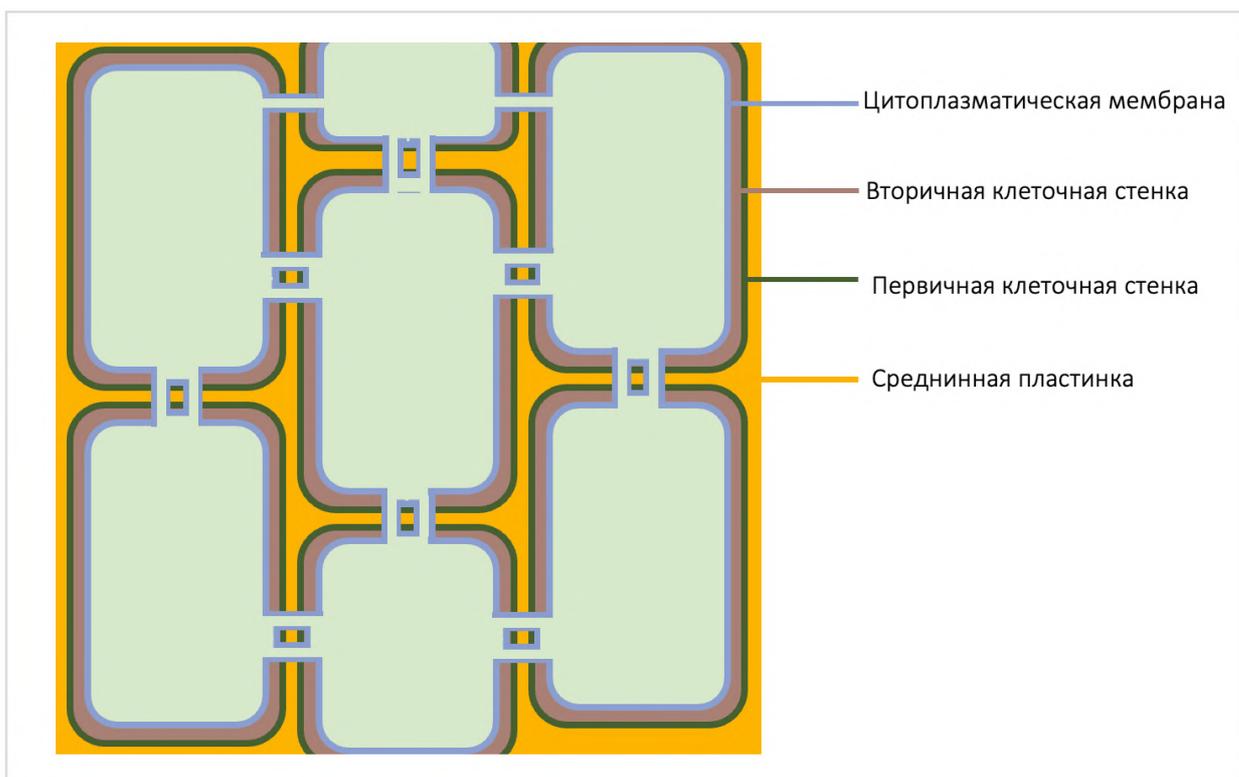


Рисунок 4. Схема расположения растительных клеток и срединная пластинка между ними

МГП секретируют четыре основных типа ферментов, приводящих к растворению пектина: три с высоким рН оптимумом (~8): пектатлиазу (Pel), пектинлиазу (Pnl) и пектинметилэстеразу (Pme), а также один, - полигалактуроноазу (Peh), с низким рН оптимумом (~6). Ферменты с различным рН оптимумом экспрессируются последовательно, в зависимости от стадии инфекции. Кислотность среды апопласта (структура, включающая клеточные стенки и межклетники растения) близка к рН 6, поэтому в этих условиях высока активность ферментов с низким рН оптимумом. Продукты гидролиза пектина под действием этих ферментов запускают защитную систему растения, которая приводит к инфлюксу H^+ внутрь клеток и, следовательно, повышению рН апопласта. В дальнейшем запускается экспрессия ферментов с высоким рН оптимумом (Pérombelon, 2002).

Используя продукты гидролиза растительных клеточных стенок, крахмала и белков, наряду с МГП в пораженном растении развивается целый комплекс сопутствующей микробиоты, не патогенной для здорового растения,

но участвующей в гниении больного, такие как *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. и другие. (Kõiv et al., 2015).

2.3.3. Абиотические факторы внешней среды, влияющие на инфекционный процесс

Скорость развития симптомов, а также форма проявления во многом зависит как от самого патогена, так и от внешних условий: влажности, температуры, состава почвы, погодных условий, устойчивости к патогену сорта картофеля, использования удобрений, фунгицидов, гербицидов и многого другого. Например, *P. atrosepticum* и *P. parmentieri* погибают при температуре выше 33 °С, а *P. carotovorum* и *P. brasiliense* могут расти при температуре до 39 °С (Charkowski, 2015). В то же время МГП чувствительны к низким температурам. Так, показано, что МГП не способны пережить зиму в почве, за исключением прикорневой почвы, ризосферы, где условия способствуют выживанию бактерий. При низких температурах свободные бактерии в почве способны сохраняться не более 6 месяцев. Таким образом, зимовка, как правило, происходит только в ризосфере либо в тканях зараженных растений, включая сорняки (Czajkowski et al., 2011).

Основным экологическим фактором перехода от латентного состояния к развитию болезни является влажность и уровень воды в почве. Водяная пленка вокруг клубня создает анаэробные условия, которые запускают каскад событий, ведущих к началу гниения (Charkowski, 2015). В частности, анаэробноз нарушает кислородзависимые системы резистентности растения-хозяина (образование фитоалексинов, фенолов, свободных радикалов, необходимых для формирования иммунного ответа растения). Кроме того, анаэробные условия также ингибируют лигнификацию и опробкование клеточных стенок, что в аэробных условиях обеспечивало бы защиту от деградации пектинолитическими ферментами (Rérombelon, 2002).

Ключевыми факторами, которые способствуют развитию болезней, вызываемых МГП на картофеле и других растениях-хозяевах, помимо высокой влажности почвы, являются высокое содержание в ней азота и низкий уровень кальция или магния. Их влияние на динамику развития инфекции, по-видимому, обусловлено обоюдным воздействием как на параметры роста растения, так и бактерий. Например, кальций способствует укреплению клеточных стенок растений в клубнях, но он также необходим для активности бактериальной пектиназы. В свою очередь, азот необходим для активного роста растений, однако высокая концентрация нитратов в клубнях позволяет пектобактериям использовать анаэробное нитратное дыхание в пораженных тканях (Charkowski, 2015).

2.3.4. Распространение МГП в окружающей среде

На рисунке 5 приведены основные способы распространения МГП.



Рисунок 5. Основные пути распространения МГП

Основным способом распространения МГП считается ротация латентно зараженных семенных клубней. Так, импорт и экспорт потенциально зараженных партий семенного картофеля ведет к активному распространению МГП между странами Европы и Азии. Попадая в почву, зараженные клубни гниют, бактерии попадают в почву, и с током воды распространяются на соседние растения. В этих растениях в зависимости от условий может тоже развиться симптомы гнили, либо инфекция останется в латентной форме (Czajkowski et al., 2011).

Микроклональное размножение растений позволяет достаточно быстро получить свободный от МГП семенной картофель (Frost et al., 2013), однако использование такого картофеля не гарантирует невозможность вспышки инфекции в дальнейшем.

При выращивании семенного картофеля в сертифицированных теплицах используют комплекс мер, направленный на предотвращение контаминации МГП, для чего почву и посадочные горшки дезинфицируют, а воду для полива фильтруют. В таких условиях инфицированность картофеля МГП остается на уровне, близком к нулю. Однако при высадке картофеля в почву избежать контаминации клубней МГП становится практически невозможно, поскольку бактерии рода *Pectobacterium* распространены в сорняках, в почве и поверхностных водах во всех районах выращивания картофеля.

Даже небольшого (10^2 кл/мл) количества клеток рода *Pectobacterium* в семенном картофеле достаточно, чтобы вызвать заболевание, и чем выше уровень инокулята, тем больше вероятность возникновения заболевания (Toth et al., 2003). Например, как показано в случае *P. atrosepticum*, чем выше плотность бактерий в клубне (от 10^2 до 10^6 кл/мл), тем больше вероятность того, что гниение начнется раньше. В то же время, в случае с *Dickeya* spp., этот эффект менее выражен, по-видимому, в силу высокой агрессивности патогена (Czajkowski et al., 2011). Таким образом, заражение клубней через почву также является важным фактором распространения и сохранения МГП.

МГП могут разноситься с током воды, включая течения или потоки на полях, так и в в крупные пресноводные источники, такие как озера и реки. Так, например, в 2008 году в речной воде был обнаружен новый, ранее не встречавшийся биовар *Dickeya* spp., впоследствии обнаруженный на зараженном картофеле (Laurila et al., 2010).

Распространение МГП также может происходить по воздуху. В частности, показано, что МГП с больных растений могут переноситься летающими насекомыми на большие расстояния и инфицировать картофель и другие растения. Так, было выявлено более 80 видов насекомых, способных переносить МГП. Наиболее частыми распространителями считаются капустная муха (*Delia floralis*), капустная моль (*Plutella xylostella*) и златоглазка (*Chrysoperla carnea*) (Rossmann et al., 2018).

Кроме того, пектобактерии могут присутствовать в аэрозолях, образующихся при измельчении ботвы перед сбором урожая, а также формируемых каплями дождя при сильном ливне над зараженным полем (Czajkowski et al., 2011). МГП были обнаружены и в пробах воздуха, даже вдали от посевов картофеля. Причем в дождливые дни выявляемый титр бактерий выше, чем в засушливые. Несмотря на то, что из-за воздействия УФ и других внешних факторов, патогенные бактерии в воздухе остаются жизнеспособными непродолжительное время, этого времени достаточно для того, чтобы они распространились на значительные расстояния (Czajkowski et al., 2011).

Заражение сельскохозяйственных культур также может происходить во время механического повреждения, что чаще всего случается при уборке урожая. Загрязнение сельскохозяйственной уборочной техники гниющими клубнями не только вызывает распространение бактерий по площади поля, но и способствует инокуляции МГП через повреждения, которые будут служить входными воротами для инфекции новых клубней, что может привести к массовой порче урожая на складе при хранении (Czajkowski et al., 2011).

2.3.5. Методы борьбы с мягкой гнилью

В настоящее время устойчивых к МГП товарных сортов картофеля не существует, а культивируемые разновидности картофеля могут отличаться большей или меньшей толерантностью к данным патогенам. Молекулярные механизмы устойчивости диких растений к МГП остаются неизвестными. Кроме того, не существует способов остановить уже прогрессирующую инфекцию. Таким образом, основные меры борьбы с МГП должны быть направлены на предотвращение развития инфекции (Charkowski et al., 2020).

Прежде всего для борьбы с МГП следует использовать сельскохозяйственные приемы, позволяющие снизить риск развития инфекции. Так, одним из наиболее эффективных методов борьбы с представителями рода *Pectobacterium* и другими патогенами, переносимыми семенным картофелем, является посадка визуально здоровых семенных клубней без видимых повреждений: порезов, трещин, ранок, через которые распространяются большинство патогенов картофеля, колонизирующих сосудистую систему картофеля, в том числе бактерии рода *Pectobacterium*. Кроме того, стоит учитывать, что риск заражения через ранки и порезы можно снизить санитарной обработкой семенных клубней. Опробковение порезов, которое происходит со временем, также снижает риск дальнейшей инфекции (Charkowski, 2015).

Физические методы обработки семенного картофеля включают обработку ультрафиолетовым излучением, горячей водой и паром, и даже воздействием солнечного света. Методы профилактики действительно снижают численность бактерий рода *Pectobacterium* и/или заболеваемость (Czajkowski et al., 2011). Однако, эти подходы сложно реализовать в крупных хозяйствах с оборотами в тысячи тонн семенного картофеля.

Обработка химическими дезинфицирующими средствами также снижает заболеваемость МГП. В частности, 70%-ный этанол, 1%-ный гипохлорит натрия, 2%-ный сульфат меди, 5%-ная надуксусная кислота, 1%-

ная бензойная кислота эффективно убивали МГП за пять минут обработки клубней в лабораторном эксперименте, однако, в теплицах обработка всеми дезинфицирующими средствами снижала прорастание клубней на 10–100 % (Czajkowski et al., 2013). Опрыскивание соединениями меди способствует борьбе с бактериальной гнилью стеблей в течение вегетационного периода. Симптомы стеблевой гнили чаще проявляются на поврежденных растениях, особенно после ураганов, и могут быстро прогрессировать. Фермеры обычно обрабатывают вегетирующие растения медьсодержащими соединениями, чтобы защитить поврежденные участки от заражения пектобактериями, пока стебли не заживут (Johnson et al., 2011).

Сведение к минимуму повреждения клубней за счет осторожного сбора урожая также помогает контролировать мягкую гниль при хранении. Наибольший экономический ущерб приносит активное развитие мягкой гнили в картофелехранилищах, где она может привести к потере всего урожая (Charkowski, 2015).

Дополнительной мерой профилактики может стать достаточная аэрация на складах. Клубни могут защитить себя от развития МГП за счет образования пробковой перидермы, а также противомикробных соединений, необходимых для естественной защиты растения от патогенов. Однако для нормального функционирования защитных систем растения необходим доступ кислорода. Таким образом, достаточный приток воздуха на склад способствует заживлению клубней и является важным шагом в защите от мягкой гнили. После формирования раневой перидермы клубни снова могут эффективно противостоять заражению мягкой гнилью (Charkowski, 2015).

Важной мерой борьбы является мониторинг распространения патогена и выбраковка зараженных клубней. Для этого необходим быстрый, недорогой и точный метод определения наличия МГП в латентно зараженном картофеле. Желательно, чтобы этот метод также позволял производить видоспецифичную детекцию для оценки уровня агрессивности патогена и изучения динамики распространения. Однако в силу многократного пересмотра состава многих

ранее существовавших таксонов и выделение целого ряда новых видов для многих из них, включая достаточно опасные и распространенные, такие как *P. versatile*, *P. brasiliense* и *P. parmentieri*, видоспецифичных систем детекции на момент 2020 года, когда была начата данная работа, не существовало. А для ряда опасных видов, в том числе для самого агрессивного, *P. atrosepticum*, существовавшие системы детекции были устаревшими и могли давать существенный процент ложноположительных и ложноотрицательных сигналов. Таким образом, актуальной задачей является разработка обновленных, современных систем детекции патогенов группы МГП.

2.3.6. Фаготерапия как метод борьбы с МГП

Биологические методы контроля МГП включают применение вирусов и антагонистических бактерий как агента биоконтроля МГП. Например, представители рода *Bacillus*, продуцирующие ацилгомосеринлактоназу, гидролизующую N-ацилгомосеринлактон в среде и тем самым нарушающие чувство кворума у МГП, могут потенциально рассматриваться как агент биоконтроля. Трансгенные по гену ацилгомосеринлактоназы сорта картофеля, в которых он был клонирован и экспрессирован, показали высокий уровень устойчивости к *P. carotovorum* (Dong et al., 2001). Кроме того, был показан схожий эффект и для бактерий, выделенных из ризосферы картофеля. Бактерии, выделенные из ризосферы, также были способны к деградации N-ацилгомосеринлактона (Jafra et al., 2006). Антагонистическое действие показано также за счет выделения антимикробных соединений: органических кислот и перекиси водорода на примере лактобактерий (Trias, Vañeras, 2008). В лабораторных условиях показан ингибирующий эффект штамма *Bacillus licheniformis* P40, секретирующего вещества, сходные по строению и функциям с бактериоцинами (Cladera-Olivera et al., 2006).

Наиболее перспективным средством борьбы среди агентов биологического контроля МГП считают использование бактериофагов.

Бактериофаги (фаги) — это вирусы, поражающие бактериальные клетки и имеющие достаточно узкий инфекционный спектр. Бактериофаги рассматриваются как перспективное средство экологически безопасной и высокоспецифичной защиты растений и урожая от бактериальных болезней. Фаготерапия – это подход, направленный на использование одного или нескольких фагов (фагового коктейля) для профилактики или борьбы с инфекцией. Как правило, при создании фагового коктейля смешивают несколько различных по инфекционному спектру и механизму инфекции фагов для того, чтобы суммарный эффект был синергидным и фаги не конкурировали друг с другом (Chan et al., 2013). Такая смесь позволяет также снизить вероятность возникновения бактерий, резистентных к фагам. Однако, даже несмотря на возможное появление нечувствительных к бактериофагам форм, как правило, такие бактерии становятся менее вирулентными, чем бактерии дикого типа, что тоже способствует снижению инфекционной нагрузки (Meaden et al., 2015).

Интерес к бактериофагам МГП в последние годы значительно усилился. Если к 2016 году было известно немного больше двух десятков фагов (Czajkowski, 2016), инфицирующих представителей родов *Pectobacterium* и *Dickeya*, то уже к 2021 таких фагов было описано более сотни (Miroshnikov et al., 2021).

В частности, известны и бактериофаги, инфицирующие выделенные в Российской Федерации за последние годы штаммы МГП, включая наиболее агрессивные и распространенные виды, такие как *P. carotovorum* (Shneider et al., 2020), *P. versatile* (Voronina et al., 2019), *P. brasiliense* (Evseev et al., 2020; Lukianova et al., 2020), *P. parmentieri* (Kabanova et al., 2018) и *D. solani* (Kabanova et al., 2019). Такое разнообразие известных фагов позволяет подобрать достаточно эффективный комплекс из нескольких фагов для профилактики развития МГП при хранении картофеля.

К настоящему моменту продемонстрирована высокая эффективность таких коктейлей. Так, при исследовании комплекса из шести фагов, активных

в отношении *P. atrosepticum*, при моделировании хранения картофеля в условиях высокого инфекционного фона было показано снижение количества картофеля с явным проявлением симптомов мягкой гнили на 61,3% в обработанных фаговым коктейлем образцах относительно необработанных (Carstens et al., 2019). Кроме того, было изучено влияние коктейля из 6 фагов, инфицирующих *P. atrosepticum* и *P. carotovorum*, на инфекционный фон и динамику развития инфекции в лабораторных и полевых экспериментах. Обработка клубней фаговой суспензией перед посадкой улучшала всхожесть картофеля и обладала защитным от МГП эффектом (Voronina et al., 2019). Также была показана способность бактериофагов сохраняться и положительно влиять и на урожай следующего года (Zaczek-Moczydłowska et al., 2020b).

Сходные результаты были показаны в трехлетних полевых исследованиях защитного действия фагового коктейля относительно лука (Zaczek-Moczydłowska et al., 2020a). В исследовании 2021 года было показано, что фаговый коктейль, содержащий пять различных по инфекционному спектру и таксономической принадлежности фагов, инфицирующих *P. versatile*, *P. brasiliense* и *P. atrosepticum*, эффективно снижал популяцию пектобактерий до несимптоматической не только в лабораторных, но и в складских экспериментах, также оказывая защитное действие на картофель (Bugaeva et al., 2021). Таким образом, фаготерапию можно считать целесообразным и масштабируемым подходом для защиты картофеля от МГП.

Однако у данного метода существует одно принципиально важное ограничение. Как правило, бактериофаги имеют достаточно узкий инфекционный спектр. Это означает, что чаще всего фаги инфицируют бактерии только одного или немногих видов, либо определенные штаммы внутри вида (Miroshnikov et al., 2021).

Разнообразие уже известных пектофагов позволяет подобрать подходящий коктейль, эффективный в отношении конкретных видов, распространенных в данный момент, используя накопленную за годы исследований коллекцию вирусных штаммов. Однако для подбора

эффективного коктейля необходимо четкое представление о видовом составе в каждом конкретном случае.

Таким образом, в данном случае тоже необходимо наличие быстрых и эффективных методик видоспецифичной детекции, позволяющей быстро и технологично оценить видовой состав и обсемененность помещения либо партии картофеля для создания эффективного фагового коктейля.

2.4. Таксономия семейства *Pectobacteriaceae*

Изначально представители нынешнего семейства *Pectobacteriaceae* были описаны как штаммы рода *Erwinia*. В частности, еще в 1942 году был описан вид *Erwinia carotovora* (Waldee, 1942), который долгие годы оставался в составе этого рода. По мере накопления новых известных штаммов и их характеристики, стало понятно, что род *Erwinia*, очевидно, включает в себя три кластера, которые в 1998 году было предложено повысить до уровня отдельных видов (Hauben et al., 1998). Так, *E. carotovora* была переописана как *P. carotovorum* в составе новосформированного рода *Pectobacterium*, важнейшей особенностью которого является способность к активной секреции пектинолитического комплекса ферментов. Кроме того, внутри данного вида было выделено пять подвигов *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*., *P. carotovorum* subsp. *betavascularum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*., *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae*. Кроме того, в той же статье был описан вид *P. cacticida*. Схему дальнейших изменений в таксономии рода *Pectobacterium* иллюстрирует Рисунок 6.

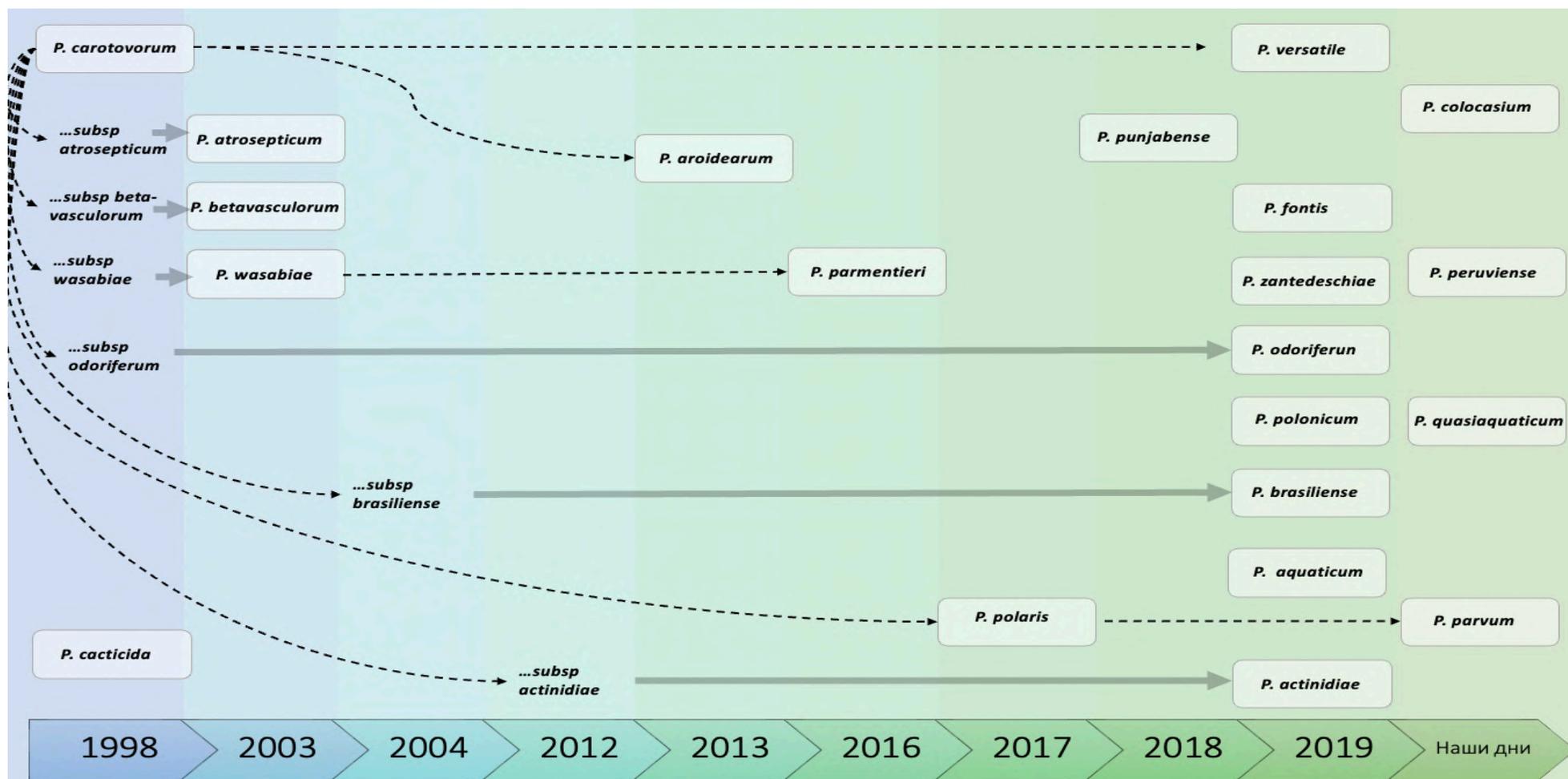


Рисунок 6. Хронология описания видов рода *Pectobacterium*. Черная пунктирная стрелка обозначает, что таксон был сформирован из группы штаммов ранее описанного вида. Серой стрелкой отмечено, был ли таксон описан заново (например, ранее существовавший подвид повышен до статуса вида). В рамки обведены существующие в настоящий момент виды.

Затем (Gardan et al., 2003) три из этих подвидов (*P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*., *P. carotovorum* subsp. *betavasculorum*, *P. carotovorum* subsp. *wasabiae*) также были повышены до статуса вида. Были описаны два патогена, паразитирующих на картофеле – наиболее агрессивный *Pectobacterium atrosepticum* и встречающийся чаще на сахарной свекле *P. betavasculorum*. В таксон *P. wasabiae* вошли патогены, паразитирующие на васаби и китайской капусте. В дальнейшем внутри *P. wasabiae* были найдены штаммы, которые паразитируют преимущественно на картофеле и, кроме того, отличаются фенотипически. Эта монофилетическая группа была описана в 2016 году как *P. parmentieri* (Khayı et al., 2016).

В это же время до статуса отдельного вида был повышен атипичный вариант *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis*, вызывавший черную ножку на картофеле в Бразилии (Duarte et al., 2004). Новый вид *P. brasiliense* был более устойчив, чем другие известные патогены, к высоким температурам, и, в связи с этим, оказался в теплых широтах более вредоносным, чем *P. atrosepticum* (Nabhan et al., 2012, Portier et al., 2019).

Как было сказано выше, с биохимической точки зрения штаммы, выделяемые с различных растений, зачастую бывают достаточно похожи друг на друга, но весьма вариабельны по спектру проявляемых признаков при взаимодействии с растением. Такое сходство, однако, привело к тому, что на протяжении длительного времени подавляющее большинство новых изолятов описывали исключительно как представителей типового вида *P. carotovorum*.

В то же время, штаммы *P. carotovorum* критически различаются с точки зрения происхождения, генетических особенностей, филогенетического происхождения, агрессивности и динамики протекания патогенеза, чувствительности к бактериофагам и ряду других важных особенностей, делая группу МГП все более гетерогенной.

В 2012 году был описан новый патоген для растений киви, идентифицированный как *P. carotovorum* subsp. *actinidiae* (Koh et al., 2012). Примерно в то же время монофилетическая группа штаммов, ранее

атрибутированная как *P. carotovorum*, паразитировавшая на однодольных растениях и имевшая отличия в строении мембраны, была выделена в вид *P. aroidearum* (Nabhan et al., 2013). Аналогичным образом, в 2017 из состава штаммов, ранее определенных как *P. carotovorum* был выделен еще один вид, паразитирующий на картофеле, *P. polaris*, позже разделенный на собственно *P. polaris* (Dees et al., 2017) и *P. parvum* (Pasanen et al., 2020).

Таким образом, накопление базы все новых и новых штаммов в совокупности с ростом числа результатов полногеномного секвенирования все более проливали свет на данную группу патогенов, ранее считавшуюся одним видом. Во-первых, стал очевиден достаточно внушительный масштаб и высокое биоразнообразие данной группы, что в конечном итоге, привело к выделению ее в статус отдельного семейства внутри порядка *Enterobacterales* (Adeolu et al., 2016). Во-вторых, становилось все более очевидно, что различные изоляты, определенные как *P. carotovorum*, по-видимому, могут относиться к множеству разных видов, которые еще предстоит описать и выделить. И, следовательно, этот таксон неизбежно ожидают существенные изменения.

В 2018 году часть штаммов *P. carotovorum*, выделенных из клубней картофеля, была объединена в новый вид *P. peruvienne* (Waleron et al., 2018). Затем в 2019 году ряд ранее существовавших подвидов был повышен до статуса отдельных видов в ходе достаточно масштабного пересмотра семейства. В результате *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, вариант *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* и *P. carotovorum* subsp. *actinidiae* были повышены до статуса отдельных видов. В той же статье было предложено описать одну из клад *P. carotovorum*, ранее упоминаемую в литературе как кандидатный вид (Shirshikov et al., 2018) как *P. versatile*. Еще одна клада, ранее входившая в состав *P. carotovorum*, была переописана как отдельный вид *P. actinidiae*. (Portier et al., 2019). Состав вида *P. carotovorum* таким образом был существенно пересмотрен.

Кроме того, в последние годы описан еще целый ряд новых видов, паразитирующих на самых различных растениях (Sarfranz et al., 2018; Waleron et al., 2019a; Waleron et al., 2019b; Zhou et al., 2022), а в ряде случаев, выделенные из образцов воды или почвы, для которых растение-хозяин неизвестно (Moussa et al., 2021; Oulghazi et al., 2019; Pédrón et al., 2019).

В настоящий момент это быстрорастущее семейство находится под пристальным вниманием научного сообщества. Глобальные изменения в таксономии группы, произошедшие в последние годы, требуют также и пересмотра молекулярных методов выявления данных патогенов, обновления систем детекции для известных патогенов и разработки таких систем для недавно описанных видов.

2.5. Методы детекции и идентификации МГП

2.5.1. Микробиологические методы: выделение штаммов МГП из природных образцов.

Большинство классических методов, используемых для идентификации и дифференциации МГП, требуют выделения жизнеспособных клеток из природных образцов и получения чистых культур. При выделении МГП из растительных тканей с явно выраженной симптоматикой стоит ожидать достаточно высокую концентрацию клеток патогена (более 10^6 кл/г растительной ткани). В таком случае рекомендуется брать для посева часть из переднего фронта гнили, где развитие сопутствующей микробиоты еще не выражено. При пробоотборе следует учитывать, что компоненты растительного сока могут подвергать клетки бактерий окислительному стрессу, в связи с чем желательно добавление в буфер антиоксидантов (Czajkowski et al., 2015).

При выделении культур из латентно зараженных растений, бактерии могут быть обнаружены во всех тканях, стеблях, корнях, листьях и клубнях,

однако их плотность обычно невелика, редко превышая 10^3 кл/г растительной ткани. В стеблях бактерии чаще обнаруживаются в первых 15–20 см над уровнем земли (Hélias et al., 2000), тогда как в подземной части растения они чаще присутствуют в конце столона (Czajkowski et al., 2009), но также часто обнаруживаются в чечевичках и опробковевших ранах (Pérombelon, 2002).

МГП выделяют также из почвенных и водных образцов. Как правило перед высевом на твердую питательную среду для выделения МГП почву необходимо предварительно суспендировать в стерильной воде или буфере, встряхивая в течение нескольких часов. Дополнительно проводят обогащение почвы, инкубируя её в селективном бульоне, содержащем пектин (Czajkowski et al., 2015).

В воде, в отличие от почвы, МГП способны выживать в течение достаточно длительного времени. Учитывая, что в водных пробах бактерии присутствуют в достаточно низких концентрациях, рекомендуется также предварительное обогащение пробы в питательной среде (Czajkowski et al., 2015).

Оптимальной селективной средой для выделения МГП считается кристалвиолет-пектатная среда CVP (Cuppels, Kelman, 1974) состава (г/л): полипектат натрия 18; NaOH – 0,3; NaNO₃ – 2; CaCl₂*H₂O – 0,6; кристалвиолет – 0,0015; агар – 4. Селективное действие этой среды обусловлено тем, что полипектат выступает единственным источником углерода и, таким образом, на среде могут расти только пектолитические бактерии. Кристалвиолет ингибирует большую часть грамположительных бактерий, способных использовать полипектат как единственный источник углерода. Пектолитические бактерии, вырастая на данной среде, формируют чашеобразные углубления, свидетельствующие о наличии пектолитической активности.

Среди фенотипических признаков выросших колоний пектолитических бактерий оценивают морфологию колоний и клеток, биохимические особенности метаболизма и липидный состав мембран. Чаще всего в описании

новых видов и штаммов отражают формирование углублений на среде СVP, рост при 37 °C и при концентрациях NaCl 1% и 5%, закисление среды при росте на лактозе, мальтозе, трегалозе, сахарозе и других органических соединениях (Baghaee-Ravari et al., 2011; Duarte et al., 2004; Gardan et al., 2003; Pasanen et al., 2020; Portier et al., 2019).

Однако стоит отметить, что традиционные методы идентификации, включающие микроскопию и оценку биохимических характеристик выделенных изолятов, не являются исчерпывающими. Как было сказано в предыдущей главе, МГП по своим биохимическим характеристикам могут быть крайне вариабельны и в то же время сходны друг с другом. В результате такого разнообразия крайне трудно подобрать биохимический маркер, позволяющий достоверно отличить один вид от другого. В то же время, именно видоспецифичная детерминация является крайне существенной для определения фитопатогенных пектобактерий. Поэтому методы молекулярной диагностики становятся приоритетным современным подходом в их идентификации.

Вне зависимости от того, оценивают ли непосредственно растительный материал на предмет латентной инфекции, либо определяют видовую принадлежность чистых культур, для точной идентификации патогена необходима его молекулярная диагностика (Рисунок 7).

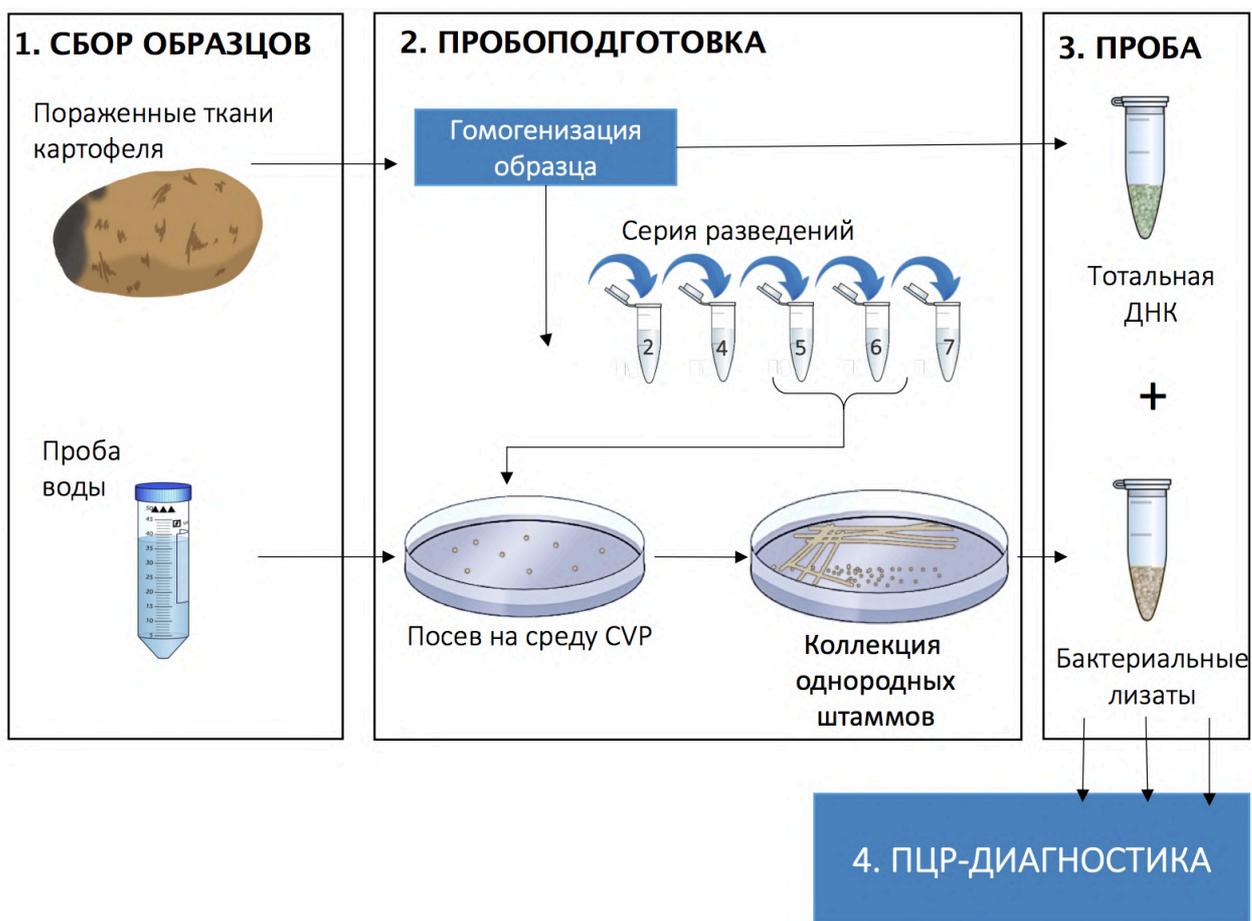


Рисунок 7. Общая схема пробоподготовки для детекции и составления коллекции штаммов МГП. (1) – сбор образцов растений, почвы или воды; (2) - выделение чистых культур и получение образцов чистых культур для дальнейшей диагностики; (3) – получение проб для молекулярной диагностики.

2.5.2. Серологические методы выявления пектобактерий

Иммунологические методы обнаружения видов родов *Pectobacterium* и *Dickeya* основаны на всестороннем знании существующих серогрупп. Как правило, для серологической группировки используют поверхностные полисахариды бактерий – липополисахариды (ЛПС). Так, для *P. atrosepticum* описано восемь различных серогрупп с преобладанием штаммов серогруппы I в Шотландии и Нидерландах (de Boer, McNaughton, 1987). Для *P. carotovorum*, в свою очередь, описаны множественные варианты

поверхностных полисахаридов (de Boer, et al, 1979). Исследования последних лет также подтверждают это разнообразие (Arizala, Arif, 2019; Czerwicka et al., 2011; Kabanova et al., 2019; Lukianova et al., 2020).

Иммунологические методы основаны на специфическом связывании с клетками патогена моноклональных или поликлональных антител. Это могут быть тесты, основанные на иммунофлуоресцентном окрашивании, жидкостном иммунофлуоресцентном анализе (ИФА), иммунохроматографические тесты. В большинстве случаев в качестве антигена используют поверхностные полисахариды бактерий. Основной проблемой, связанной с использованием этой группы методов, служит достаточно сложная и не всегда возможная отладка специфичности. Если для представителей рода *Dickeya* известно всего восемь серогрупп, то в случае с представителями рода *Pectobacterium* ситуация несколько сложнее ввиду наличия множества различных серогрупп (Ma et al., 2007).

Основным недостатком использования поликлональных антител является их низкая специфичность, поскольку они могут связываться с некоторыми нецелевыми патогенами из-за наличия общих соматических и жгутиковых антигенов, а также других клеточных антигенов/антител (de Boer et al., 1997). Например, поликлональные антитела к пектатлиазе представителей рода *Pectobacterium* и *Dickeya* перекрестно связывались также с пектинолитическими *Pseudomonas* spp. и *Xanthomonas* spp (Klopmeier & Kelman, 1988).

Кроме того, серологическая гетерогенность МГП и разнообразие вариантов поверхностных полисахаридов ведет к тому, что не все изоляты реагируют специфически с поликлональными антителами.

В отличие от поликлональных, моноклональные антитела обладают уникальной и высокой специфичностью к одному антигену. Однако это сопряжено с повышенным риском ложноотрицательных реакций в случае серологической изменчивости возбудителя. Высокая серологическая вариабельность МГП в таком случае может привести к тому, что часть

штаммов целевого вида будет давать отрицательный результат в таком тесте. Относительно высокая стоимость производства моноклональных антител является на сегодняшний день еще одним препятствием для использования этого метода (Czajkowski et al., 2015).

Кроме того, чувствительность серологических методов не всегда высока. Так, при иммунофлуоресцентной детекции удается отследить бактерии в концентрации порядка 10^6 кл/мл (Allan, Kelman, 1977; Phillips, Kelman, 1982). Также разработаны системы иммуноферментного анализа (ELISA), как правило в формате "double antibody sandwich", когда используется система из двух поликлональных антител. Предел детекции при таком анализе составляет 10^5 - 10^6 кл/мл, что не является достаточно высокой чувствительностью метода (Pérombelon, Nyman, 1995).

2.5.3. Методы детекции пектобактерий на основе полимеразной цепной реакции

Чаще всего для анализа проб почвы или латентно зараженных растений используют методы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Это могут быть методы на базе классической ПЦР, ПЦР в реальном времени либо различные модификации ПЦР.

Анализы на основе ПЦР обеспечивают более быстрое, точное и недорогое обнаружение патогена, чем при использовании стандартных микробиологических или иммунологических методов. По сравнению с серологическими анализами ПЦР методы более специфичны, поскольку олигонуклеотидные праймеры, используемые для ПЦР, могут быть разработаны со специфичностью для уровня целевого рода или (под)вида.

В качестве тестируемых образцов, содержащих матрицу для амплификации, используют не только очищенную ДНК, но и бактериальные гомогенаты, полученные, например, кипячением в воде (10-15 мин) или щелочным лизисом, что позволяет сократить этап выделения ДНК.

Чувствительность такого анализа может варьировать от 1-15 клеток/мл бактериальной суспензии в чистой воде до 10^5 кл/мл при анализе образцов картофельного экстракта. Снижение чувствительности в присутствии картофельного экстракта обусловлено ингибирующим действием компонентов картофельного сока на ДНК-полимеразу (Czajkowski et al., 2015).

Помимо классической ПЦР, основанной на амплификации видоспецифичного фрагмента ДНК с последующим проведением электрофореза в агарозном геле для визуализации ампликонов, используют различные модификации метода, например, гнездовую (nested) ПЦР, когда сначала амплифицируют более длинный фрагмент, а затем проводят дополнительный раунд ПЦР, амплифицирующий участок внутри наработанного первого ПЦР-продукта. Такой подход позволяет существенно повысить чувствительность метода. Так, для отличия вида *P. wasabiae* от *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum*, и *P. odoriferum*, (на момент написания статьи рассматриваемых как подвиды *P. carotovorum*) после первого раунда ПЦР удавалось детектировать 5×10^2 кл/мл, а после второго раунда чувствительность метода возросла на два порядка, что позволило детектировать 2-4 кл/мл (Kang, Kwon, Go, 2003).

Метод RFLP-ПЦР (restriction fragment length polymorphism) совмещает в себе этап амплификации с рестрикционным анализом. В этом случае амплифицируют какой-либо ген домашнего хозяйства, например, *recA* (Waleron et al., 2002; Toth, et al. 2001), а ПЦР продукт затем обрабатывают рестриктазами и сравнивают друг с другом паттерны получившиеся для различных изолятов. Сходным методом является геномный фингерпринтинг или ПЦР на базе повторяющихся последовательностей (repetitive sequence-based PCR). Например, BOX-ПЦР, когда единственный праймер BOXA1R, комплиментарный регулярным участкам, создает уникальные для вида или группы штаммов паттерны, с помощью которых различные таксоны можно отличать один от другого. Этот метод применяют и к МГП (Токмакова et al., 2021; Voronina et al., 2019).

Метод RAPD (random amplified polymorphic DNA) подразумевает амплификацию на основе отжига коротких неспецифичных праймеров к случайным участкам геномной ДНК. По полученному набору ПЦР продуктов на геле в дальнейшем можно различить между собой виды или штаммы МГП. Например, таким способом возможно отличить *P. carotovorum* от *P. atrosepticum* (Parent, 1996). Эта группа методов (RFLP, BOX, RAPD) подходит не столько для видоспецифичной детекции наличия патогена в образце, но как инструмент, чтобы отличить сходные чистые культуры одну от другой, сравнивая их друг с другом. Дополнительным недостатком такого подхода является сложность интерпретации результатов, особенно при большом числе образцов, поскольку не всегда возможно однозначно соотнести паттерн, образуемый ПЦР продуктом или фрагментами рестрикции с тем или иным видом патогена и отнести его по этому признаку к какой-либо группе.

Петлевая изотермическая амплификация (LAMP) представляет из себя способ амплификации ДНК, для которого, в отличие от классической ПЦР, не требуется циклической смены температур. В данном случае амплификация может проходить при одной температуре (65 °С) с использованием, например, водяной бани или термостата, что является несомненным преимуществом. Принцип метода состоит в использовании полимеразы, способной вытеснять вторую цепь ДНК (как правило, это *Bst* полимеразы из *Bacillus stearothermophilus*). Для амплификации используют набор из 4-6 праймеров при достройке которых формируются ампликоны, содержащие структуры типа «шпилька». Однако, из-за сложностей практической реализации (сложность подбора праймеров, ограниченная возможность использования мультиплексной системы и проведения количественного анализа), данный метод не получил широкого распространения в случае с детекцией МГП.

ПЦР в реальном времени подразумевает детекцию изменения количества амплифицируемой ДНК в динамике. В этом случае нет необходимости в проведении последующего электрофореза, что значительно экономит время анализа пробы, а также снижает риск возникновения ошибок

при дополнительных манипуляциях. Количественная оценка ампликонов происходит за счет добавления флуорофоров интеркалирующего красителя, например SYBR Green, либо более специфично, за счет добавления флуоресцентного зонда. Зонд представляет собой дополнительный олигонуклеотид, к которому прикреплен флуорофор и гаситель, комплементарный участку амплифицируемой последовательности. Гаситель – это молекула, спектр поглощения которой соответствует спектру флуоресценции флуорофора. Гаситель подавляет флуоресценцию до того момента, пока Taq полимеразы не расщепит зонд в ходе амплификации за счет своей 5'-экзонуклеазной активности (Рисунок 8).

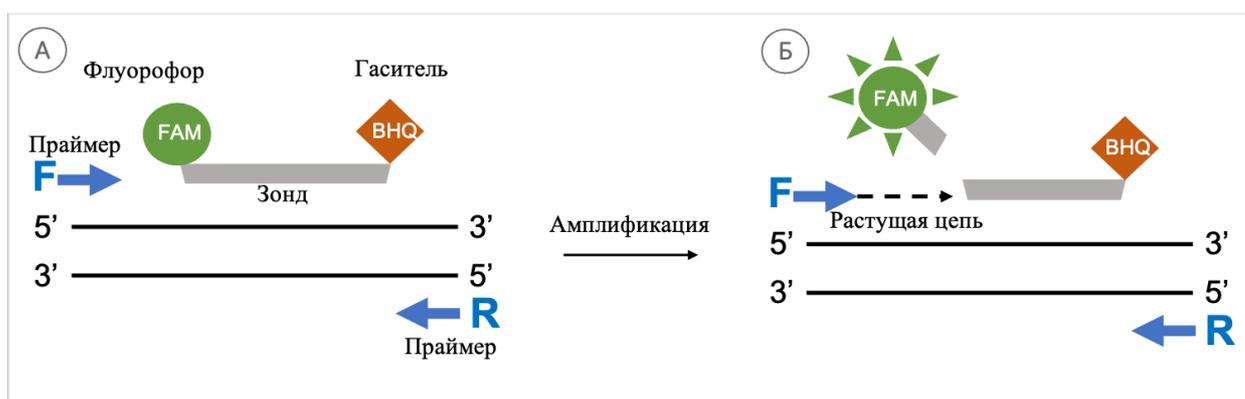


Рисунок 8. Схема работы зонда. (А) – праймеры и зонд отжигаются комплементарно матрице. (Б) – Taq полимеразы начинает удлиняет растущую цепь и, достигая зонда, отщепляет флуорофор за счет 5'-экзонуклеазной активности. Флуоресценция разгорается.

Использование зонда позволяет существенно повысить специфичность и, кроме того, позволяет проводить мультиплексную ПЦР, если использовать зонды с разными флуорофорами (Ребриков, Трофимов, 2006). В настоящее время ПЦР в реальном времени является одним из наиболее популярных количественных методов для детекции МГП наряду с классической ПЦР.

Рассмотрим существующие системы детекции для представителей рода *Pectobacterium*, контроль которых наиболее актуален в РФ. Среди них *P. atrosepticum* как наиболее частый возбудитель мягкой гнили в холодных

регионах; устойчивый к повышенным температурам *P. brasiliense*; а также агрессивные в отношении картофеля виды, выделенные из бывшего таксона *P. carotovorum* - *P. parmentieri* и *P. versatile*.

Наибольшее количество работ посвящено детекции *P. atrosepticum*, поскольку данный патоген был описан достаточно давно как подвид типового вида группы. Так, в статье 1994 года предлагали различать между собой подвиды *Erwinia carotovora* с помощью метода RFLP. Предлагалось амплифицировать ген, кодирующий пектатлиазу (*pel*), а затем расщеплять полученный ПЦР-продукт рестриктазой Sau3AI. Полученный паттерн позволял отличить *E. carotovora* subsp. *atroseptica* от других подвидов (Darrasse et al., 1994). Очевидно, что к настоящему времени данный метод утратил свою актуальность.

Также было разработано две ПЦР-системы на базе классической ПЦР (de Boer, Ward, 1995; Frechon et al., 1998) и метод на базе LAMP, амплифицирующий тот же участок, что был предложен де Боером в 1995 году (Li et al., 2011). Данные ПЦР системы были разработаны достаточно давно и с использованием ограниченного на тот момент набора данных секвенирования. Кроме того, с момента разработки произошли изменения в таксономии МГП, и поэтому подобные диагностикумы существенно устарели. В настоящий момент в открытых базах данных насчитывается более 200 геномов МГП, что позволяет актуализировать и существенно повысить точность разрабатываемых сейчас новых систем детекции.

Для того, чтобы отличить *P. brasiliense* от других МГП в настоящий момент предложено использовать уникальный паттерн рестрикции 16S-23S внутригенного спейсера (intergenic spacer), полученный при обработке рестриктазой SexAI.

Системы ПЦР-детекции *P. parmentieri* также отсутствовали, а данный вид был выделен как отдельная клада из *P. wasabiae* (Khayri et al., 2016). В публикациях, предлагающих методы обнаружения *P. wasabiae*, были предложены диагностические методы ПЦР, основанные на амплификации

гена фитазы/фосфатазы (*appA*) (de Boer, Li, Ward, 2012) или тирозин-аспартатного (*YD*) повторяющегося участка (Kim et al., 2011). Оба этих анализа позволяют отличить кладу, содержащую *P. parmentieri* + *P. wasabiae* от *P. carotovorum* и других МГП, но не дают возможности различить эти два вида между собой. Используемый в настоящее время в фитодиагностике анализ позволяет предположить приблизительную специфичность возбудителя с учетом источника выделения штамма (Suárez et al., 2017). Однако он по-прежнему не позволяет обнаружить конкретные виды и несколько устарел из-за изменившегося понимания таксономии группы.

P. versatile как вид был описан лишь в 2019 году (Portier et al., 2019) и поэтому систем экспресс-детекции данного вида еще не разработано.

Таким образом, для всех четырех фитопатогенных видов рода *Pectobacterium*, значимых из-за высокой инфекционной активности и их быстрого распространения по территории Российской Федерации, не существует недорогих быстрых количественных современных методов, позволяющих обнаружить МГП в растительном материале или идентифицировать выделенные чистые культуры. В то же время, наличие таких методов необходимо для контроля распространения патогенов, оценки зараженности партий картофеля, а также возможности применения эффективной и безопасной фаготерапии. Поэтому разработка метода видоспецифичной детекции фитопатогенных пектобактерий является актуальной и своевременной задачей и была выбрана целью этой работы.

Глава 3. Материалы и методы

3.1. Используемые микроорганизмы и условия их культивирования

Для проведения данного исследования была использована коллекция лаборатории молекулярной биоинженерии ИБХ РАН, включающая более сотни штаммов бактерий, выделенных из картофельных гнилей на полуселективной среде CVP, а также набор хорошо изученных штаммов, относящихся к этой группе, полученных из Всероссийской Коллекции Микроорганизмов (ВКМ). Из 110 использованных в работе штаммов 75 принадлежит к семейству *Pectobacteriaceae*. Среди них штаммы *P. atrosepticum*, *P. brasiliense*, *P. parmentieri*, *P. wasabiae*, *P. versatile*, *P. carotovorum*, *P. aquaticum*, *P. polaris*, *D. dianthicola* и *D. solani*. Остальные штаммы были выделены из гниющих клубней картофеля вместе с представителями *Pectobacteriaceae* и проявляли выраженную пектолитическую активность, формируя ямки в агаризованной среде CVP (Cuppels, Kelman, 1974). Это *Lelliottia* sp., *Agrobacterium tumefaciens*, *Clavibacter michiganensis*, *Curtobacterium* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Advenella* sp., *Morganella* sp (см. Приложение 1).

Штаммы были предварительно охарактеризованы при помощи ВОХ фингерпринтинга (Токмакова et al., 2021; Voronina et al., 2019) и секвенирования 16S рРНК. Для ряда штаммов было проведено полногеномное секвенирование.

Рутинное культивирование штаммов проводили на агаризованной среде LB (триптон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 10 г/л) при 28 °С.

Долговременное хранение штаммов осуществляли при -80 °С в жидкой среде с добавлением 30% глицерина.

Для проверки чистоты культуры штаммы высевали на агаризованную среду LB и визуально оценивали однородность колоний.

3.2. Геномный анализ

Геномный анализ, включавший сравнение среднегеномного сходства (average nucleotide identity, ANI) и филогенетический анализ, проводили с использованием последовательностей всех 221 полных и незавершенных (драфт) геномов представителей семейства *Pectobacteriaceae*, включая 146 геномов, классифицированных как относящихся к роду *Pectobacterium*, размещённых в базе данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) по состоянию на конец 2020 (Приложение 2), а также отдельных представителей родственных групп. Анализ проводили с использованием как полногеномных последовательностей, так и с использованием последовательностей отдельных генов, включая гены 16S рРНК и консервативных генов.

Полногеномный сравнительный анализ проводили с помощью вычисления среднегеномного сходства (ANI) и последующей кластеризации полученных данных. Вычисления ANI выполняли с использованием программы orthoANI (Lee et al., 2016) с применением стандартных настроек. Кластеризация значений ANI была проведена на онлайн-сервере Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr/>) с использованием алгоритма BIONJ (Gascuel, 1997), реализующего метод присоединения соседей с применением модели первого порядка дисперсий и ковариаций оценок эволюционного расстояния. Полученную матрицу ANI использовали для создания тепловой карты с помощью Excel и построения дендрограммы среднегеномного сходства с помощью конструктора филогенетических деревьев, встроенного в программу Geneious Prime 2020 (<https://www.geneious.com/>). Все вычисления проводили на сервере лаборатории молекулярной биоинженерии ИБХ РАН.

Филогенетический анализ с использованием отдельных генов проводили с использованием выравниваний генов 16S рРНК и соединённых (конкатенированных) выравниваний (т. н. «мультилокусный анализ», multilocus sequence analysis, MLSA), полученных с использованием нуклеотидных последовательностей 92 консервативных генов, указанных в

Приложении 3, выделенных из геномных последовательностей с помощью пайплайна UBCG (up-to-date bacterial core gene) (Na et al., 2018). Все выравнивания были получены с помощью программы MAFFT v7.490 (Kato et al., 2002), встроенной в интерфейс Geneious Prime 2020, с использованием алгоритма L-INS-i и модели замен GTR GAMMA. Конкатенацию выравниваний проводили встроенным инструментом Geneious Prime 2020.

3.3. Поиск видоспецифичных последовательностей и дизайн олигонуклеотидов для разработки видоспецифичных qПЦР тест-систем

Поиск видоспецифичных последовательностей в геномах пектобактерий осуществляли с помощью сравнения коротких участков генома, относящихся в целевой группе, состоящей из всех штаммов целевого вида, и отсутствующих или существенно отличающиеся в остальных штаммах, не принадлежащих к целевому виду. Используемый алгоритм включал несколько этапов, в том числе сбор данных, поиск видоспецифичных последовательностей и конструирование праймеров (Рисунок 9). Алгоритм был реализован как в виде алгоритма действий в среде Geneious Prime (Lukianova et al., 2020), так и в виде самостоятельной программы, написанной на языке Python (<https://github.com/magisterquis/s3finder>) (Rasskazova et al., 2021). Поиск видоспецифичных участков, найденных в настоящей работе, проводили в среде Geneious Prime 2020.

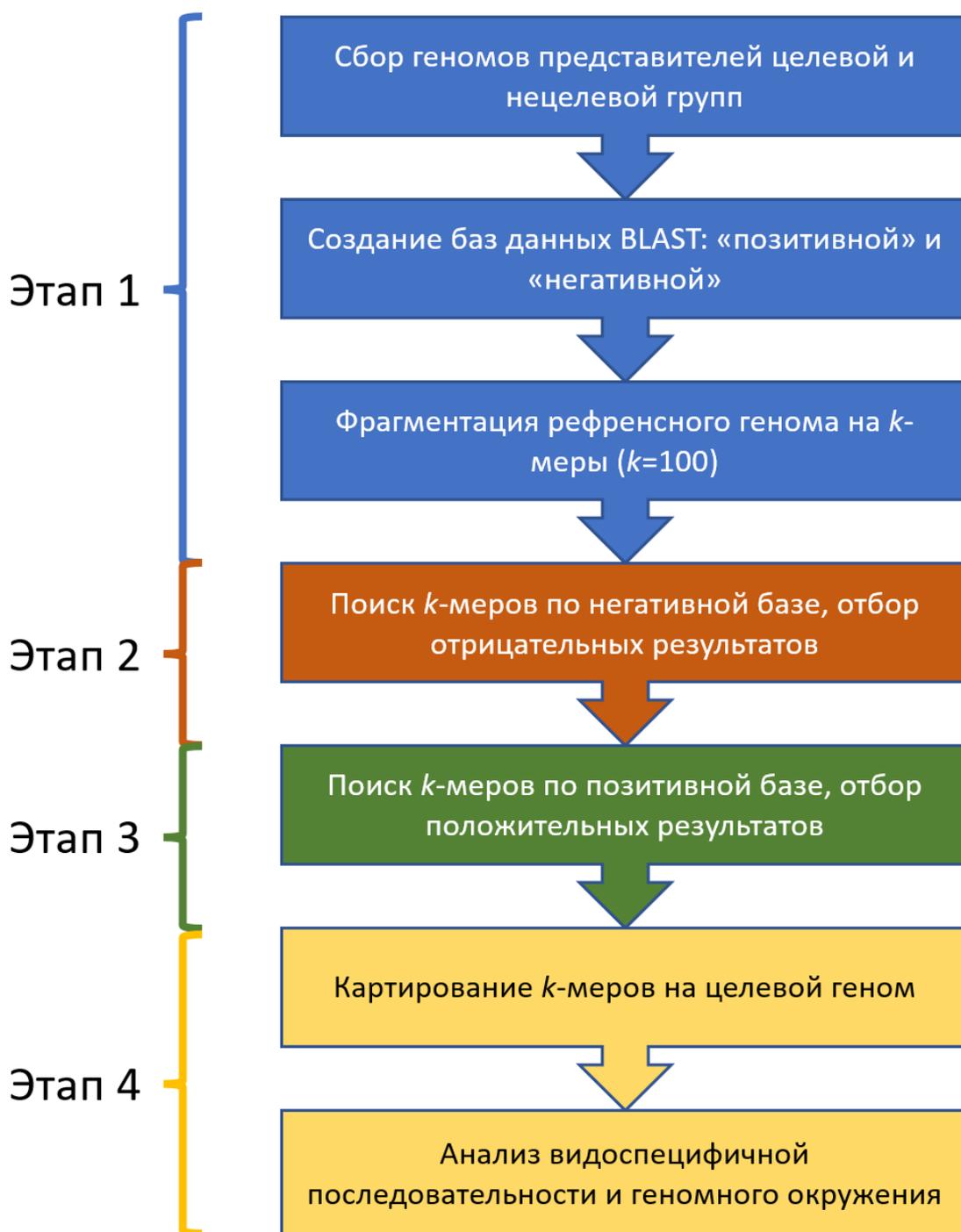


Рисунок 9. Блок-схема алгоритма поиска видоспецифических последовательностей.

Первый этап алгоритма, подготовительный, включал сбор данных из базы данных NCBI Genome (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>), создание локальных баз данных BLAST на основе геномов целевых (т. н. «положительные» базы) и нецелевых видов (т. н. «отрицательные» базы). Например, при поиске видоспецифичных участков *P. atrosepticum*, положительная база состояла из

переформатированных с помощью BLAST геномов, перечисленных в Приложении 2 пектобактериальных штаммов, классифицированных и подтверждённых геномным анализом как *P. atrosepticum*, а негативная – из всех остальных штаммов, перечисленных в Приложении 2. Подготовительный этап также включал фрагментирование референсного генома целевого вида на короткие последовательно расположенные перекрывающиеся последовательности длиной 100 п.о. с шагом 1 п.о. (k -меры, где $k = 100$) с использованием программы Emboss Splitter (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/splitter>). В качестве референсного генома использовался типовой штамм. Подобное фрагментирование позволяло определить границы видоспецифичной области путём сборки найденных уникальных для данного вида k -меров в случае, если размер области был больше размера k -мера, аналогично сборке генома *de novo* с использованием данных высокопроизводительного секвенирования.

Второй этап алгоритма состоял из поиска областей в нецелевых геномах, идентичных или схожих с k -мерами референсного целевого генома. Поиск проводили с помощью BLASTN с использованием негативной базы данных и параметров командной строки BLAST (scoring 2-3, gap cost 5 2, word size 11, E-value 10). В результате выполнения второго этапа алгоритма k -меры, гомологичные участкам нецелевых геномов, исключали из анализа как не видоспецифичные. Не гомологичные k -меры рассматривали на следующих этапах алгоритма как потенциальные части видоспецифичных геномных областей.

Задача третьего этапа алгоритма заключалась в проверке потенциальных видоспецифичных k -меров на присутствие во всех целевых геномах. Проверку осуществляли также с помощью BLASTN с теми же параметрами, как на этапе 2, но с использованием позитивной базы, содержащий все штаммы целевого вида. В результате выполнения третьего этапа алгоритма для дальнейшего анализа были отобраны k -меры, гомологичные участкам целевых геномов.

Четвёртый этап алгоритма состоял из картирования отобранных k -меров на референсный геном с помощью Geneious Mapper и дополнительной проверке найденных видоспецифичных участков с помощью поиска BLASTN на сервере NCBI с использованием базы nr/nt (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) на предмет наличия в геномах целевого вида и отсутствия или значительного отличия в других геномах. При выборе видоспецифичной последовательности для конструирования праймеров учитывали возможные функции гена, содержащего видоспецифичный участок, и соседних генов. Предпочтение отдавали участкам, которые могли быть важными для вирулентности и жизнедеятельности бактерии, например, относящимся к локусам систем секреции (Рисунок 10), и генам, не принадлежащим к числу часто передающихся с помощью горизонтальных переносов, таким, как гены устойчивости к антибиотикам.

Дизайн праймеров для ПЦР и зонда для qПЦР для выбранных видоспецифичных последовательностей, включая контроль образования возможных вторичных структур, осуществляли с помощью программы Primer3Plus (Untergasser et al., 2012.) с использованием стандартных настроек. Полученные олигонуклеотидные последовательности дополнительно проверяли поиском BLASTN на сервере NCBI с использованием базы nr/nt на отсутствие в нецелевых геномах с целью исключения ложноположительных результатов при проведении ПЦР.

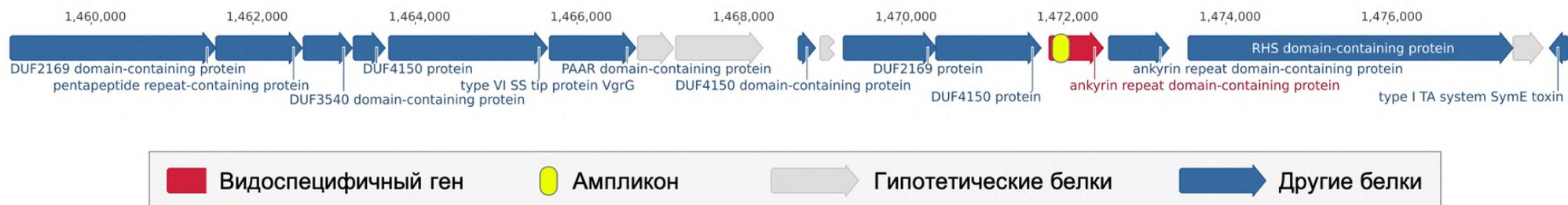


Рисунок 10. Генетическая карта области генома *P. parmentieri* RNS 08-42-1AT, содержащего видоспецифичный участок, полученная с помощью Geneious Prime 2020.

3.4. Выделение геномной ДНК из бактерий

Для выделения бактериальной ДНК, штаммы бактерий культивировали в жидкой среде LB при 28 °С до оптической плотности OD_{600} не менее 0,6. Затем полученные бактериальные суспензии по 1,5 мл помещали в пробирки и осаждали биомассу в течение 10 минут при 8000 g на центрифуге Eppendorf 5415D (Eppendorf, Германия). Супернатант сливали, а из полученного осадка выделяли ДНК с использованием набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoScientific, США) согласно протоколу производителя.

3.5. Выделение ДНК из картофеля

Для выделения тотальной (геномной и бактериальной) ДНК из зараженного картофеля использовали протокол выделения с использованием бромида цитриметиламмония (СТАВ,). Для этого кусочек кожуры массой 100 мг отрезали стерильным скальпелем и механически гомогенизировали в 0,1% растворе пиррофосфата натрия. Полученный гомогенат переносили в пробирки эппендорф на 1,5 мл и центрифугировали при 8000 g в течение 10 минут. К осадку добавляли 40 мкл раствора лизоцима (100 мг/мл) и 60 мкл 10% SDS, после чего инкубировали при 37 °С в течение 30 минут. После инкубации к смеси добавляли 580 мкл 2% СТАВ-буфера (СТАВ – 2% (масса/объем), NaCl – 8,82% (м/о), Трис – 0,1М, ЭДТА – 0,2М, pH = 7,2), перемешивали на вортексе и инкубировали еще 30 мин при 65 °С. Затем пробирки остужали до комнатной температуры и добавляли 700 мкл хлороформа. Полученную смесь перемешивали на вортексе до образования молочно-белой эмульсии и центрифугировали в течение 15 минут при 4 °С при 12000 g. Водную фазу аккуратно переносили в новую пробирку. Осаждение ДНК проводили добавлением 0,6 объема изопропанола в присутствии 0,3М ацетата натрия, смесь перемешивали и центрифугировали

10 мин при 12000 г. Изопропанол заменяли 70% этанолом, центрифугировали 5 мин при той же скорости, повторяли процедуру дважды. Полученный осадок высушивали на воздухе и ресуспендировали в 200 мкл стерильной воды.

3.6. Оценка концентрации и чистоты полученной ДНК

Концентрацию полученных образцов ДНК оценивали, используя спектрофотометр NanoProteometer N60 (NanoProteometer, Германия). О надлежащей чистоте образцов судили по значениям коэффициента A260/230 и A260/A280. После количественного измерения содержания ДНК образцы доводили до рабочей концентрации 10 нг/мкл. Вычисление концентрации исходя из поглощения производили автоматически с использованием программы NanoProteometer.

3.7. Условия проведения амплификации (ПЦР)

Полимеразную цепную реакцию проводили в объеме 25 мкл. Каждая реакционная смесь содержала 5 мкл окрашенной готовой реакционной смеси 5x ScreenMix (Евроген, Россия), содержащей высокопроцессивную Taq-полимеразу, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, Mg²⁺, ПЦР буфер и красители для дальнейшего нанесения на гель. В каждую реакцию добавляли 5x ScreenMix, 0,35 mM прямого и обратного праймеров (PatF+PatR для *P. atrosepaticum*, PparF+PparR для *P. parmentieri*, PverF+PverR для *P. versatile*, и PbrF+PbrR для *P. brasiliense*) и 60 нг ДНК. Последовательности праймеров для каждого выбранного участка приведены в разделе 4.2. Синтез праймеров был проведен на заказ в ЗАО Евроген (Россия).

Концентрация каждого дезоксинуклеозидтрифосфата (дНТФ) в конечной концентрации составляла 0,12 mM, концентрация MgCl₂ – 2 mM.

Амплификацию проводили в термоциклере T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Условия амплификации отражены ниже (Таблица 2).

Таблица 2. Условия проведения реакции амплификации

Стадия	Температура, °С	Длительность, сек	Число повторов
Активация полимеразы	94	300	1
Денатурация	94	20	28
Отжиг	62	10	
Элонгация	72	20	
Достройка	72	180	1
Хранение	4	∞	1

3.8. Проведение электрофореза в агарозном геле

Полученные ПЦР-продукты разделяли в 1,5% агарозном геле и визуализировали добавлением бромистого этидия. Для приготовления геля и проведения электрофореза был использован 1x TAE буфер (50x буфер, г/л: Трис – 242,2 г, ЭДТА – 18,6, ледяная уксусная кислота – 89,6, H₂O - 773). Электрофорез проводили при напряжении 14 В/см геля. Для определения размера полученных полос использовали маркер длин 1 kb DNA Ladder (Евроген, Россия).

3.9. Получение компетентных клеток *E. coli*

Для получения хемокомпетентных клеток для последующих этапов проведения трансформаций, штамм *E. coli* NovaBlue (Novagen, США)

культивировали в 250 мл среды Psi broth (дрожжевой экстракт – 5 г/л, триптон – 20 г/л, MgSO₄ – 5 г/л, pH = 7,6) при 37°C и аэрации 200 об/мин до достижения оптической плотности OD₆₀₀ = 0,6. При Суспензию клеток аликвотировали в пробирки по 50 мл и инкубировали 15 минут на льду. Все дальнейшие действия также проводили на льду. После охлаждения клеток, их центрифугировали при 4000 g при 4°C в течение 10 мин (центрифуга Jouan BR4, ротор АВ50-10А, Франция). Клетки бактерий ресуспендировали в 0,4 объема ледяного буфера Tfb1 (на 100 мл: CH₃COOK – 30 мМ, RbCl -100 мМ, CaCl₂– 10мМ, MgCl₂ – 50 мМ, глицерин 15% о/о, pH = 5,8) и инкубировали на льду 15 минут. Затем смесь снова осаждали и ресуспендировали в 0,04 объема буфера Tfb2 (MOPS – 10 мМ, RbCl -10 мМ, CaCl – 75 мМ, глицерин 15% о/о, pH = 6,5). После 15 минут инкубации на льду суспензию клеток аликвотировали в пробирки 1,5 мл по 100 мкл и немедленно замораживали в жидком азоте. Клетки хранили при -80°C

3.10. Конструирование плазмид

Для точной оценки чувствительности и эффективности ПЦР для видоспецифичной детекции пектобактерий, были сконструированы плазмиды, содержащие вставку целевого участка, амплифицируемого для видоспецифичной детекции каждого из четырех патогенов, на которых сфокусирована данная работа (*P. atrosepaticum*, *P. parmentieri*, *P. versatile*, *P. brasiliense*). Для этого каждый соответствующий уникальный участок геномной ДНК бактерий был амплифицирован с подобранным для видоспецифичной детекции набором праймеров для детекции каждого из четырех видов.

Полученный ПЦР продукт очищали на колонках с использованием набора MinElute® PCR Purification kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя.

Очищенный ПЦР-продукт клонировали в вектор pAL2-T (Евроген, Россия) с использованием набора для ТА-клонирования Quick-TA kit (Евроген, Россия).

Данный вектор представляет из себя линейризованную плазмиду с выступающими фосфорилированными 3'-концевыми тимидинами. Это свойство позволяет лигировать в данный вектор, не прибегая к предварительной ферментативной обработке, свежий ПЦР-продукт, полученный с использованием Taq-полимеразы, поскольку данная полимераза достраивает на 3' конце синтезированной цепи дезоксиаденозин, который комплементарно спаривается с тимидином на векторе.

Также плазида содержит кассету устойчивости к ампициллину в качестве селективного маркера (Рисунок 11).



Рисунок 11. Схема эксперимента с получением тестовых плазмид

Реакционная смесь (10 мкл) для лигирования содержала: 1 мкл Quick-TA T4 ДНК лигазы, 1 мкл 10x буфера для лигирования, 8 мкл свежечищенного ПЦР продукта. Лигирование проводили в течение 16 часов при 14 °С.

После полным объемом лигазной смеси проводили трансформацию *E. coli* NovaBlue (см. раздел 3.11).

Всего в работе было получено четыре плазмиды:

- 1) pAL2-T-Pat – со вставкой участка, амплифицированного праймерами PatF+PatR с геномной ДНК *P. atrosepticum* F162,

- 2) pAL2-T-Ppar – со вставкой участка, амплифицированного праймерами PparF+PparR геномной ДНК *P. parmentieri* F127,
- 3) pAL2-T-Pver – со вставкой участка, амплифицированного праймерами PverF+PverR геномной ДНК *P. versatile* F002,
- 4) pAL2-T-Pbr – со вставкой участка, амплифицированного праймерами PbrF+PbrR геномной ДНК *P. brasiliense* F126.

3.11. Трансформация

Для трансформации компетентных клеток к 100 мкл хемокомпетентных клеток *E. coli* NovaBlue добавляли 10 мкл полученной лигазной смеси (см. раздел 3.10) и инкубировали на льду в течение 30 мин. Далее пробирки с клетками перемещали в твердотельный термостат (ДНК Технология, Россия) на 42°C и инкубировали 30 секунд, после чего возвращали на лед. После остывания к клеткам добавляли 1 мл питательной среды SOC триптон – 20 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 10 мМ, KCl – 2,5 мМ, MgCl₂ – 10 мМ, MgSO₄ – 10 мМ, глюкоза - 20 мМ) и инкубировали при 37°C и 250 об/мин в течение полутора часов. По истечении этого времени 100 мкл клеток высевали на чашки Петри с агаризованной питательной средой LB с добавлением ампициллина в концентрации 100 мкг/мл и инкубировали при 37°C до появления колоний.

Далее 10-15 колоний отсевали на свежую чашку с ампициллином и использовали для отбора клонов, содержащих плазмиду со вставкой. Для этого подрощенную биомассу стерильным наконечником пипетки добавляли в ПЦР смесь (см. раздел 3.7) с соответствующей парой праймеров (PatF+PatR для плазмиды pAL2-T-Pat, PparF+PparR плазмиды pAL2-T-Ppar, PverF+PverR для плазмиды pAL2-T-Pver, и PbrF+PbrR для плазмиды pAL2-T-Pbr) и проводили амплификацию. Наличие ПЦР-продукта соответствующей длины (около 200 н.п) свидетельствовало об успешно прошедшей вставке.

3.12. Выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК из клеток *E. coli* NovaBlue, полученных в результате отбора успешных трансформантов (см. раздел 3.11), культуры подращивали в 4 мл жидкой среды с ампициллином в течение ночи, после чего клетки осаждали центрифугированием, а из полученного осадка выделяли плазмидную ДНК с использованием набора QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя.

Успешное выделение плазмиды регистрировали, измеряя концентрацию ДНК в полученном растворе с очищенной плазмидой (См. раздел 3.6) и на 1,5% агарозном геле (См. раздел 3.8).

Корректность вставки проверяли секвенированием полученной плазмиды по Сэнгеру (Евроген, Россия).

3.13. Условия проведения ПЦР в реальном времени (qПЦР)

ПЦР в реальном времени (qПЦР) проводили в термоциклере LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Каждая реакция объемом 35 мкл содержала 0,2 мМ каждого дНТФ, 0,2 мМ зонда, 0,35 мМ прямой и обратный праймер и 60 нг ДНК. Условия проведения qПЦР приведены ниже (Таблица 3).

Таблица 3. Условия проведения qПЦР реакции

Стадия	Температура, °С	Длительность, секунд	Число повторов
Активация полимеразы	94	300	1
Денатурация	94	10	45
Отжиг	62	10	
Элонгация	72	10	
Хранение	4	∞	1

В качестве положительного контроля использовали реакции с добавлением плазмид pAL2-T-Pat, pAL2-T-Par, pAL2-T-Pver и pAL2-T-br. В качестве негативного контроля использовали реакции с добавлением воды вместо матрицы.

Кроме того, был использован внутренний контроль для исключения ложноотрицательных результатов. Внутренний контроль представлял из себя плазмиду со специфическим участком 560 п.о (Ryazantsev et al., 2008), праймеры и зонд для амплификации данного участка. Эти компоненты добавляли в каждую реакцию, и таким образом амплификация внутреннего контроля и участка для видоспецифичной детекции происходила одновременно, позволяя исключить ложноотрицательные результаты.

Обработку данных амплификации и вычисление пороговых циклов амплификации (C_q) производили с помощью ПО LightCycler 96 SW 1.1, поставляемого Roche в комплекте с термоциклером.

Каждая реакция была сделана в двух повторностях. Каждый эксперимент независимо повторяли дважды. Для четырех полученных технических повторностей каждого значения, приведенного в работе, рассчитывали стандартное отклонение (SD), приведенное на всех графиках и таблицах.

3.14. Определение чувствительности и эффективности ПЦР

Для определения предела чувствительности метода проводили десятикратные разведения тестовой плазмиды (pAL2-T-Pat, pAL2-T-Par, pAL2-T-Pver и pAL2-T-br) и геномной ДНК, с которой изначально была амплифицирована лигированная в плазмиду последовательность (*P. atrosepticum* SCRI 1043, *P. parmentieri* F127, *P. versatile* F016, *P. brasiliense* F128). Для каждого разведения на основании концентрации ДНК и размера исследуемой молекулы вычисляли число копий по следующей формуле:

$$\text{Число копий} = \frac{C(\text{нг}) \times N_A}{L(\text{п.о.}) \times 10^9 \times 660}$$

где C – концентрация ДНК в нг, N_A – число Авогадро, L – размер исследуемой ДНК, 10^9 – фактор конверсии, а 660 – средняя масса нуклеотида.

В качестве предела чувствительности вычисляли минимальное количество копий на мл, детектируемое ПЦР системой.

После проведения qПЦР были построены калибровочные графики зависимости порогового цикла реакции от количества копий последовательности на реакцию в логарифмической шкале и определено уравнение линейной зависимости в каждом случае. Эффективность ПЦР вычисляли по следующей формуле:

$$E = -1 + 10^{(-1/a)}$$

Где E – эффективность ПЦР, a – коэффициент наклона полученной кривой.

3.15. Тестирование системы детекции на искусственно зараженных растениях

Для получения искусственно зараженных клубней использовали картофель наиболее распространенного в России сорта «Гала» (Norika, Гросс-Люзвитц, Германия). Здоровые, однородные клубни были тщательно промыты проточной водой, после чего были обработаны в течение 15 мин 3%-ным раствором перекиси водорода для поверхностной стерилизации и трижды тщательно промыты стерильной дистиллированной водой. Затем картофель высушивали на воздухе, после чего на поверхность клубней стерильным скальпелем наносили насечки глубиной 1 мм. Клубни замачивали в бактериальной суспензии в течение ночи, после чего снова высушивали и инкубировали при 28 °С в закрытом химическом стакане с подложкой из

влажной фильтровальной бумаги. Контрольный клубень замачивали в питательной среде без бактерий. После 24 ч инкубации стерильным скальпелем срезали кусочек биомассы без видимых симптомов поражения и использовали для выделения тотальной ДНК (Рисунок 12).

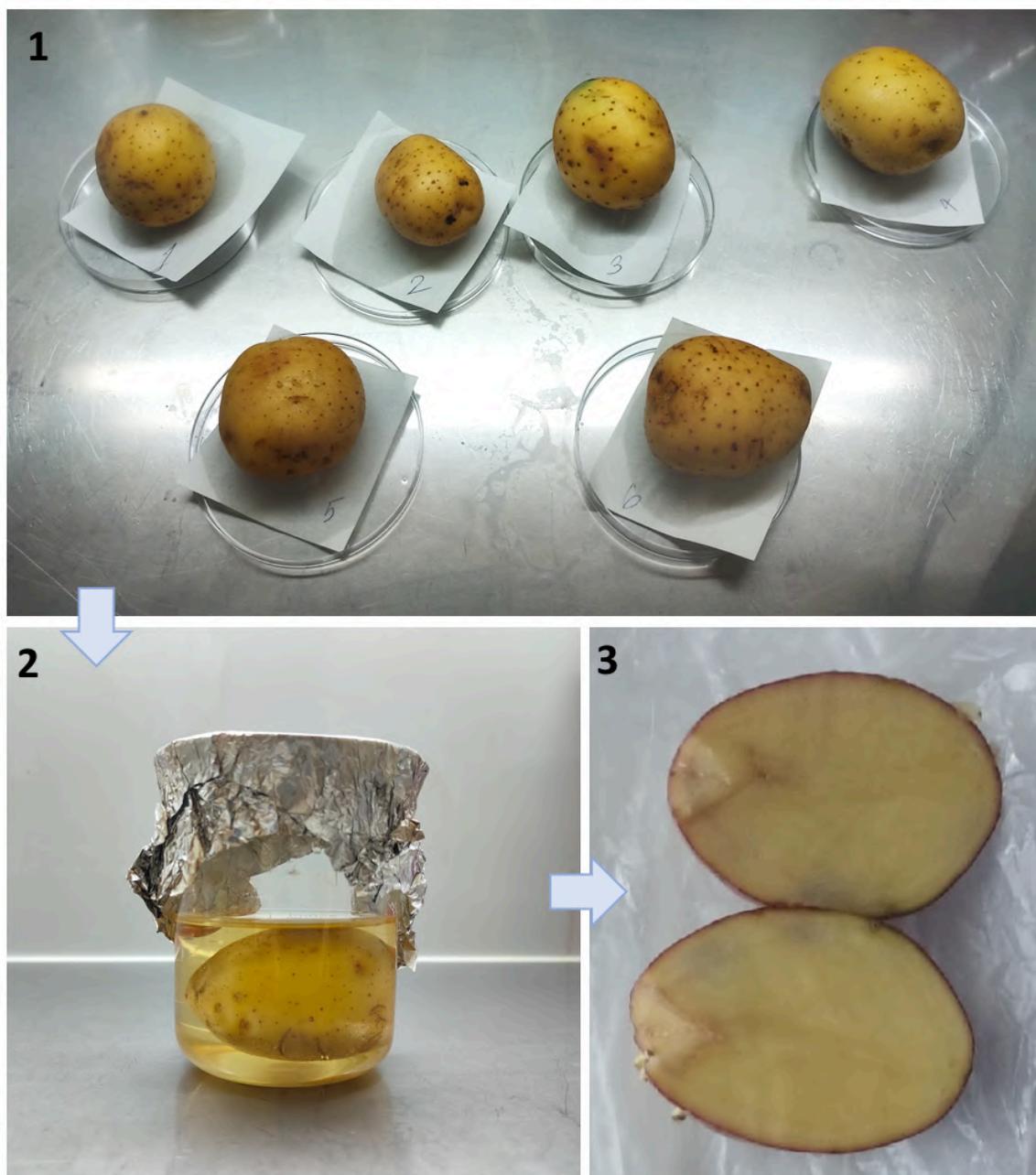


Рисунок 12. Получение искусственно зараженных растений для проверки возможности детекции патогена в экстракте растительной ткани

Тотальная ДНК была выделена из кусочка ткани, не подверженного симптомам гниения, и проведена оценка инфицированности полученных

тканей посредством qПЦР. В качестве контроля использовали визуально здоровый картофель, вымоченный в питательной среде вместо бактериальной суспензии

Для оценки возможного влияния компонентов картофельного сока на течение реакции и исключения ложноотрицательных результатов из-за ингибирования, эксперимент с определением чувствительности реакции был повторен с добавлением 5 мкл картофельного экстракта в реакционную смесь.

3.16. Тестирование системы детекции собранных в Московской области в 2020-2021 годах

Для оценки распространения целевых видов пектобактерий в Московской области было взято 59 образцов картофеля, собранных в 2020-2021 годах. Для тестирования из образцов выделяли ДНК как описано в 3.5, и с полученной тотальной ДНК ставили qПЦР реакции как описано 3.13 для детекции всех четырех патогенов, на которых сфокусирована работа.

Глава 4. Результаты и обсуждение¹

3.17. Геномный анализ

Первой задачей данной работы было проведение геномного анализа с использованием доступных полных геномов МГП. Подобный анализ необходим для того, чтобы создать базы данных каждого интересующего таксона и исключить из них некорректно атрибутированные геномы. Полный геном первого секвенированного представителя МГП, *P. atrosepticum* SCRII 1046 (в данной работе он упоминается также под внутренним номером F162), был опубликован в 2004 году (Bell et al., 2004). В настоящий момент открытые базы данных содержат уже более 200 полных геномов МГП. Такое количество информации позволяет провести более точный геномный анализ, используя методы общегеномного сравнения и филогенетический анализ с использованием отдельных генов. Геномный анализ проводился с помощью анализа среднегеномного сходства и филогенетического анализа с использованием отдельных генов, включая гены 16S рРНК и консервативные гены, с использованием геномных последовательностей, указанных в Приложении 3.

¹ Основные результаты, изложенные в данной главе, опубликованы в следующих научных статьях автора в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова:

1. Development of qPCR detection assay for potato pathogen *Pectobacterium atrosepticum* based on a unique target sequence / Anna A. Lukianova, Peter V. Evseev, Alexander A. Stakheev, Irina B. Kotova, Sergey K. Zavriev, Alexander N. Ignatov, Konstantin A. Miroshnikov. // *Plants*. — 2021. — Vol. 10, no. 2. — P. 355–367. **(IF WoS = 4,67)**
2. First report of *Pectobacterium polaris* causing soft rot and black leg of potato in Russia / Maya V. Voronina, Anna A. Lukianova, Mikhail M. Shneider, Aleksei A. Korzhenkov, Stepan V. Toschakov, Kostantin A. Miroshnikov, Dmitri M. Vasiliev, Aleksandr Ignatov. // *Plant Disease*. — 2021. — P. PDIS-09-20-1864-PDN. **(IF WoS = 1,68)**
3. Quantitative real-time PCR assay for the detection of *Pectobacterium parmentieri*, a causal agent of potato soft rot / Anna A. Lukianova, Peter V. Evseev, Alexander A. Stakheev, Irina B. Kotova, Sergey K. Zavriev, Alexander N. Ignatov, Konstantin A. Miroshnikov. // *Plants*. — 2021. — Vol. 10, no. 9. — P. 1880–1892. **(IF WoS = 4,67)**
4. Use of a specific phage cocktail for soft rot control on ware potatoes: A case study. / Eugenia N. Bugaeva, Maya V. Voronina, Dmitriy M. Vasiliev, Anna A. Lukianova, Nikolay N. Landyshev, Alexander N. Ignatov, Konstantin A. Miroshnikov. // *Viruses*, 13(6):1095–1095, 2021. DOI: 10.3390/v13061095 **(IF WoS = 5,81)**

Одним из наиболее популярных методов сравнения полных геномов является кластеризация по признаку среднегеномного сходства (ANI, average nucleotide identity). Пороговым значением в таком анализе, позволяющем сказать, что два генома принадлежат организмам одного вида, считается 95-96% (Chun et al., 2018). Кластеризация по данному признаку является важным параметром, который следует учитывать при таксономическом анализе (Рисунок 13, 14), однако одного только этого признака недостаточно.

Для многих представителей *Pectobacterium* характерно высокое общегеномное сходство и ANI близки к пороговым. Кроме того, для некоторых близких видов, например, *P. carotovorum* и *P. versatile*, *P. polaris* и *P. parvum* эти значения могут быть и вовсе выше пороговых. В то же время, между этими видами могут быть существенные отличия. Например, *P. versatile* формируют отдельную кладу с применением более точных методов анализа, использующих конкатенированные (соединённые друг с другом в одну общую последовательность) гены и, кроме того, имеют биохимические отличия (Portier et al., 2019), а *P. parvum* от *P. polaris* отличается наличием SPI-1-подобной системы секреции III типа (Pasanen et al., 2020).

При оценке таксономической принадлежности новых штаммов рода *Pectobacterium*, опубликованных в 2020-2021 гг. и депонированных Институтом экологии и наук об окружающей среде (Университет Сорбонна, Париж), нами был отмечен высокий уровень среднегеномного сходства, вычисленного при помощи orthoANI, (ANI от 98,8 до 100%) этих штаммов друг с другом. Из описанных видов пектобактерий наибольшее сходство по этому признаку данная группа штаммов разделяет с *P. aquaticum* (Рисунок 15).

На приведенном рисунке отображена матрица общегеномного сходства, сделанная нами для типовых штаммов всех видов семейства *Pectobacteriaceae* и вновь зарегистрированных штаммов *Pectobacterium* sp. При использовании алгоритма orthoANI выявлено, что сходство с ближайшим родственным видом близко к пороговому значению и составляет 95,6%, поэтому эту группу штаммов необходимо рассматривать как потенциально новый вид.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
1	<i>S. glossinidius</i>	100	86	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	
2	<i>S. praecipitvus</i>	86	100	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	78	
3	<i>P. fontis</i>	78	78	100	87	87	87	87	87	87	87	87	87	87	87	87	87	87	87	87	87	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
4	<i>P. aroidearum</i>	78	78	87	100	89	89	89	89	89	89	89	89	88	88	88	88	88	88	88	88	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
5	<i>P. actinidiae</i>	78	78	87	89	100	92	92	92	92	92	92	92	88	88	88	88	88	88	88	88	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
6	<i>P. aquaticum</i>	78	78	87	89	92	100	94	94	94	94	93	93	93	88	88	88	88	88	88	88	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
7	<i>P. odoriferum</i>	78	78	87	89	92	94	100	95	95	93	93	93	88	88	88	88	88	88	88	88	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
8	<i>P. carotovorum</i>	78	78	87	89	92	94	95	100	95	93	93	93	88	88	88	88	88	88	88	88	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
9	<i>P. versatile</i>	78	78	87	89	92	94	95	95	100	93	93	93	88	88	88	88	88	88	88	88	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
10	<i>P. brasiliense</i>	78	78	87	89	92	93	93	93	93	100	93	93	88	88	88	88	88	88	88	88	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
11	<i>P. parvum</i>	78	78	87	89	92	93	93	93	93	93	100	96	88	88	88	88	88	88	88	88	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
12	<i>P. polaris</i>	78	78	87	89	92	93	93	93	93	93	96	100	88	88	88	88	88	88	88	88	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
13	<i>P. zantedeschiae</i>	78	78	87	88	88	88	88	88	88	88	88	100	91	91	89	89	89	89	89	89	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
14	<i>P. betavasculorum</i>	78	78	87	88	88	88	88	88	88	88	88	91	100	92	92	89	89	89	89	89	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
15	<i>P. atrosepticum</i>	78	78	87	88	88	88	88	88	88	88	88	91	92	100	93	89	89	89	89	89	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
16	<i>P. peruvienne</i>	78	78	87	88	88	88	88	88	88	88	88	91	92	93	100	89	89	89	89	89	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
17	<i>P. polonicum</i>	78	78	87	88	88	88	88	88	88	88	88	89	89	89	89	100	94	91	91	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
18	<i>P. punjabense</i>	78	78	87	88	88	88	88	88	88	88	88	89	89	89	89	94	100	91	91	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
19	<i>P. parmentieri</i>	78	78	87	88	88	88	88	88	88	88	88	89	89	89	89	91	91	100	94	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
20	<i>P. wasabiae</i>	78	78	87	88	88	88	88	88	88	88	88	89	89	89	89	91	91	94	100	80	80	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
21	<i>B. goodwinii</i>	78	78	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	84	100	84	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79
22	<i>B. nigrifluens</i>	78	78	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	84	100	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79
23	<i>L. britannica</i>	78	78	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	100	88	88	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
24	<i>L. iberica</i>	78	78	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	88	100	91	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
25	<i>L. quercina</i>	78	78	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	88	91	100	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	
26	<i>D. paradisiaca</i>	78	78	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	100	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81	81	
27	<i>D. aquatica</i>	78	78	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	81	100	88	82	82	82	82	82	82	82	82	82	
28	<i>D. lacustris</i>	78	78	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	81	88	100	82	82	82	82	82	82	82	82	82	
29	<i>D. zaeae</i>	78	78	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	81	82	82	100	85	85	85	85	85	85	85	85	
30	<i>D. chrysanthemi</i>	78	78	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	81	82	82	85	100	86	86	86	86	86	86	86	
31	<i>D. undicola</i>	78	78	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	81	82	82	85	86	100	89	89	89	89	89	89		
32	<i>D. dianthicola</i>	78	78	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	81	82	82	85	86	89	100	92	92	92	92	92		
33	<i>D. fangzhongdai</i>	78	78	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	81	82	82	85	86	89	92	100	92	92	92	92		
34	<i>D. solani</i>	78	78	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	81	82	82	85	86	89	92	92	100	94	94	94		
35	<i>D. dadantii</i>	78	78	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	81	82	82	85	86	89	92	92	94	100	97	97		
36	<i>D. d. dieffenbachiae</i>	78	78	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	79	81	82	82	85	86	89	92	92	94	97	100	100		

Рисунок 13. Матрица среднегеномного сходства (ANI) для таксонов семейства *Pectobacteriaceae*. Значения среднегеномного сходства вычислены при помощи orthoANI. Кластеризация геномов сделана на основании полученных значений ANI с помощью алгоритма BIONJ, использующего метод присоединения соседей с применением модели первого порядка дисперсий и ковариаций оценок эволюционного расстояния.

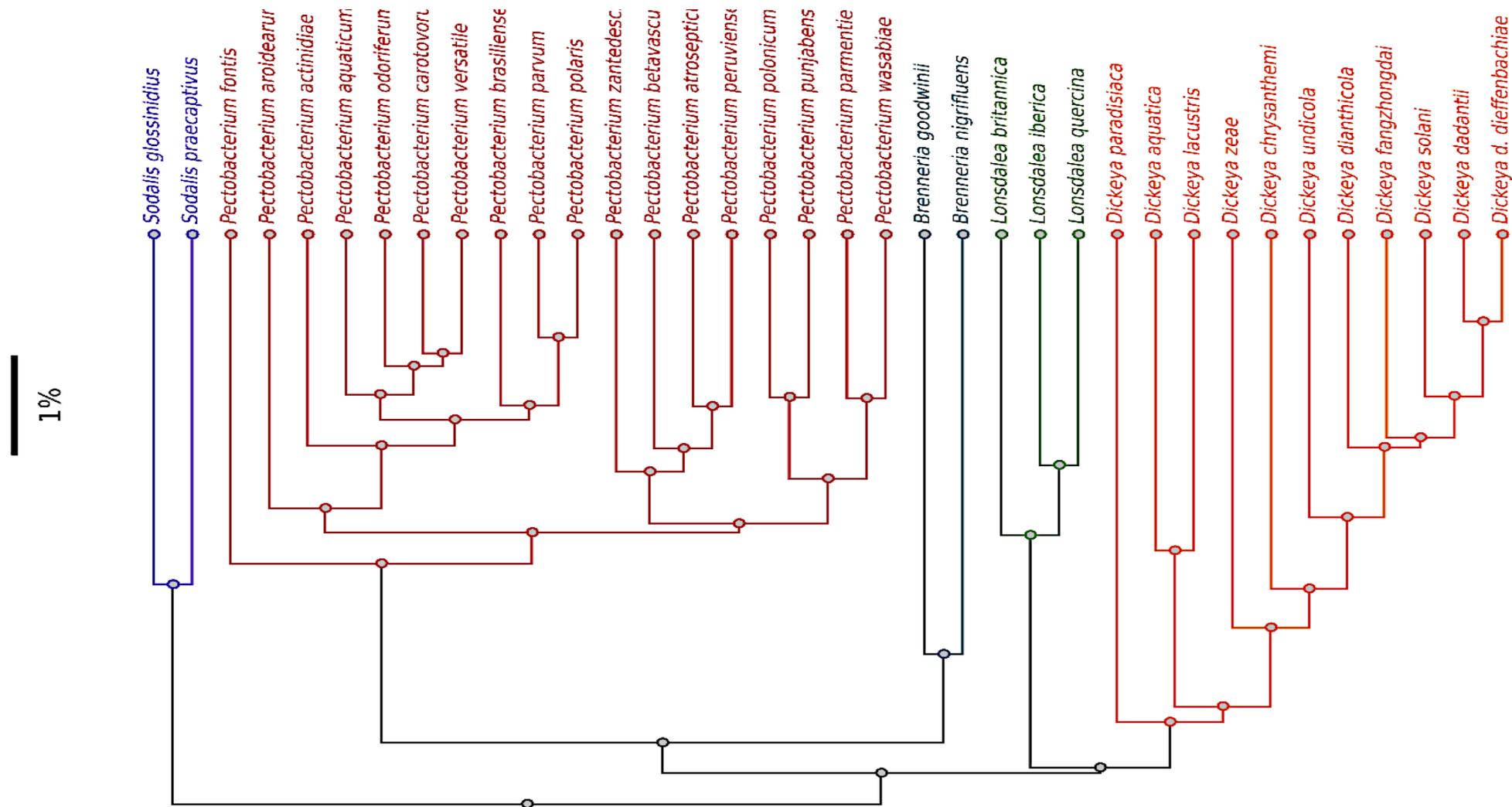


Рисунок 14. Дендрограмма, полученная на основании кластеризации матрицы среднегеномного сходства онлайн-сервера Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr/>).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50		
1	Dickeya chrysanthemi NCPPB 402	100	86.1	85.9	85.9	86	85.9	86	85.6	79.9	79.8	78.7	76.4	76.3	76.1	76.2	76.4	73.7	75.9	76.2	75.6	76.6	76.5	76.1	76.2	75.6	75.3	74.7	74.8	75.4	74.9	75.4	75.4	75.1	75	75.4	76.2	76.2	75.5	74.5	75.9	75.8	75.7	75.7	75.7	75.6	75.6	75.6	75.7	75.7	75.7	
2	Dickeya zeae NCPPB 2538	86.1	100	85.3	85.3	85.5	85.4	85.4	85	79.4	79.2	78.1	75.8	75.7	75.5	75.6	75.9	73.1	75.3	75.7	75.1	76.1	75.9	75.6	75.6	75	74.8	74.1	74.2	74.8	74.3	74.8	74.8	74.6	74.4	74.9	75.6	75.6	75	73.9	75.4	75.2	75.2	75.2	75.1	75	75.1	75	75.1	75.1	75.1	75.1
3	Dickeya poaeiphila NCPPB 569	85.9	85.3	100	85.6	85.7	85.6	85.7	85.3	79.7	79.5	78.4	76.1	76	75.8	75.9	76.1	73.4	75.6	76	75.3	76.3	76.2	75.9	75.3	75	74.4	74.5	75.1	74.6	75.1	74.9	74.7	75.2	75.9	75.9	75.3	74.2	75.6	75.5	74.2	75.6	75.5	75.4	75.4	75.4	75.3	75.3	75.3	75.4	75.4	75.4
4	Dickeya dianthicola NCPPB 453	85.9	85.3	85.6	100	92	91.8	91.9	89.7	80.2	80	78.9	76.6	76.5	76.3	76.4	76.6	73.9	76.1	76.5	75.9	76.8	76.7	76.4	76.4	76.4	75.8	75.5	74.9	75	75.6	75.1	75.6	75.6	75.4	75.2	75.7	76.4	76.4	75.8	74.7	76.2	76	76	75.9	75.9	75.8	75.8	75.8	75.9	75.9	75.9
5	Dickeya fangzhongdai DSM 101947	86	85.5	85.7	92	100	92.2	92.3	89.8	80.3	80.1	79	76.7	76.6	76.4	76.5	76.8	74	76.2	76.6	76	77	76.9	76.5	76.5	75.9	75.7	75	75.1	75.7	75.2	75.7	75.7	75.5	75.3	75.8	76.5	76.5	75.9	74.8	76.3	76.1	76.1	76.1	76	75.9	76	75.9	76	76	76	
6	Dickeya dadantii NCPPB 898	85.9	85.4	85.6	91.8	92.2	100	93.9	89.7	80.2	80	78.9	76.6	76.5	76.3	76.4	76.7	73.9	76.1	76.5	75.9	76.9	76.7	76.4	76.4	75.8	75.6	74.9	75	75.6	75.1	75.6	75.6	75.4	75.2	75.7	76.4	76.4	75.8	74.7	76.2	76	76	76	75.9	75.8	75.8	75.8	75.9	75.9	75.9	
7	Dickeya solani IPO 2222	86	85.4	85.7	91.9	92.3	93.9	100	89.7	80.2	80.1	79	76.7	76.6	76.4	76.5	76.7	74	76.2	76.5	75.9	76.9	76.8	76.4	76.5	75.9	75.6	75	75.1	75.7	75.2	75.7	75.7	75.4	75.3	75.7	76.5	76.5	75.8	74.8	76.2	76.1	76	76	76	75.9	75.9	75.9	76	76	76	
8	Dickeya undicola 2B12	85.6	85	85.3	89.7	89.8	89.7	89.7	100	79.8	79.7	78.6	76.3	76.2	76	76.1	76.3	73.6	75.8	76.1	75.5	76.5	76.4	76.1	76.1	75.5	75.2	74.6	74.7	75.3	74.8	75.3	75.3	75	74.9	75.3	76.1	76.1	75.4	74.4	75.8	75.7	75.6	75.6	75.6	75.5	75.5	75.5	75.5	75.5	75.5	75.5
9	Dickeya aquatica 174/2	79.9	79.4	79.7	80.2	80.3	80.2	79.8	100	87.3	77.9	75.6	75.5	75.3	75.4	75.6	72.8	75.1	75.4	74.8	75.8	75.7	75.3	75.3	74.8	74.5	73.8	73.9	74.6	74	74.5	74.5	74.3	74.2	74.6	75.4	75.3	74.7	73.7	75.1	74.9	74.9	74.9	74.9	74.9	74.9	74.9	74.9	74.9	74.9	74.9	74.9
10	Dickeya lacustris S29	79.8	79.2	79.5	80	80.1	80	80.1	79.7	87.3	100	77.7	75.4	75.3	75.1	75.2	75.4	72.7	74.9	75.3	74.6	75.6	75.5	75.2	75.2	74.6	74.3	73.7	73.8	74.4	73.9	74.4	74.4	74.2	74	74.5	75.2	75.2	74.6	73.5	75	74.8	74.7	74.7	74.7	74.6	74.6	74.6	74.7	74.7	74.7	
11	Dickeya paradisiaca NCPPB 2511	78.7	78.1	78.4	78.9	79	78.9	79	78.6	77.9	77.7	100	75.8	75.7	75.5	75.6	75.9	73.1	75.3	75.7	75.1	76.1	76	75.6	75.6	75	74.8	74.1	74.2	74.8	74.3	74.8	74.8	74.6	74.4	74.9	75.6	75.6	75	73.9	75.4	75.2	75.2	75.2	75.1	75	75.1	75	75.1	75.1	75.1	
12	Lonsdalea populi N-5-1	76.4	75.8	76.1	76.6	76.7	76.6	76.7	76.3	75.6	75.4	75.8	100	90.3	89.2	89.3	76.1	73.3	75.6	75.9	75.3	76.3	76.2	75.8	75.8	75.3	75	74.3	74.4	75.1	74.5	75	75	74.8	74.7	75.1	75.9	75.8	75.2	74.2	75.6	75.4	75.4	75.4	75.4	75.4	75.4	75.4	75.4	75.4		
13	Lonsdalea britannica LMG 26268	76.3	75.7	76	76.5	76.6	76.5	76.6	76.2	75.5	75.3	75.7	90.3	100	89.1	89.2	76	73.2	75.5	75.8	75.2	76.2	76.1	75.7	75.7	75.2	74.9	74.2	74.3	75	74.4	74.9	74.9	74.7	74.6	75	75.8	75.7	75.1	74.1	75.5	75.3	75.3	75.3	75.3	75.3	75.3	75.3	75.3			
14	Lonsdalea iberica LMG 26265	76.1	75.5	75.8	76.3	76.4	76.3	76.4	76	75.3	75.1	75.5	89.2	89.1	100	91.6	75.8	73	75.3	75.6	75	76	75.9	75.5	75.5	75	74.7	74	74.1	74.8	74.2	74.7	74.7	74.5	74.4	74.8	75.6	75.5	74.9	73.9	75.3	75.1	75.1	75.1	75.1	74.9	75	75.1	75.1	75.1		
15	Lonsdalea quercina ATCC 29281	76.2	75.6	75.9	76.4	76.5	76.4	76.5	76.1	75.4	75.2	75.6	89.3	89.2	91.6	100	75.9	73.1	75.4	75.7	75.1	76.1	76	75.6	75.6	75	74.8	74.1	74.2	74.9	74.3	74.8	74.8	74.6	74.5	74.9	75.6	75.6	75	74	75.4	75.2	75.2	75.2	75.2	75	75.1	75.1	75.1	75.2	75.2	
16	Brenneria sp. L3-3HA	76.4	75.9	76.1	76.6	76.8	76.7	76.7	76.3	75.6	75.4	75.9	76.1	76	75.8	75.9	100	75	76.1	76.4	75.8	76.8	76.7	76.3	76.3	75.7	75.5	74.8	74.9	75.6	75	75.5	75.5	75.3	75.2	75.6	76.3	76.3	75.7	74.7	76.1	75.9	75.9	75.9	75.9	75.9	75.9	75.9	75.9	75.9		
17	Acerihabitans arboris SAP-6	73.7	73.1	73.4	73.9	74	73.9	74	73.6	72.8	72.7	73.1	73.3	73.2	73	73.1	75	100	73.3	73.6	73	74	73.9	73.6	73.6	73	72.7	72.1	72.2	72.8	72.3	72.8	72.8	72.6	72.4	72.9	73.6	73.6	72.9	71.9	73.3	73.2	73.1	73.1	73.1	73	73	73	73.1	73.1	73.1	
18	Brenneria alni NCPPB 3934	75.9	75.3	75.6	76.1	76.2	76.1	76.2	75.8	75.1	74.9	75.3	75.6	75.5	75.3	75.4	76.1	73.3	100	84.3	83	80.9	80.8	80.5	80.5	78.4	78.2	77.5	77.6	78.3	77.7	78.2	78.2	78	77.9	78.3	79	79	78.4	77.4	78.8	78.6	78.6	78.6	78.6	78.4	78.5	78.5	78.5	78.6		
19	Brenneria niqifluens DSM 30175	76.2	75.7	76	76.5	76.6	76.5	76.5	76.1	75.4	75.3	75.7	75.9	75.8	75.6	75.7	76.4	73.6	84.3	100	83.4	81.3	81.2	80.8	80.8	78.8	78.5	77.9	78	78.6	78.1	78.5	78.5	78.3	78.2	78.6	79.4	79.4	78.7	77.7	79.1	78.9	78.9	78.9	78.9	78.9	78.9	78.9	78.9			
20	Brenneria goodwinii FRB141	75.6	75.1	75.3	75.9	76	75.9	75.9	75.5	74.8	74.6	75.1	75.3	75.2	75	75.1	75.8	73	83	83.4	100	80.7	80.5	80.2	80.2	78.2	77.9	77.3	77.3	78	77.5	77.9	77.9	77.7	77.6	78	78.8	78.7	78.1	77.1	78.5	78.3	78.3	78.3	78.3	78.1	78.2	78.2	78.3	78.3		
21	B. roseae subsp. roseae LMG 27714	76.6	76.1	76.3	76.8	77	76.9	76.9	76.5	75.8	75.6	76.1	76.3	76.2	76	76.1	76.8	74	80.9	81.3	100	77.7	77.6	86	85	79.2	78.9	78.2	78.3	79	78.4	78.9	78.9	78.7	78.6	79	79.9	79.7	79.1	78.1	79.5	79.3	79.3	79.3	79.3	79.1	79.2	79.2	79.3	79.3		
22	B. roseae subsp. americana LMG 27715	76.5	75.9	76.2	76.7	76.9	76.7	76.8	76.4	75.7	75.5	76	76.2	76.1	75.9	76	76.7	73.9	80.8	81.2	100	80.5	80.5	80.9	80.9	79	78.8	78.1	78.2	78.9	78.3	78.8	78.8	78.6	78.5	78.9	79.6	79.6	79	78	79.4	79.2	79.2	79.2	79.2	79	79.1	79.1	79.1	79.2	79.2	
23	Brenneria rubrifaciens 6D370	76.1	75.6	75.9	76.4	76.5	76.4	76.4	76.1	75.3	75.2	75.6	75.8	75.7	75.5	75.6	76.3	73.6	80.5	80.8	100	86	85.9	100	84.5	78.7	78.4	77.8	77.9	78.5	78	78.5	78.5	78.2	78.1	78.5	79.3	79.3	78.6	77.6	79	78.9	78.8	78.8	78.8	78.8	78.7	78.7	78.7	78.8	7	

Рисунок 15. Матрица среднегеномного сходства (ANI) для 50 геномов семейства *Pectobacteriaceae*, включая геномы типовых видов и геномы, недавно опубликованные в базе NCBI Genome. Значения среднегеномного сходства были вычислены с помощью алгоритма orthoANI. Кластеризация геномов сделана на основании полученных значений ANI с помощью алгоритма BIONJ, использующего метод присоединения соседей с применением модели первого порядка дисперсий и ковариаций оценок эволюционного расстояния.

Поскольку одним из классических подходов является анализ последовательностей генов рибосомальных РНК, для МГП также традиционно принято устанавливать филогенетические связи, используя последовательности 16S и 23S рРНК (Nassar et al., 1996).

Нами было построено филогенетическое дерево порядка *Enterobacterales* (Рисунок 16), используя полные последовательности генов 16S рРНК. Как видно из полученной кладограммы, данный подход работает не слишком точно, группируя в одну кладу не только представителей разных родов, но и представителей разных семейств.

Наличие большого количества данных полногеномного секвенирования делает возможным использование более точных подходов, подразумевающих сравнения целых геномов либо наборов из конкатенированных, то есть соединенных, последовательностей консервативных генов (Adeolu et al., 2016).

Алгоритм UBCG (up-to-date bacterial core gene set), разработанный для более точной таксономической классификации прокариот, позволяет проводить филогенетический анализ с использованием 92 конкатенированных (то есть объединенных) консервативных генов. В число таких генов входят однокопийные гомологичные гены домашнего хозяйства, присутствующие у большинства известных видов бактерий, в том числе последовательности, кодирующие рибосомальные белки, а также ферменты, участвующие в репликации, трансляции и другие жизненно важные гены (Na et al., 2018). Построенная с помощью этого алгоритма кладограмма (Рисунок 17) группирует штаммы рода *Pectobacterium* в клады, соответствующие описанным видам. В том числе позволяет четко различить близкие виды, что было невозможно сделать, пользуясь анализом общегеномного сходства.

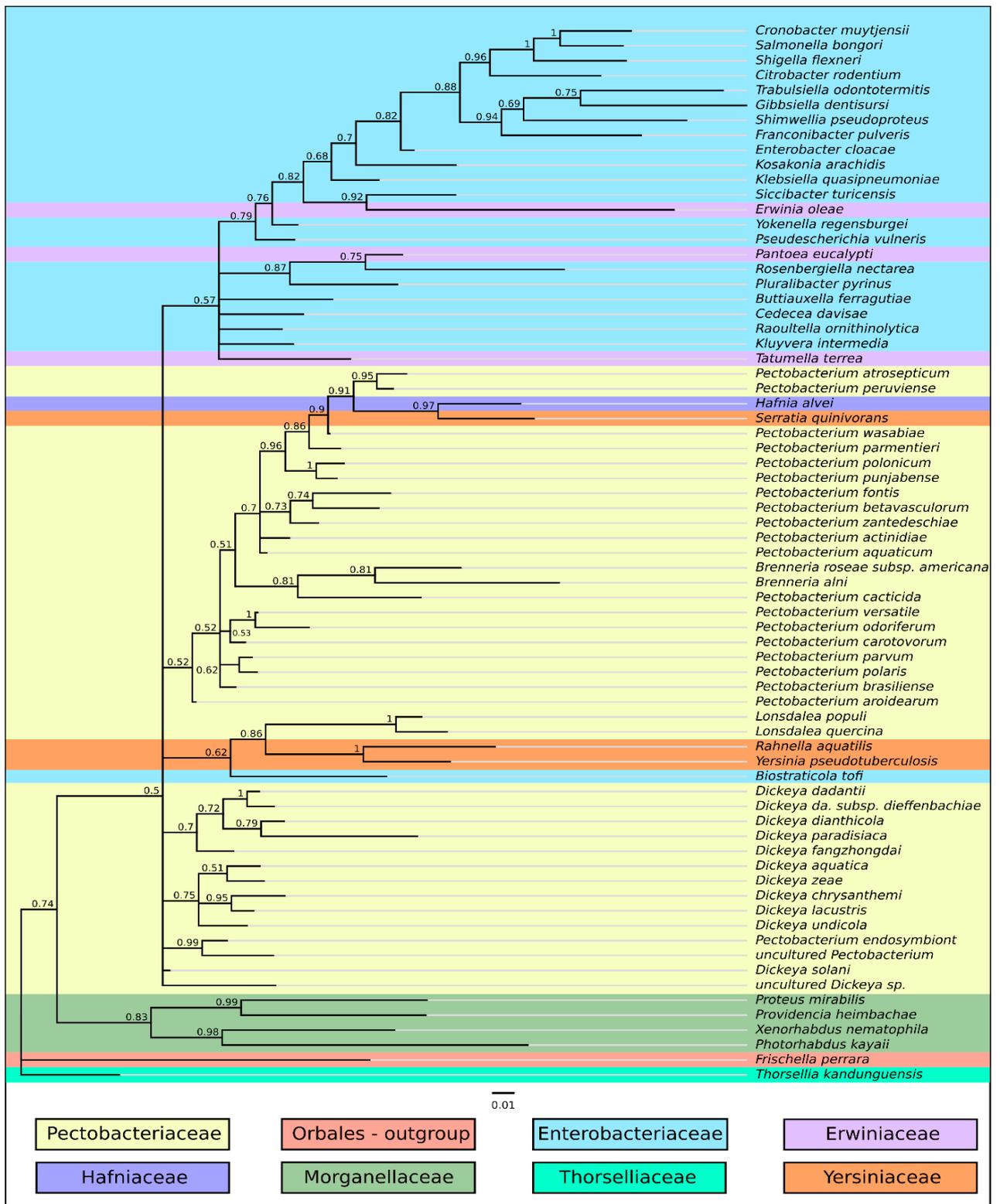


Рисунок 16. Филогенетическое древо порядка *Enterobacteriales*, построенное по последовательностям 16S рРНК (MrBayes, внешняя группа — *Frischella perrara*). В узлах указана апостериорная вероятность. Среднее стандартное отклонение частот модуляции составило 0,0097, длины цепи 5500000 и длина прожига 500000.

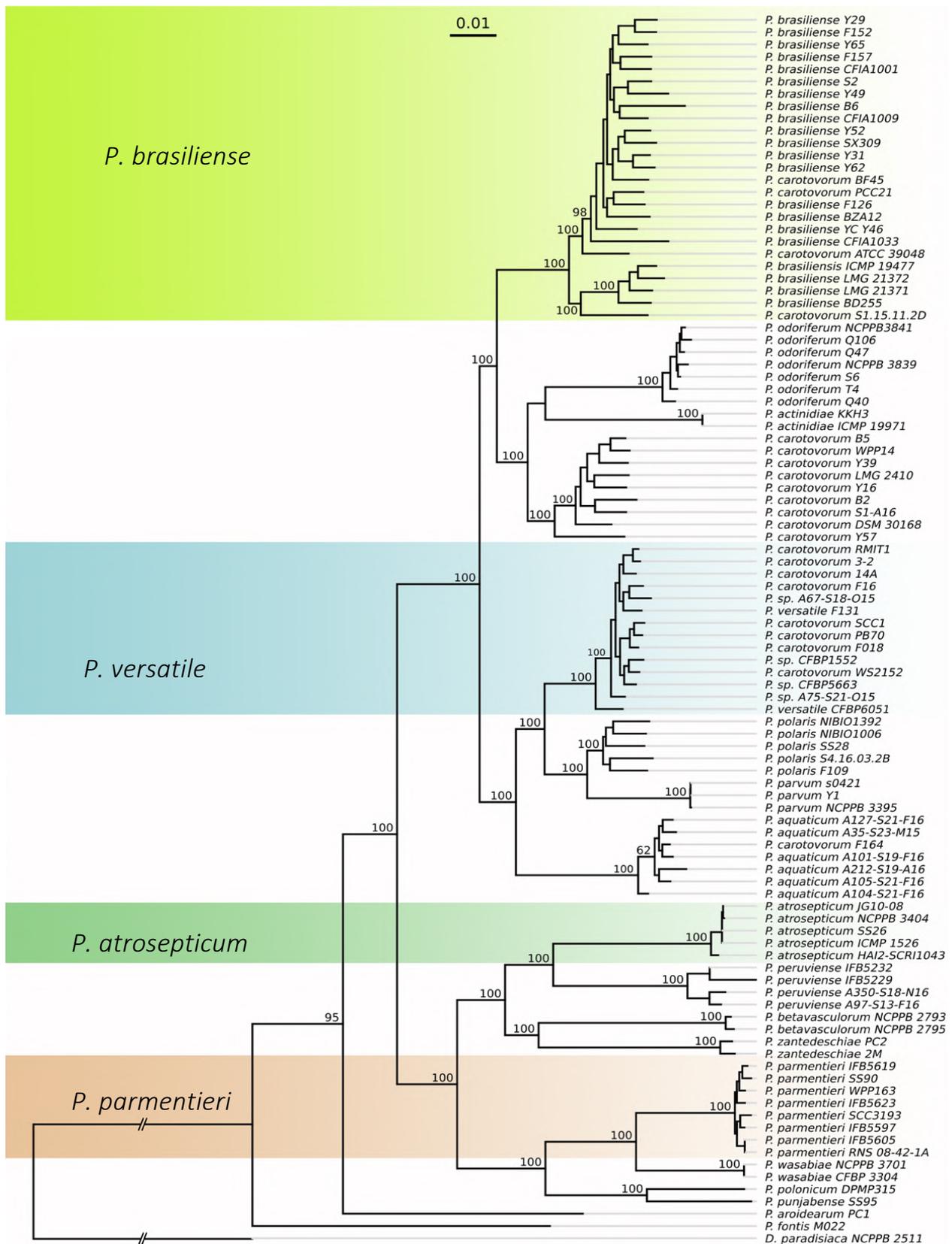


Рисунок 17. Мультилокусный анализ рода *Pectobacterium* по последовательностям 92 коровых генов, перечисленных в Приложении 3, выделенных с помощью алгоритма UBCG. Филогенетическое дерево получено с помощью метода максимального правдоподобия, реализованного

программой RAxML, результаты бутстрэп-анализа приведены около соответствующих узлов, количество реплик составило 1000, внешняя группа — *Dickeya paradisiaca* NCPPB

Как видно из приведенного рисунка, гипотеза о некорректной атрибуции ряда штаммов в открытых базах данных нашла свое подтверждение. Так, например, *P. carotovorum* BF45 и *P. carotovorum* PCC21, очевидно, должны быть отнесены к виду *P. brasiliense*; так же, как и многие штаммы *P. carotovorum*, которые относятся к кладе *P. versatilis*.

В результате проделанного анализа были сформированы базы данных, включающие все штаммы-представители полученных клад для четырех видов пектобактерий. Дальнейший акцент в работе был сделан на четырех видах пектобактерий, вызывающих болезни картофеля: наиболее агрессивном возбудителе черной ножки *P. atrosepticum* и трех распространенных возбудителях мягкой гнили картофеля — *P. versatilis*, *P. parmentieri*, *P. brasiliense*.

Далее полученные базы полных геномов, сформированные в результате филогенетического анализа, были использованы для автоматизированного поиска в полногеномных данных видоспецифических последовательностей (см. раздел 4.2)

Кроме того, был проведен анализ новых штаммов *Pectobacterium* sp., для которых ранее было показано высокое среднегеномное сходство (Рисунок 15). Анализ с использованием последовательностей 92 конкатенированных генов, полученных с использованием алгоритма UBCG (Рисунок 18), подтвердил выдвинутую на основании значений ANI гипотезу о том, что эта группа образует отдельную кладу, сестринскую *P. aquaticum*.

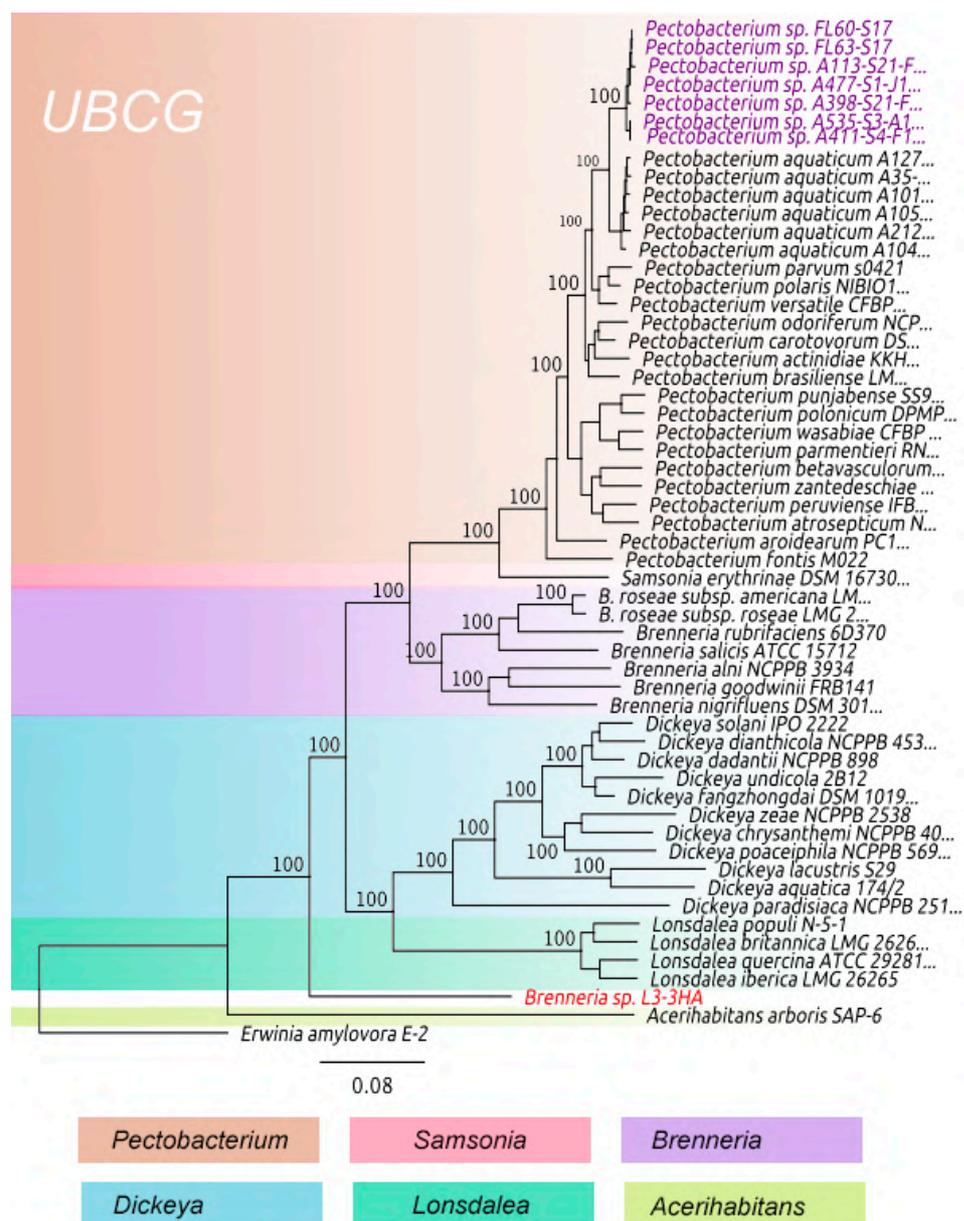


Рисунок 18. Кладограмма по последовательностям 92 коровых генов для 50 геномов *Pectobacteriaceae*, включая геномы типовых видов и недавно опубликованные геномы (гены выделены с помощью алгоритма UBCG, дерево построено с помощью RAxML, результаты бутстрэп-анализа приведены около соответствующих узлов, количество реплик составило 1000, внешняя группа — *Erwinia amylovora* E-2).

Результаты проведенного анализа были опубликованы нашей научной группой в мае 2021 (Lukianova et al., 2021), а в октябре того же года вышла статья, в которой данная группа штаммов утверждается как новый вид, *P. quasiaquaticum* (Moussa et al., 2021).

3.18. Поиск участков в геномах пектобактерий для видоспецифичной амплификации

Для поиска уникальных для каждого из четырёх видов пектобактерий последовательностей генома, подходящих для их видоспецифичной детекции был использован алгоритм, описанный в разделе 3.3. После завершения поиска вручную выбирали области внутри открытых рамок считывания, для которых возможно было сконструировать праймеры и зонд, такие, чтобы получить небольшой, порядка 200-300 п.о., продукт амплификации.

Температуру отжига праймеров подбирали таким образом, чтобы она приблизительно равнялась 60°C, температуру отжига зонда подбирали так, чтобы она была на 5-10 °C выше. Возможность формирования праймерами вторичных структур, шпилек и праймер-димеров оценивали при помощи встроенного функционала Geneious Prime. Дополнительно проверяли отсутствие гомологии для подобранных праймеров в общих базах данных, чтобы убедиться, что данная последовательность не встречается ни в каких геномах, кроме целевых.

В результате для каждого целевого вида был определен ген, потенциально подходящий для видоспецифичной амплификации, а также сконструированы праймеры и зонды для амплификации короткого участка выбранной последовательности (

Таблица 4). Консервативность данных последовательностей внутри исследуемых видов, вероятно, свидетельствует о важной роли белков, кодируемых ими, в жизненном цикле бактерии.

Таблица 4. Полученные в этой работе праймеры и зонды для видоспецифичной детекции бактерий рода *Pectobacterium*. (Pat – *P. atrosepticum*, Ppar – *P. parmentieri*, Pver – *P. versatile*, Pbr – *P. brasiliense*)

Вид	Участок в геноме	Праймеры	Зонд
Pat	Пермеаза семейства APC	PatF: 5'-CAG TAG GTT TGG GAG CAG GG-3'	PatP: (6-FAM)-CGCGTCTTTTTT-(dT-BHQ-1)-GGGGTGTCTGGCA-(Pi)
		PatR: 5'-CCA CTA CCG ATG ATG CTC CC-3'	
Ppar	Белок с анкириновыми повторами	PparF: 5'-TAT CGC TGG CTC AGG CAA TT	PparP: (6-FAM)-CGCCCGGG-(dT-BHQ-1)-GCCCAAGATATGAC TT-(Pi)
		PparR: 5'-TAC GCT GCG CAT ACT TGG AA-3'	
Pver	Гипотетический белок	PverF: 5'-ACC CTT GCA CCC AAA AGT GA-3'	PverP: (6-FAM)-TGGGCGGTGAGG-(dE-BHQ1)-CTGTACGTA CT-(Pi)
		PverR: 5'-ACC CTT GCA CCC AAA AGT GA-3'	
Pbr	MFS транспортер	PbrF: 5'-CCG GGC AAA ACG GTT TTA AAC-3'	PbrP: (6-FAM)-AATGTCACAAGAAA ACCGAT-(dT-BHQ-1)-TCATGG-(Pi)
		PbrR: 5'-GTA GCA ACG CCG CAT TCC-3'	

Далее в тексте набор, включающий праймеры и зонд для амплификации видоспецифичного участка каждого патогена будет упоминаться как тест-система для определения представителя одного из четырех видов. Например, набор из праймеров PatF и PatR, а также соответствующего зонда – это тест система для определения *P. atrosepticum*.

3.19. Первичная проверка селективности детекции представителей *Pectobacterium* разработанными наборами олигонуклеотидов

Для первичной проверки корректности видоспецифичной детекции при помощи амплификации выбранных участков генома был подобран набор из 39 штаммов лабораторной коллекции бактерий рода *Pectobacterium* различных видов, а также представителей рода *Dickeya*: пять штаммов *Pectobacterium atrosepticum* (F004, F041, F048, F162, F163), пять штаммов *P. versatile* (F002, F016, F018, F131, F135), четыре штамма *P. parmentieri* (F127, F148, F149, F174), три штамма *P. brasiliense* (F126, F152, F157), три штамма *P. polaris* (F109, F171, F182) и по одному штамму *P. carotovorum* (F160), *P. aquaticus* (F164), *P. odoriferum* (F265) и *P. betavasculorum* (F258). Кроме того, были включены представители рода *Dickeya*: *D. dianthicola* (F077, F085, F117), *D. solani* (F012, F155) и *D. zeaе* (F261). Перечисленные выше штаммы хорошо изучены, для многих из них доступны данные полногеномного секвенирования и ошибка в отнесении к тому или иному виду, таким образом, исключена.

Дополнительно тестовый набор штаммов включал также менее изученные изоляты пектобактерий, выделенные с картофеля и проявляющие выраженную пектолитическую активность на среде CVP (F028, F034, C035, F043, F061, F082, F097, F102, F105).

С полученным набором штаммов проводили ПЦР с использованием праймеров, сконструированных на предыдущем шаге работы, чтобы подтвердить гипотезы об их пригодности для видоспецифичной детекции соответствующих видов. В случае, если при проведении ПЦР с данной парой праймеров наблюдали амплификацию только в реакциях, содержащих ДНК целевого вида и отсутствие амплификации во всех остальных случаях, заказывали зонд.

Как видно после визуализации ПЦР-продукта на 1,5% агарозном геле, в случае с использованием набора праймеров, амплифицирующих участок APC-

пермеазы, в котором был найден видоспецифичный для *P. atrosepticum* участок, ПЦР прошла только со штаммами F004, F041, F048, F162 и F163, то есть относящимися к целевому виду – *P. atrosepticum* (Рисунок 19). Таким образом, данный участок подходит для видоспецифичной детекции и может быть использован для дальнейших экспериментов. Длина амплифицируемого фрагмента - 271 п.о.

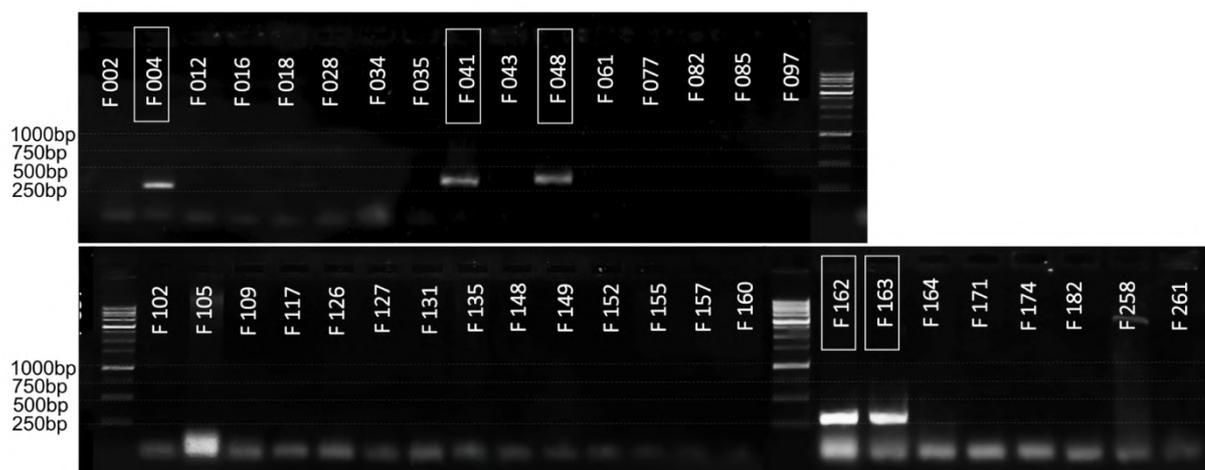


Рисунок 19. Результаты гель-электрофореза и ПЦР-анализа, проведенного с набором праймеров (PatF и PatR), специфичных для детекции *P. atrosepticum*. Дорожки, соответствующие реакции со штаммами *P. atrosepticum* обозначены рамкой. Для определения размера фрагмента использован маркер длин «1 kb DNA Ladder» (Евроген, Россия).

В аналогичном эксперименте с использованием праймеров для видоспецифичной детекции другого вида, *P. parmentieri*, было показано, что амплификация также прошла со всеми образцами, содержащими ДНК целевого вида, то есть F034, F127, F148, F149, F174. Кроме того, позитивный сигнал был получен и для штамма F035. Несмотря на то, что данный штамм изучен в меньшей мере, чем перечисленные выше, в ходе предварительной характеристики было установлено, что тест-система позволяющая определить принадлежность штамма к кладе, включающей *P. wasabiae* и *P. parmentieri* (Kim et al., 2011), дает с этим штаммом позитивный сигнал, что позволяет

предположить принадлежность штамма F035 к одному из этих двух видов, но не позволяет определить, к какому конкретно. Тест-система (Kim et al., 2011) была разработана для детекции *P. wasabiae* еще до описания части штаммов данного вида как *P. parmentieri*, и поэтому дает позитивный сигнал со всеми представителями клады.

Аmplification с праймерами PparF и PparR позволила уточнить видовую принадлежность штамма F035 как *P. parmentieri* (Рисунок 20).

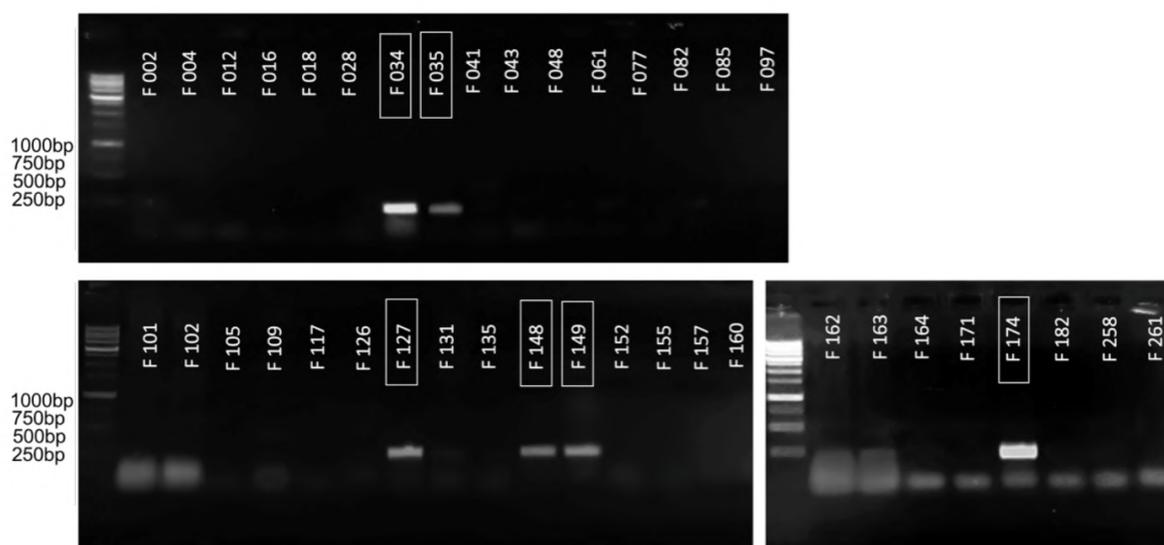


Рисунок 20. Результаты гель-электрофореза и ПЦР-анализа и, проведенной с набором праймеров (PparF и PparR), специфичных для детекции *P. parmentieri*. Дорожки, соответствующие реакции со штаммами *P. parmentieri*, обозначены рамкой. Для определения размера фрагмента использован маркер длин «1 kb DNA Ladder» (Евроген, Россия).

С набором праймеров PverF и PverR для идентификации *P. versatile* был получен положительный сигнал для целевых штаммов F002, F016, F018, F061, F131 и F135. Ложноположительных/негативных сигналов не наблюдали (Рисунок 21). А идентификация штаммов *P. brasiliense* (Рисунок 22) выявила целевые штаммы F126, F128, F152 и F157.

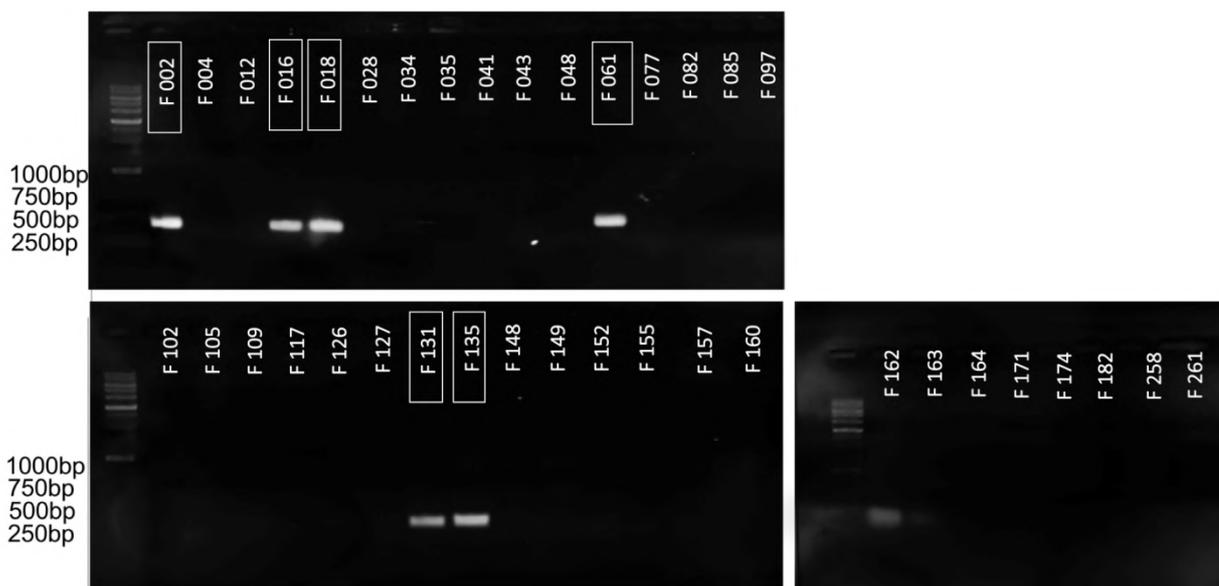


Рисунок 21. Специфичность ПЦР с набором праймеров для детекции *P. versatile* (PverF и PverF). Дорожки, соответствующие реакции со штаммами *P. versatile* обозначены рамкой. Для определения размера фрагмента использован маркер длин «1 kb DNA Ladder» (Евроген, Россия).

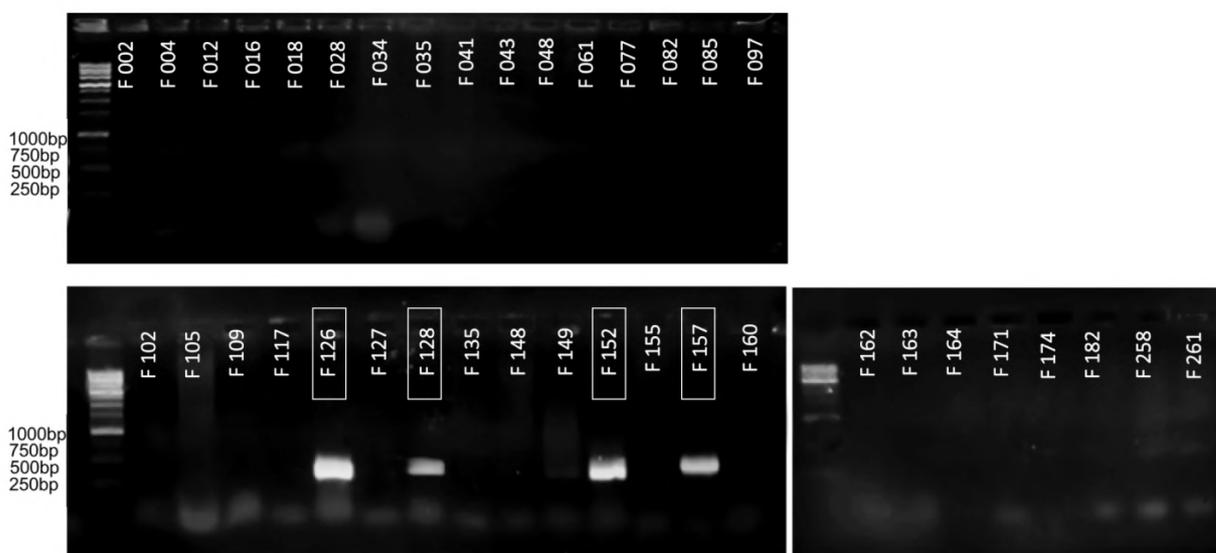


Рисунок 22. Специфичность ПЦР с набором праймеров (PbrF и PbrR) для детекции *P. brasiliense*. Дорожки, соответствующие реакции со штаммами *P. brasiliense* вида обозначены рамкой. Для определения размера фрагмента использован маркер длин «1 kb DNA Ladder» (Евроген, Россия).

Таким образом, было экспериментально показано, что видоспецифичные участки, найденные в полных геномах пектобактерий

(раздел 4.2), при амплификации дают положительный сигнал только с целевыми видами, и не дают ложноположительных реакций. Следовательно, выбранные участки подходят для дальнейшей работы и более масштабного тестирования в формате qПЦР.

3.20. Оценка селективности детекции штаммов рода *Pectobacterium* разработанными наборами олигонуклеотидов в режиме qПЦР

Для подтверждения селективности обнаружения пектобактерий был проведен ряд qПЦР-реакций с большим набором штаммов, принадлежащих как к МГП, так и к пектолитическим изолятам других родов и семейств (Рисунок 23).

В данном исследовании были использованы 110 бактериальных штаммов из них 75 принадлежит к семейству *Pectobacteriaceae*, в частности к роду *Pectobacterium* 61 штамм: 6 *P. atrosepticum*, 6 *P. parmentieri* 8 *P. versatile*, 4 *P. brasiliense* и 37 относящихся к другим видам. Кроме того, для ряда штаммов, атрибутированных ранее, была известна принадлежность к кладам *P. wasabiae* + *P. parmentieri* и *P. carotovorum* + *P. verasatile*, которые в ходе последующего анализа предполагалось реклассифицировать. Остальные штаммы были выделены из гниющих клубней картофеля и проявляли выраженную пектолитическую активность, что выражалось в образовании углублений вокруг колоний в толще питательной среды CVP.

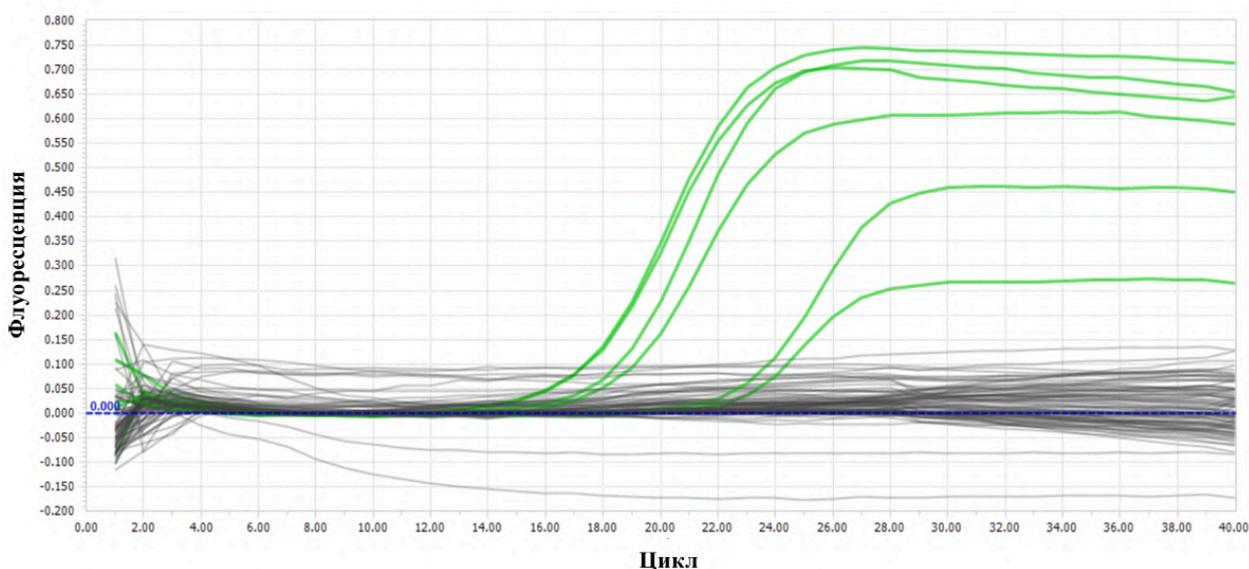


Рисунок 23. Пример qПЦР амплификации по оценке селективности метода в отношении *P. atrosepticum*. Зеленым обозначены кривые амплификации, полученные для образцов с целевыми штаммами (F004, F041, F048, в двух повторностях). Черным обозначены кривые всех остальных штаммов и негативные контроли с водой.

Как показано в результатах тестирования (Приложение 1), qПЦР-тест разработанный для *P. atrosepticum*, показал положительный результат только со всеми используемыми штаммами данного вида. Родственные виды, такие как *P. carotovorum*, *P. brasiliense*, *P. parmentieri*, *P. polaris*, *P. versatile*, *P. aquaticum*, *Dickeya* sp. и другие патогенные бактерии, а также непатогенные почвенные бактерии, не продемонстрировали амплификации с данной системой праймеров.

Штаммы, принадлежащие к виду *P. parmentieri*, в предложенной тест системе также показали положительный результат, а штаммы с неоднозначно определенной видопринадлежностью (*P. wasabiae*/*P. parmentieri*) благодаря данному исследованию удалось реклассифицировать. Штамм F035 классифицируется как *P. parmentieri*, так как он показал амплификацию целевой последовательности. В то же время, F178 не показал положительного сигнала и был отнесен к *P. wasabiae*. Классический штамм *P. wasabiae* F007,

использованный в исследовании, не показал ложноположительной амплификации. Для других изолятов с пектолитической активностью, как принадлежащих к семейству *Pectobacteriaceae*, так и неродственных ему, положительных результатов не получено.

qПЦР тест для *P. brasiliense* также показал высокую селективность и отсутствие ложноположительных результатов.

В случае с *P. versatile* позитивный сигнал был получен со всеми хорошо изученными штаммами данного вида из лабораторной коллекции. Кроме того, были реклассифицированы некоторые штаммы, для которых была известна принадлежность к кладе, содержащей *P. carotovorum* + *P. verasatile*. Для дополнительного подтверждения корректности детекции было проведено секвенирование по Сенгеру участка гена *dnaX* согласно протоколу, рекомендованному в статье с описанием данного вида, в качестве способа, позволяющего отличить *P. carotovorum* и *P. verasatile* (Portier et al., 2019). Все ампликоны штаммов, реклассифицированных как *P. verasatile*, показали высокое сходство с аналогичными участками в геномах опубликованных штаммов данного вида.

Для подтверждения отсутствия перекрестной амплификации с ДНК картофеля в качестве дополнительного контроля были проведены реакции с ДНК-экстрактами незараженного картофеля. В них амплификация отсутствовала.

Кроме того, анализ *in silico* с использованием нуклеотидной базы данных не предполагал какой-либо амплификации геномной ДНК растений с использованием разработанных праймеров. Таким образом была исключена перекрестная амплификация с ДНК картофеля.

3.21. Оценка чувствительности и эффективности ПЦР

Для оценки чувствительности и расчета эффективности амплификации для каждой из четырех ПЦР-систем была сконструирована тестовая плаزمид.

Такая плазмида представляет собой вектор pAL2-T со вставкой целевого участка и кассетой устойчивости к ампициллину в качестве селективного маркера. Данная плазмида используется как матрица в ПЦР-реакции, моделирующей детекцию патогена. Использование плазмиды позволяет произвести более точный и аккуратный расчёт количества копий на реакцию и, таким образом, построить более точную калибровочную кривую. Кроме того, в дальнейших экспериментах эти плазмиды использовали в качестве положительного контроля.

Для построения калибровочной кривой в каждом случае были приготовлены серии десятикратных разведений тестовой плазмиды и геномной ДНК одного из штаммов целевого вида. С каждым разведением была проведена ПЦР реакция и вычислен пороговый цикл (C_q) (Рисунок 24).

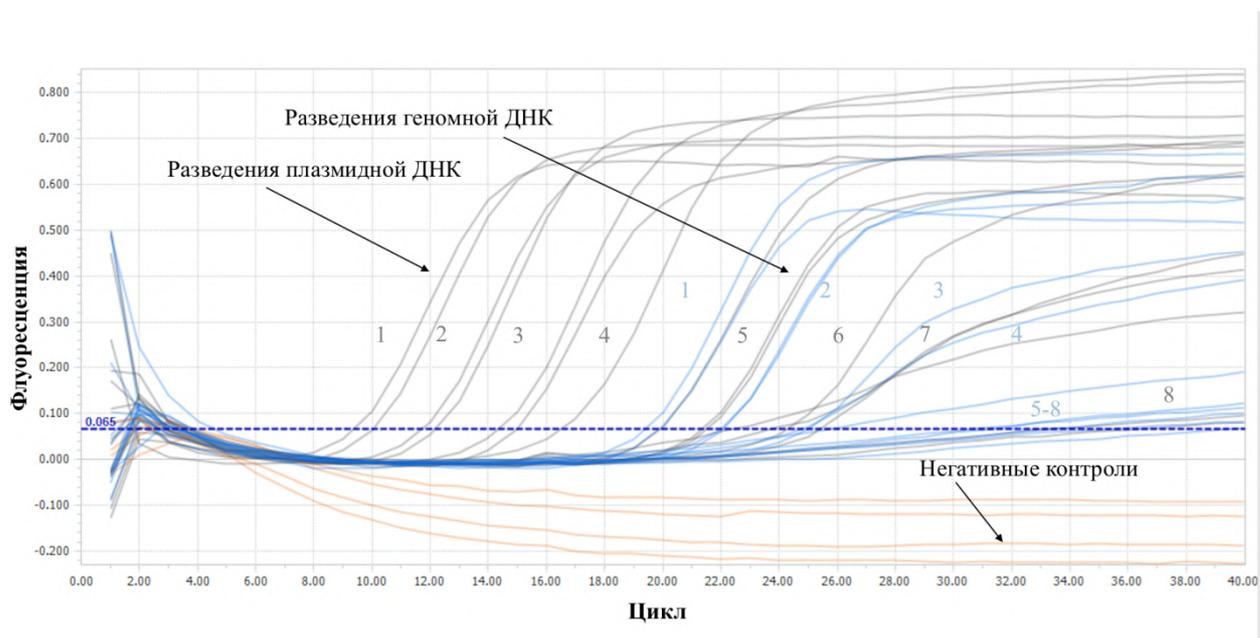


Рисунок 24. Внешний вид кривых амплификации в эксперименте с определением чувствительности qПЦР. Серым обозначены кривые амплификации, полученные для образцов с разведениями плазмидной ДНК. Голубым обозначены разведения геномной ДНК, бежевым – контроли, с добавлением воды вместо ДНК. Цифрами обозначены номера разведений.

Исходя из полученных данных, были построены калибровочные кривые, отражающие зависимость изменения среднего порогового цикла (C_q) от десятичного логарифма концентрации плазмидной и геномной ДНК соответственно.

В эксперименте по построению калибровочной кривой при детекции *P. atrosepticum* оба графика имели линейный характер со значениями R^2 0,99 и 0,97 для плазмидной и геномной ДНК соответственно и наклоном -3,34 и 3,5, соответственно (Рисунок 25). Таким образом, значения эффективности ПЦР составили 0,99 и 0,93, что говорит о высокой эффективности протекания реакции. Значение эффективности ПЦР позволяет судить о корректности дизайна праймеров, отсутствии ингибиторов, а также оптимальности состава реакционной смеси и условий протекания реакции. Ожидаемое значение данного параметра находится в пределах 90-110% (Ребриков, Трофимов, 2006). В данном случае мы можем судить об оптимальном протекании реакции.

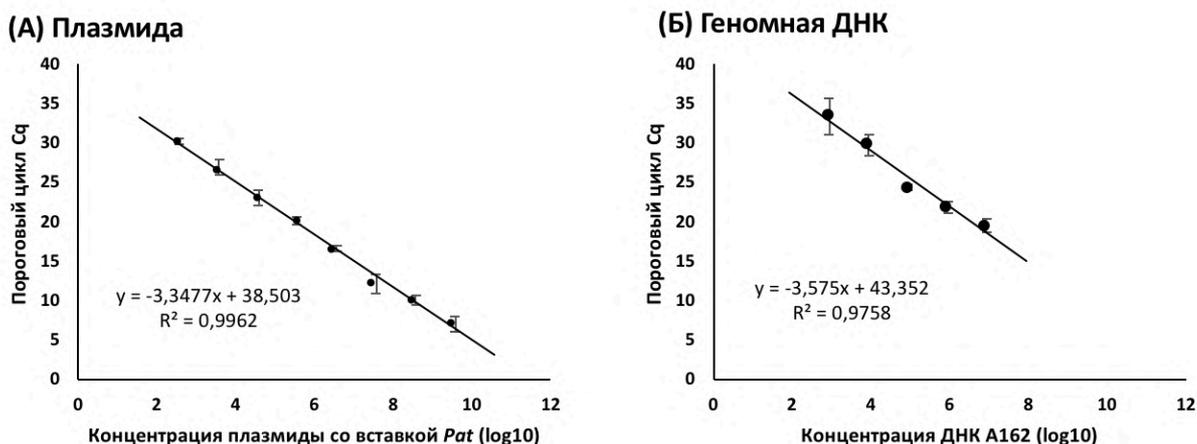


Рисунок 25. Зависимость порогового цикла амплификации от концентрации ДНК в пробе в эксперименте с разведениями тестовой плазмиды (А) и геномной ДНК (Б) *P. atrosepticum*.

Согласно полученным значениям пороговых циклов (Таблица 5), наименьшая концентрация, которую удалось детектировать данным методом, составила 87 копий на реакцию, что соответствует концентрации 10^3 кл/мл. Такая чувствительность сопоставима с чувствительностью описанных в литературе методов, на основе qПЦР (Kim et al., 2011; Li et al., 2011). Кроме того, как было указано в обзоре литературы (раздел 2.3.2), концентрация клеток при проявлении симптомов в клубне составляет 10^6 - 10^7 кл/г кожур, следовательно, данная тест-система позволяет детектировать концентрации клеток на несколько порядков ниже симптоматических, и проводить диагностику латентной инфекции.

Таблица 5. Чувствительность qПЦР тест-системы для детекции *P. atrosepticum*

№	Плазмида			ДНК F162		
	Число копий	Cq	Стандартное отклонение	Число копий	Cq	Стандартное отклонение
1	$3,7 \times 10^9$	7,03	0,96	$8,7 \times 10^5$	19,35	0,83
2	$3,7 \times 10^8$	9,98	0,54	$8,7 \times 10^4$	21,82	0,77
3	$3,7 \times 10^7$	12,02	1,28	$8,7 \times 10^3$	24,26	0,40
4	$3,7 \times 10^6$	16,58	0,35	$8,7 \times 10^2$	29,67	1,40
5	$3,7 \times 10^5$	20,01	0,51	87	33,3	2,40
6	$3,7 \times 10^4$	23,45	1,02	8,7	-	-
7	$3,7 \times 10^3$	26,75	0,95	0,87	-	-
8	$3,7 \times 10^2$	30,05	0,33	0,087	-	-

В эксперименте с *P. parmentieri* коэффициенты корреляции (R^2) полученных кривых составили 0,99 в обоих случаях с наклоном -3,34 и -3,33 для плазмидной и геномной ДНК соответственно, что соответствует эффективности ПЦР 98,9% и 99,62% (Рисунок 26).

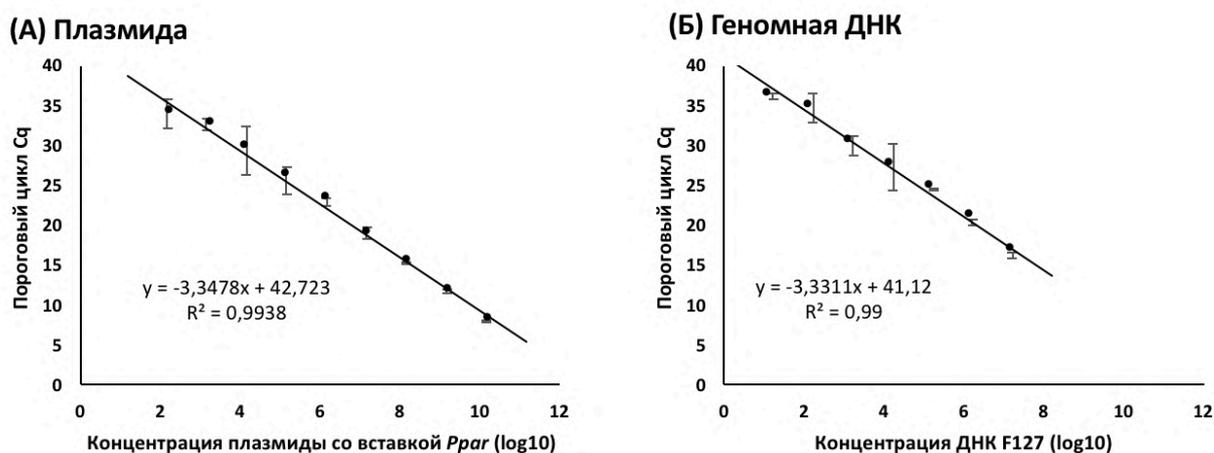


Рисунок 26. Зависимость порогового цикла амплификации от концентрации ДНК в пробе в эксперименте с разведениями тестовой плазмиды (А) и геномной ДНК (Б) *P. parmentieri*.

Предел детекции в данном случае составил 16 копий на реакцию или 4×10^2 кл/мл (Таблица 6). Как и в случае с *P. atrosepticum* в данном случае мы можем судить о том, что реакция проходит с высокой эффективностью, чувствительность детекции соответствует ожидаемой для qПЦР-системы и позволяет проводить детекцию латентной инфекции картофеля.

Таблица 6. Чувствительности qПЦР тест-системы для детекции *P. parmentieri*

№	Плазмида			ДНК F127		
	Cq	Стандартное отклонение	Число копий	Cq	Стандартное отклонение	SD
1	$1,4 \times 10^{10}$	8,01	0,12	$1,68 \times 10^7$	16,29	0,37
2	$1,48 \times 10^9$	11,83	0,21	$1,68 \times 10^6$	20,48	0,36
3	$1,48 \times 10^8$	15,27	0,15	$1,68 \times 10^5$	24,62	0,01
4	$1,48 \times 10^7$	19,04	0,71	$1,68 \times 10^4$	27,20	3,40
5	$1,48 \times 10^6$	23,40	0,57	$1,68 \times 10^3$	29,92	1,25
6	$1,48 \times 10^5$	25,67	1,72	168	34,60	1,80
7	$1,48 \times 10^4$	29,37	3,07	16,8	36,20	0,37
8	$1,48 \times 10^3$	32,59	0,70	1,68	-	-
9	148	33,95	1,72	0,16	-	-

При исследовании тест системы для детекции *P. versatile* обе калибровочные кривые также имели линейный характер с коэффициентом корреляции 0,99. Наклон графиков составил -3,23 и -3,49 для плазмидной и геномной ДНК, соответственно. Эффективность ПЦР составила 103,8% и 93,22%.

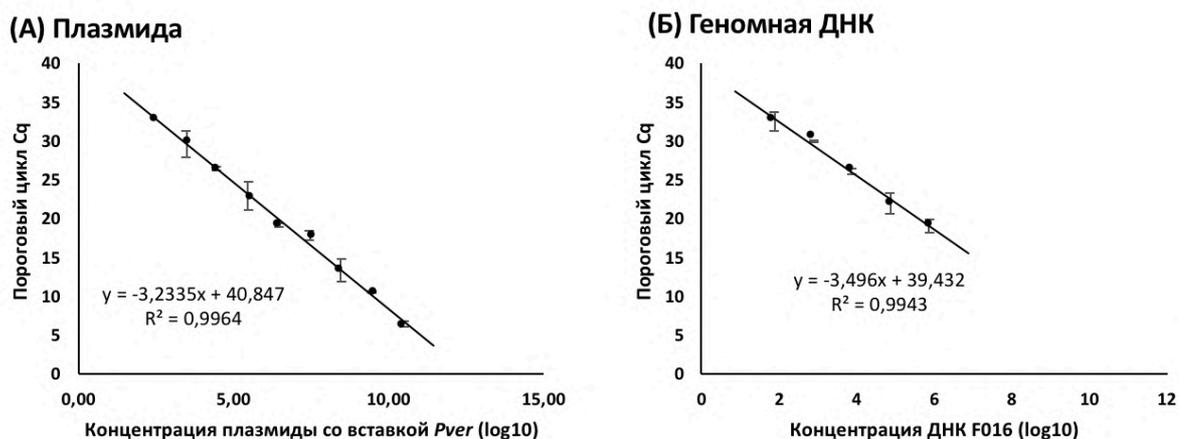


Рисунок 27. Зависимость порогового цикла амплификации от концентрации ДНК в пробе в эксперименте с разведениями тестовой плазмиды (А) и геномной ДНК (Б) *P. versatile*.

Чувствительность детекции в данном случае оказалась достаточно высокой. При помощи данного метода удалось детектировать концентрацию менее 10 копий на реакцию. Таким образом, данным методом можно достоверно детектировать порядка 10^2 кл/мл (Таблица 7).

Таблица 7. Чувствительность тест-системы для детекции *P. versatile*

№	Плазмида			ДНК F016		
	Число копий	C_q	Стандартное отклонение	Число копий	C_q	Стандартное отклонение
1	$3,4 \times 10^8$	6,5	0,33	$7,3 \times 10^5$	19,05	0,93
2	$3,4 \times 10^8$	10,6	0,18	$7,3 \times 10^4$	21,95	0,24
3	$3,4 \times 10^7$	13,38	1,5	$7,3 \times 10^3$	26,09	0,33
4	$3,4 \times 10^6$	17,8	0,55	$7,3 \times 10^2$	29,95	0,22
5	$3,4 \times 10^5$	19,13	0,23	73	32,53	1,3
6	$3,4 \times 10^4$	23,47	1,8	7,3	35,44	0,8
7	$3,4 \times 10^3$	26,4	0,23	-	-	-

№	Плазмида			ДНК F016		
	Число копий	Cq	Стандартное отклонение	Число копий	Cq	Стандартное отклонение
8	$3,4 \times 10^2$	29,6	1,8	-	-	-
9	29	33,45	0,22	-	-	-

Коэффициенты корреляции для калибровочных кривых тест-системы для детекции *P. brasiliense* составили 0,98 и 0,94 для плазмидной и геномной ДНК соответственно. Наклон полученных графиков, -3,31 и -3,41 свидетельствует об эффективности 100,4% и 96,6% соответственно.

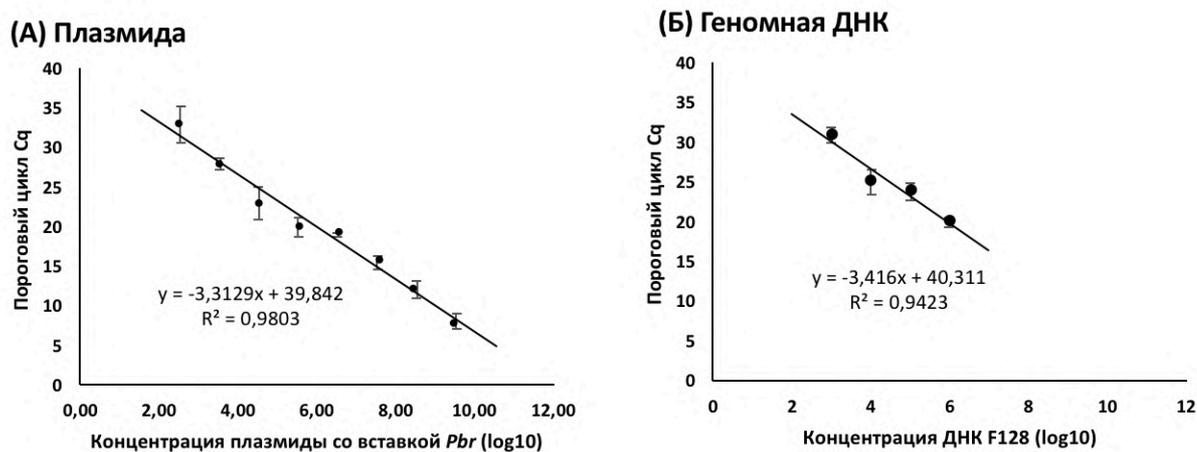


Рисунок 28. Зависимость порогового цикла амплификации от концентрации ДНК в пробе в эксперименте с разведениями тестовой плазмиды (А) и геномной ДНК (Б) *P. brasiliense*.

Чувствительность детекции в данном случае, как и в предыдущих была достаточно высокой и составила порядка 10^2 кл/мл, так как количество детектированных копий на реакцию исчисляется десятками (Таблица 8).

Таблица 8. Чувствительность тест-системы для детекции *P. brasiliense*

№	Плазмида			ДНК F128		
	Число копий	Cq	Стандартное отклонение	Число копий	Cq	Стандартное отклонение
1	$3,4 \times 10^8$	8,01	1,01	$9,8 \times 10^5$	19,99	0,55
2	$3,4 \times 10^8$	12,05	1,18	$9,8 \times 10^4$	23,81	1,12
3	$3,4 \times 10^7$	15,55	0,81	$9,8 \times 10^3$	25,09	1,55
4	$3,4 \times 10^6$	19,03	0,32	$9,8 \times 10^2$	30,95	0,99
5	$3,4 \times 10^5$	20,01	1,15	98	33,05	-
6	$3,4 \times 10^4$	23,05	2,01	9,8	-	-
7	$3,4 \times 10^3$	28,01	0,76	-	-	-
8	$3,4 \times 10^2$	33,01	2,35	-	-	-
9	29	-				

Во всех случаях коэффициент корреляции полученных калибровочных кривых был близок к единице и находился в границах (-0,8, 0,8), что позволяет судить о наличии корреляции между пороговым циклом и концентрацией образца. Следовательно, используя полученные зависимости можно вычислять концентрацию патогена в пробах в дальнейших экспериментах.

Во всех случаях эффективность ПЦР была близка к 100%, а предел чувствительности детекции был сопоставим с аналогичными тестами, в том числе разработанными для детекции пектобактерий (Kim et al., 2011; Li et al., 2011). Данные значения концентраций патогена находятся ниже уровня развития симптомов инфекции (Pérombelon, 2002). Следовательно, разработанный метод подходит для оценки бактериального осеменения картофеля без визуальных проявлений симптомов инфекции. Раннее выявление инфекции в свою очередь может позволить остановить ее развитие,

отбраковывая зараженные партии или подбирая для обработки склада методы химической или биологической защиты.

3.22. Тестирование возможности детекции пектобактерий на искусственно зараженных растениях

Помимо оценки селективности и чувствительности метода диагностики и идентификации пектобактерий необходимо было оценить возможность использования метода не только для определения чистых культур, но и для оценки их наличия в зараженных растениях.

Прежде всего для каждой тест-системы была проведена оценка *in silico* возможности кросс-амплификации с картофельной ДНК с помощью базы данных NCBI BLAST. Для всех подобранных наборов олигонуклеотидов не было обнаружено сходства ни с последовательностями в геноме картофеля, ни с последовательностями в геномах каких-либо микроорганизмов за исключением целевой группы.

Для большей надежности в качестве контроля отсутствие амплификации с ДНК здорового картофеля было проверено экспериментально. Ни с одной из тест-систем амплификации не наблюдали, что подтверждает отсутствие амплификации с ДНК картофеля.

Кроме того, необходимо было оценить влияние картофельного экстракта на эффективность детекции для оценки возможности использования тотальной ДНК, выделенной из картофельной ткани или экстракта. Компоненты картофельного сока могут влиять на течение реакции или ингибировать ее, поэтому необходимо было проверить, влияет ли присутствие картофельного экстракта в реакционной смеси на эффективность реакции. Для моделирования таких условий серию экспериментов, описанных выше, повторили снова, добавив в реакцию экстракт здорового картофеля, содержащий как картофельную ДНК, так и компоненты картофельного сока.

Во всех случаях была повторно вычислена эффективность ПЦР для того, чтобы определить, насколько присутствие компонентов картофельного сока влияет на этот параметр (Рисунок 29). Как видно из полученных данных, присутствие картофельного экстракта не оказало существенного влияния на протекание реакции. Эффективность амплификации во всех случаях была близка к 100%. Значения эффективности, полученные с добавлением картофельного экстракта в реакционную смесь, были сравнимы со значениями, полученными без него.

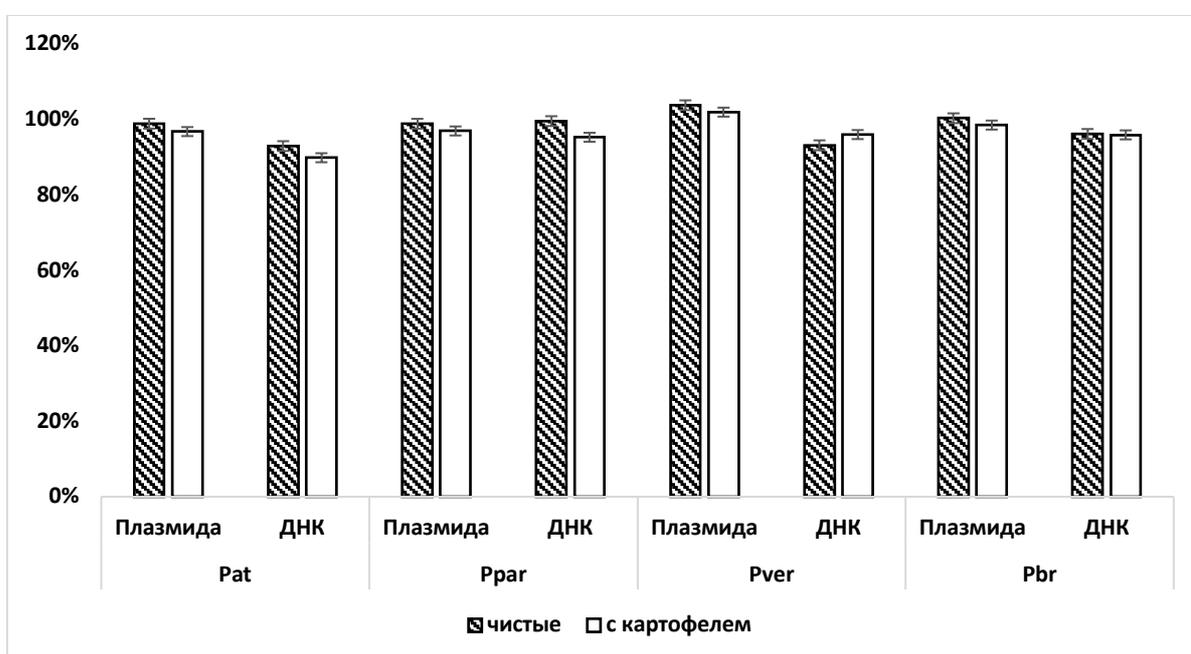


Рисунок 29. Сравнительные диаграммы эффективности ПЦР с тестовой плазмидой и геномной ДНК без добавления картофельного экстракта (отмечено черным) и на фоне добавления картофельного экстракта в реакционную смесь (отмечено белым)

В результате проведения экспериментов на искусственно зараженных растениях во всех зараженных образцах была обнаружена инфекция с концентрацией фитопатогенных штаммов пектобактерий от 10^3 до 10^5 КОЕ/мл картофельного экстракта, что соответствует потенциально опасной латентной инфекции (Rérombelon, 2002). В картофеле, используемом нами в качестве

контроля, было выявлено заражение *P. versatile*, что объясняется широкой распространенностью данного вида в РФ (Таблица 9).

Таблица 9. Тестирование экстрактов искусственно зараженных растений картофеля штаммами пектобактерий.

№	Патоген	Тип образца	qПЦР		Расчётная концентрация патогена, копий ДНК/мл картофельного экстракта
			Cq	Станд. отклонение	
1	Pat	Негативный контроль	-	-	
		Зараженный картофель	28,46	0,56	5×10^5
2	Ppar	Негативный контроль	-	-	-
		Зараженный картофель	31,03	0,67	$1,06 \times 10^3$
3	Pver	Негативный контроль	34,05	1,20	$1,26 \times 10^2$
		Зараженный картофель	30,38	0,95	$1,72 \times 10^3$
4	Pbr	Негативный контроль	-	-	-
		Зараженный картофель	32,05	0,95	$0,4 \times 10^3$

Таким образом, в модельном эксперименте по использованию разработанной системы идентификации фитопатогенных пектобактерий на растениях картофеля нами было впервые успешно продемонстрирована возможность детекции отдельных видов этих бактерий, а также выявлено латентное присутствие этих бактерий в клубнях на асимптоматическом

участке ткани, что позволяет сделать вывод о возможности применения метода для оценки визуально здоровых образцов картофеля.

Отсутствие кросс-амплификации позволяет сделать на основании четырех полученных тест-систем одну мультиплексную систему, позволяющую одновременную детекцию всех четырех патогенов в одном образце, что существенно упрощает их анализ.

3.23. Апробация системы детекции на выборке образцов, собранных в Московской области в 2020-2021 годах

Для оценки распространения целевых видов пектобактерий в Московской области было взято 59 образцов картофеля, собранных в 2020-2021 годах (Рисунок 30, Таблица 10). Точные данные образцов (географические координаты пробы, сорт картофеля, градация и поставщик семенного материала) являются коммерческой информацией, предоставляемой ИЦ «Фитоинженерия» по запросу. Среди предоставленных образцов картофеля у 29% были обнаружены все четыре тестовых вида фитопатогена. Полученные данные согласуются с мониторингом 2010-2014 гг., в котором с помощью ИФА выявляли зараженность картофеля несколькими значимыми бактериальными фитопатогенами, в том числе МГП. Зараженность продовольственного картофеля МГП составила 28% (Зайцев и др., 2016).

Результаты нашего исследования показали, что наиболее встречаемым на картофеле видом является *P. versatile*, поскольку более 15% образцов были заражены этим видом пектобактерий. Достаточно распространённым (7%) оказался тепловыносливый *P. brasiliense*. Меньше всего было выявлено *P. parmentieri* (3%) и *P. atrosepticum* (3%).

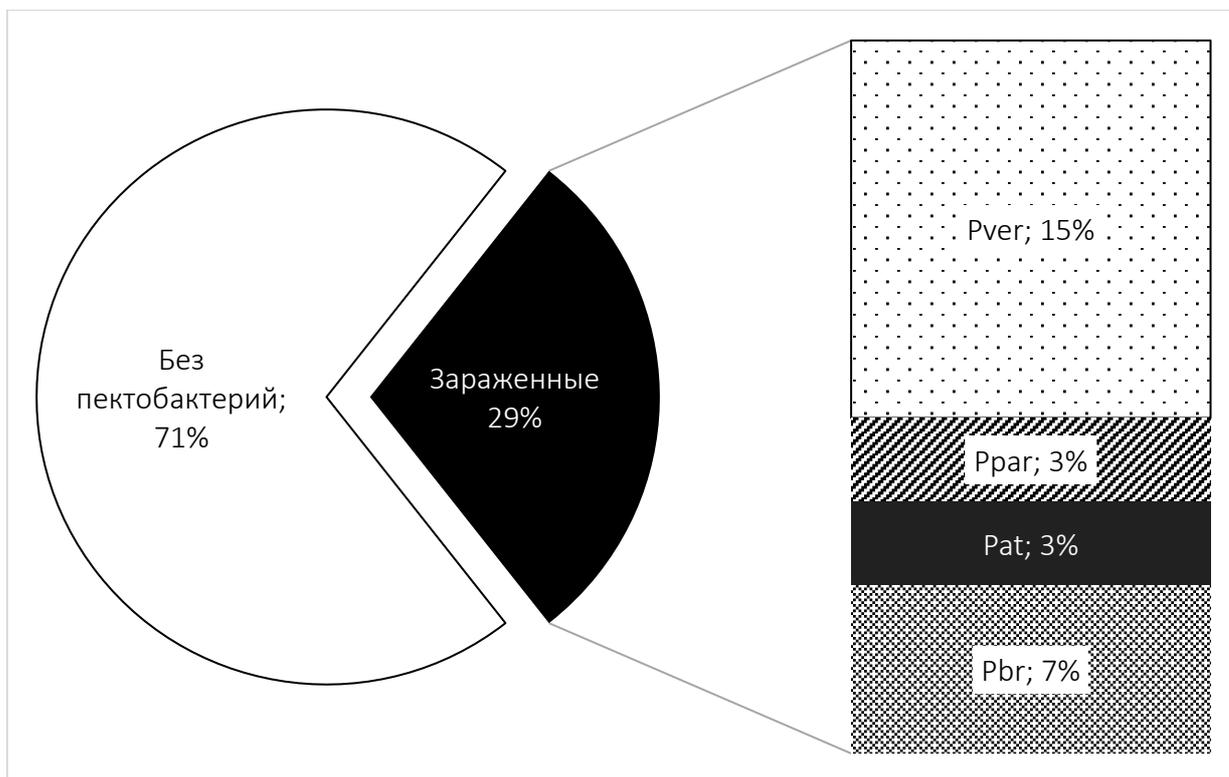


Рисунок 30. Зараженность образцов картофеля видами *Pectobacterium*.
 Обозначения: Ppar – *P. parmentieri*, Pver – *P. versatile*, Pat – *P. atrosepticum*, Pbr – *P. brasiliense*

Pectobacterium atrosepticum и *P. parmentieri*, обнаруженные в образцах 107/3 и 166/2, встречались исключительно совместно.

Обсемененность образцов варьировала от $5,6 \times 10^2$ кл/мл картофельного экстракта в образце 241/11 до $1,48 \times 10^7$ в 166/2. В среднем она составила $1,03 \times 10^4$ для *P. versatile*, $7,16 \times 10^4$ для *P. parmentieri*, $9,02 \times 10^6$ для *P. atrosepticum* и $1,51 \times 10^5$ для *P. brasiliense* (Рисунок 31).

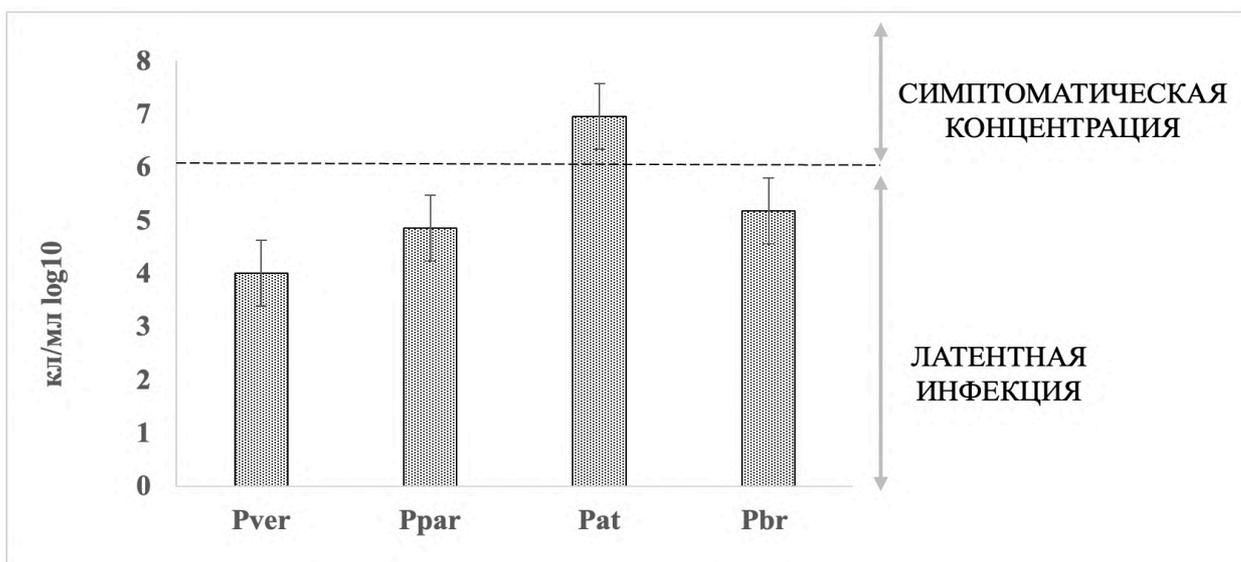


Рисунок 31. Обсемененность образцов картофеля пектобактериями, согласно результатам количественной ПЦР (qПЦР). Обозначения: Ppar – *P. parmentieri*, Pver – *P. versatile*, Pat – *P. atrosepticum*, Pbr – *P. brasiliense*

Таким образом, большинство образцов были инфицированы латентно. Согласно данным литературы, такая концентрация пектобактерий обычно встречается в зараженном картофеле без признаков гниения (Rérombelon, 2002). Однако при транспортировке или хранении в неоптимальных условиях обсеменённость этими микроорганизмами может привести к развитию мягкой гнили в зараженном клубне и последующей порче товарной партии картофеля.

Концентрации, близкие к симптоматическим, были обнаружены в образцах, зараженных наиболее агрессивным *P. atrosepticum*, в которых, кроме того, присутствовали также *P. parmentieri*. Эти партии картофеля с высокой вероятностью не только являются фактором риска экономических потерь в силу вероятного развития в них бактерий, провоцирующих образование гнили, но и представляют угрозу как агент контаминации здорового картофеля. Своевременная диагностика и выбраковка таких партий могла бы позволить существенно снизить риск потерь и предотвратить развитие мягкой гнили.

На основании информации о распространённости и соотношении МГП в микробиоте картофеля, можно осуществлять эффективное планирование профилактических мероприятий. Например, на основании данных, полученных как в ходе идентификации штаммов МГП, выделенных в РФ, так и исследования картофеля на предмет зараженности различными видами рода *Pectobacterium*, нами был в том числе подобран фаговый коктейль, содержащий бактериофаги, вызывающие литическую инфекцию всех четырех патогенов, на которых была сфокусирована данная работа. Фаг PP16 был описан как потенциальное средство борьбы с *P. versatile* (Voronina et al., 2019), фаги PP99, PP101, Q19, PP47, PP81 лизируют штаммы *P. brasiliense* (Evseev et al., 2020; Lukianova et al., 2020), бактериофаг PP74 является патогеном *P. parmentieri* (Kabanova et al., 2018), Q50 активен в отношении *P. atrosepticum* (Bugaeva et al., 2021). Использование смеси описанных фагов позволило существенно снизить риск порчи картофеля в складском эксперименте и таким образом показало свою высокую эффективность как средство профилактики развития мягкой гнили (Bugaeva et al., 2021)

Таблица 10. Образцы картофеля и выявленные представители пектобактерий.

№	Название образца	Дата	Pver		Ppar		Pat		Pbr	
			Сq	Кл/мл	Сq	Кл/мл	Сq	Кл/мл	Сq	Кл/мл
1	197/6	07.10.2020	-	-	-	-	-	-	28,6	2,7×10 ³
2	216/1	07.10.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
3	229/3	07.10.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
4	241/5	07.10.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
5	241/6	07.10.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
6	241/7	07.10.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
7	241/8	07.10.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
8	241/9	07.10.2020	-	-	-	-	-	-	29.49	1,3×10 ³
9	241/10	07.10.2020	-	-	-	-	-	-		
10	241/11	07.10.2020	29,83	5,6×10 ²	-	-	-	-	-	-
11	263/6	16.12.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
12	175/1	10.09.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
13	175/5	10.09.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
14	175/7	10.09.2020	-	-	-	-	-	-	-	-

№	Название образца	Дата	Pver		Ppar		Pat		Pbr	
			Сq	Кл/мл	Сq	Кл/мл	Сq	Кл/мл	Сq	Кл/мл
15	181	10.09.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
16	253/2	14.12.2020	28,23	1,6×10 ³	-	-	-	-	-	-
17	253/3	14.12.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
18	253/4	14.12.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
19	253/5	14.12.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
20	253/6	14.12.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
21	245/1	09.12.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
22	245/2	09.12.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
23	257/1	15.12.2020	29,34	7,7×10 ²	-	-	-	-	-	-
24	263/4	09.12.2020	29,88	5,4×10 ²	-	-	-	-	-	-
25	263/4	09.12.2020	-	-	-	-	-	-	29,51	1,4×10 ³
26	263/7	09.12.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
27	263/9	09.12.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
28	241/1	07.12.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
29	241/2	08.12.2020							26,65	1×10 ⁴
30	241/3	09.12.2020	-	-	-	-	-	-	-	-

№	Название образца	Дата	Pver		Ppar		Pat		Pbr	
			Сq	Кл/мл	Сq	Кл/мл	Сq	Кл/мл	Сq	Кл/мл
31	241/4	09.12.2020	23,73	3,1×10 ⁴	-	-	-	-	-	-
32	235/1	09.12.2020	23,32	4,1×10 ⁴	-	-	-	-	-	-
33	253/1	09.12.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
34	253/2	09.12.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
35	267/1	21.12.2020	25,6	9,5×10 ³	-	-	-	-	-	-
36	79/1	13.04.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
37	95/2	06.05.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
38	107/3	06.05.2020	-	-	27,41	1,31×10 ⁴	20,08	3,23×10 ⁶	-	-
39	111/4	15.06.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
40	111/9	10.06.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
41	112/1	10.06.2020	-	-	-	-	-	-	20,26	7,4×10 ⁵
42	166/1	24.06.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
43	166/2	24.06.2020	-	-	24,07	1,3×10 ⁵	17,72	1,48×10 ⁷	-	-
44	256/1	14.12.2020	28,41	1,42×10 ³	-	-	-	-	-	-
45	291/1	13.08.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
46	26/7	11.02.2020	-	-	-	-	-	-	-	-

№	Название образца	Дата	Pver		Ppar		Pat		Pbr	
			Сq	Кл/мл	Сq	Кл/мл	Сq	Кл/мл	Сq	Кл/мл
47	26/6	11.02.2020	28,86	1,06×10 ³	-	-	-	-	-	-
48	26/5	11.02.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
49	26/4	11.02.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
50	3/14	11.02.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
51	26/1	10.02.2020	-	-	-	-	-	-	-	-
52	3/12	23.01.2021	-	-	-	-	-	-	-	-
53	346	22.01.2021	-	-	-	-	-	-	-	-
54	3/17	24.01.2021	-	-	-	-	-	-	-	-
55	3/19	24.01.2021	-	-	-	-	-	-	-	-
56	3/20	24.01.2021	-	-	-	-	-	-	-	-
57	25/1	10.02.2021	-	-	-	-	-	-	-	-
58	26/1	10.02.2021	-	-	-	-	-	-	-	-
59	27/1	10.02.2021	-	-	-	-	-	-	-	-

Заключение

В рамках этой работы было проведено комплексное исследование фитопатогенных микроорганизмов рода *Pectobacterium*. Эксперименты были начаты в 2018 году, когда в силу накопленных данных происходили существенные изменения в таксономии и понимании филогенетических связей внутри группы. Поэтому одна из фундаментальных частей работы была посвящена тому, чтобы в ходе филогенетического анализа упорядочить имеющиеся данные, исследовать состав уже известных таксонов, а также выявить некорректно атрибутированные в открытых базах данных штаммы. Например, многие изоляты, до сих пор именуемые как *P. carotovorum*, на самом деле относятся к *P. versatile*, *P. brasiliense*, *P. parmentieri* и другим видам.

Нами был проведен геномный анализ, который позволил исправить эти неточности и провести *in silico* поиск участков последовательностей ДНК, наиболее оптимальных для видоспецифической детекции в полногеномных данных. Был впервые опробован алгоритм поиска таких последовательностей с использованием полногеномных данных и экспериментально доказана его эффективность.

Подобранные уникальные участки для четырех видов рода *Pectobacterium* стали основой для разработки и валидации видоспецифичных систем детекции, для каждой из которых была экспериментально доказана высокая селективность и чувствительность обнаружения. Кроме того, доказана возможность оценки контаминации растений напрямую, минуя этап выделения чистых культур патогена. Полученная мультиплексная тест-система была в дальнейшем использована для исследования набора образцов картофеля, собранных в 2020-2021 годах.

Выводы

1. Проведен геномный анализ рода *Pectobacterium*, на основании которого был кластеризован 221 штамм, часть из которых была ранее атрибутирована в открытых базах данных неверно.
2. Разработан и апробирован новый алгоритм для поиска видоспецифичных последовательностей фитопатогенных бактерий рода *Pectobacterium* с использованием полногеномных данных и метода qПЦР. Для четырех наиболее значимых таксономических видов рода *Pectobacterium* найдены участки генома для видоспецифичной ПЦР-детекции. К целевым видам отнесены *P. atrosepticum* как наиболее частый возбудитель мягкой гнили в умеренных и холодных регионах России; устойчивый к повышенным температурам *P. brasiliense*; а также агрессивные фитопатогены картофеля - *P. parmentieri* и *P. versatile*.
3. Разработанные qПЦР тест-системы проверены на коллекции, включающей 110 штаммов, и показали высокую чувствительность порядка 10^2 - 10^3 КОЕ/мл, эффективность, близкую к 100% и селективность в отношении выбранных видов пектобактерий.
4. Из протестированных образцов картофеля, 29% оказались заражены пектобактериями. Наиболее распространенный в РФ вид *P. versatile* был выявлен на 15% образцов. Встречаемость *P. brasiliense*, *P. parmentieri* и *P. versatile* составила 7%, 3% и 3% соответственно. Количество пектобактерий варьировало от $5,6 \times 10^2$ до $1,48 \times 10^7$ кл/мл картофельного экстракта. В среднем она составила для *P. versatile* $1,03 \times 10^4$, для *P. parmentieri* $7,16 \times 10^4$, для *P. atrosepticum* $9,02 \times 10^6$ и для *P. brasiliense* $1,51 \times 10^5$ кл/мл.

Список литературы

1. Басиев С. С., Бекузарова С. А., Болиева З. А., Чшиева М. Ч. История культуры картофеля // Вестник Владикавказского научного центра. – 2017. – Т. 17. – №. 1. – С. 39-45.
2. Зайцев И. А., Варицев Ю. А., Лазарев А. М., Галушка П. А., Варицева Г. П. Мониторинг скрытых (латентных) форм распространения возбудителей черной ножки и кольцевой гнили картофеля в Российской Федерации // Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. – 2016. – Т. 1. – С. 37-44.
3. Игнатов А. Н., Паньчева Ю. С., Воронина М. В., Джалилов Ф. С. Бактериозы картофеля в Российской Федерации // Картофель и овощи. – 2018. – №. 1. – С. 3-7.
4. Мирошников К.А., Евсеев П.В., Лукьянова А.А. Игнатов А.Н. Бактериофаги возбудителей мягкой гнили растений (*Pectobacterium* и *Dickeya*). // УлГАУ им. П. А. Столыпина Ульяновск, 2020. — 96 с.
5. Ребриков Д. В., Трофимов Д. Ю. ПЦР "в реальном времени": подходы к анализу данных (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42. – №. 5. – С. 520-528.
6. Усанова З. И., Осербаев А. К. Биологические особенности и технологии возделывания картофеля и земляной груши // Учебное пособие. – Тверь: ООО «Издательство «Триада». – 2004. – 149 с.
7. Adeolu M., Alnajjar S., Naushad S., Gupta R. S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘*Enterobacteriales*’: proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2016. – V. 66. – №. 12. – P. 5575-5599.

8. Allan E., Kelman A. Immunofluorescent stain procedures for detection and identification of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. // *Phytopathology*. – 1977. – V. 67. – № 10. – P. 1305–1312.
9. Andersson, R. A., Eriksson, A. R., Heikinheimo, R., Mäe, A., Pirhonen, M., Kõiv, V., Hyytiäinen H., Tuikkala A., Palva, E. T. Quorum Sensing in the Plant Pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: The Role of *expR* Ecc // *MPMI*. – 2000. – V. 13. – № 4. – P. 384–393.
10. Arizala D., Arif M. Genome-Wide Analyses Revealed Remarkable Heterogeneity in Pathogenicity Determinants, Antimicrobial Compounds, and CRISPR-Cas Systems of Complex Phytopathogenic Genus *Pectobacterium* // *Pathogens*. – 2019. – V. 8. – № 4. – P. 247–288.
11. Baghaee-Ravari, S., Rahimian, H., Shams-Bakhsh, M., Lopez-Solanilla, E., Antúnez-Lamas, M., Rodríguez-Palenzuela, P. Characterization of *Pectobacterium* species from Iran using biochemical and molecular methods // *Eur J Plant Pathol*. 2011. V. 129. № 3. P. 413–425.
12. Bell K. S., Sebaihia M., Pritchard L., Holden M. T. G., Hyman L. J., Holeva M. C., Thomson N. R., Bentley S. D., Churcher L. J. C., Mungall K., Atkin R., Bason N., Brooks K., Chillingworth T., Clark K., Doggett J., Fraser A., Hance Z., Hauser H., Jagels K., Moule S., Norbertczak H., Ormond D., Price C., Quail M. A., Sanders M., Walker D., Whitehead S., Salmond G. P. C., P. R. J. Birch P. R. J., Parkhill J., Toth, I. K. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – V. 101. – № 30. – P. 11105–11110.
13. Bhat K. A., Masood S. D., Bhat N. A., Bhat M. A., Razvi S. M., Mir, M. R., Akhtar S., Wani N., Habib M. Current Status of Post Harvest Soft Rot in Vegetables: A Review // *Asian J. of Plant Sciences*. – 2010. – V. 9. – № 4. – P. 200–208.

14. Bodman S. B. von, Bauer W. D., Coplin D. L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. // *Annu. Rev. Phytopathol.* – 2003. – V. 41. – № 1. – P. 455–482.
15. de Boer S. H., Copeman R. J., Vrugink H. Serogroups of *Erwinia carotovora* potato strains determined with diffusible somatic antigens // *Phytopathology.* – 1979. – V. 69. – № 4. – P. 316–319.
16. de Boer S. H., Verdonck L., Vrugink H., Harju P., Bång H. O., Ley J. D. Serological and biochemical variation among potato strains of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and their taxonomic relationship to other *E. carotovora* strains // *Journal of Applied Bacteriology.* – 1987. – V. 63. – № 6. – P. 487-495.
17. de Boer S. H., Ward L. J. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. // *Phytopathology.* – 1995. – V. 85. – № 8. – P. 854–858.
18. de Boer S. H., Li X., Ward L. J. *Pectobacterium* spp. Associated with Bacterial Stem Rot Syndrome of Potato in Canada // *Phytopathology.* – 2012. – V. 102. – № 10. – P. 937–947.
19. de Boer S. H., McNaughton M. E. Monoclonal antibodies to the lipopolysaccharide of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* serogroup I // *Phytopathology.* – 1987. – V. 77. – № 6. – P. 828–832.
20. Bugaeva E. N., Voronina M. V., Vasiliev D. M., Lukianova A. A., Landyshev, N. N., Ignatov A. N., Miroshnikov K. A Use of a Specific Phage Cocktail for Soft Rot Control on Ware Potatoes: A Case Study // *Viruses.* – 2021. – V. 13. – № 6. – P. 1095.
21. Carstens A. B., Djurhuus A. M., Kot W., Hansen L. H. A novel six-phage cocktail reduces *Pectobacterium atrosepticum* soft rot infection in potato tubers under simulated storage conditions // *FEMS Microbiol Lett.* – 2019. – V. 366. – № 9. – P. fnz101.
22. Chan B. K., Abedon S. T., Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy *Future microbiology.* – 2013. – V. 8. – № 6. – P. 769-783.

23. Charkowski A., Blanco C., Condemine G., Expert D., Franza T., Hayes C., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., López Solanilla E., Low D., Moleleki L., Pirhonen M., Pitman A., Perna N., Reverchon S., Rodríguez Palenzuela P., San Francisco M., Toth I., Tsuyumu S., van der Waals J., van der Wolf J., Van Gijsegem F., Yang C.H., Yedidia, I. The Role of Secretion Systems and Small Molecules in Soft-Rot *Enterobacteriaceae* Pathogenicity // *Annual review of phytopathology*. – 2011. – V. 50. № – 1, – P. 425–449.
24. Charkowski A. Biology and control of *Pectobacterium* in potato // *Am. J. Potato Res.* – 2015. – V. 92. – № 2. – P. 223–229.
25. Charkowski A., Sharma K., Parker M. L., Secor G. A., Elphinstone, J. Bacterial diseases of potato. Bacterial diseases of potato. In: *The potato crop*: Springer Nature, 2020., P. 351–388.
26. Charkowski A. O. The Changing Face of Bacterial Soft-Rot Diseases // *Annual Review of Phytopathology*. – 2018 – V. 56., № – 1, – P. 269-288.
27. Chun J., Oren A., Ventosa A., Christensen H., Arahal, D. R., da Costa M. S., Rooney A.P., Yi H., Xu X.W, De Meyer S., Trujillo M. E. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2018. – V. 68. – № 1. – P. 461–466.
28. Cladera-Olivera F., Caron G. R., Motta A. S., Souto A. A., Brandelli A. Bacteriocin-like substance inhibits potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* // *Can. J. Microbiol.* – 2006. – V. 52. – № 6. – P. 533–539.
29. Cuppels D., Kelman A. Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. // *Phytopathology*. – 1974. – V. 64. – № 4. – P. 468–475.
30. Czajkowski R., Grabe G. J., van der Wolf J. M. Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes // *Eur J Plant Pathol.* – 2009. – V. 125. – № 2. – P. 263–275.
31. Czajkowski R., Perombelon M. C., van Veen J. A., van der Wolf J. M.. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and

- Dickeya* species: a review: Control of *Dickeya* and *Pectobacterium* species in potato // Plant Pathology. – 2011. – V. 60. – № 6. – P. 999–1013.
32. Czajkowski R., Pérombelon M. C. M., Jafra S., Lojkowska E., Potrykus M., Van Der Wolf J. M., Sledz W. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review // The Annals of Applied Biology. – 2015. V. 166. – № 1. – P. 18–38.
33. Czajkowski R. Bacteriophages of Soft Rot *Enterobacteriaceae*—a minireview // FEMS Microbiol Lett. – 2016. – V. 363. – № 2. P. – fnv230.
34. Czajkowski R., Boer W. J. de, Wolf J. M. van der. Chemical disinfectants can reduce potato blackleg caused by ‘*Dickeya solani*’ // Eur J Plant Pathol. – 2013. – V. 136. – № 2. – P. 419–432.
35. Czerwicka M., Marszewska K., Bychowska A., Dziadziuszko H., Brzozowski K., Łojkowska E., Stepnowski P., Kaczyński Z. Chemical structure of the O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium atrosepticum* SCRI 1039 // Carbohydrate Research. – 2011. – V. 346. – № 18. – P. 2978–2981.
36. Darrasse A., Priou S., Kotoujansky A., Bertheau Y. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases // Applied and Environmental Microbiology. – 1994. – V. 60. – № 5. – P. 1437–1443.
37. Dees M. W., Lysøe E., Rossmann S., Perminow J., Brurberg M. B. *Pectobacterium polaris* sp. nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum*) // Int J Syst Evol Microbiol. – 2017. – V. 67. – № 12. – P. 5222–5229.
38. Dong Y. H., Wang L. H., Xu J. L., Zhang H. B., Zhang X. F., Zhang L. H. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase // Nature. – 2001. – V. 411. – № 6839. – P. 813–817.
39. Duarte V., De Boer S. H., Ward L. D., De Oliveira, A. M. R. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil // Journal of Applied Microbiology. – 2004. – V. 96. – № 3. – P. 535–545.

40. Eichenlaub R., Gartemann K.-H. The *Clavibacter michiganensis* Subspecies: Molecular Investigation of Gram-Positive Bacterial Plant Pathogens // Annu. Rev. Phytopathol. – 2011. – V. 49. – № 1. – P. 445–464.
41. Elphinstone J. G. The current bacterial wilt situation: a global overview. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex: APS Press, 2005. P. 9–28.
42. Evseev P.V.; Lukianova A.A.; Shneider M.M.; Korzhenkov A.A.; Bugaeva E.N.; Kabanova A.P.; Miroshnikov K.K.; Kulikov E.E.; Toshchakov S.V.; Ignatov A.N.; Miroshnikov K.A. Origin and Evolution of *Studiervirinae* Bacteriophages Infecting *Pectobacterium*: Horizontal Transfer Assists Adaptation to New Niches // Microorganisms. – 2020. – V. 8. – № 11. – P. 1707-1734.
43. Frechon D., Exbrayat P., Helias V., Hyman L. J., Jouan B., Llop P., Lopez M.M., Payet N., Pérombelon M. C. M., Toth I. K., van Beckhoven J. R. C. M., van der Wolf J. M., Bertheau Y. Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers // Potato Res. – 1998. – V. 41. – № 2. – P. 163–173.
44. Frost K. E., Groves R. L., Charkowski A. O. Integrated Control of Potato Pathogens Through Seed Potato Certification and Provision of Clean Seed Potatoes // Plant Disease. – 2013. – V. 97. – № 10. – P. 1268–1280.
45. Fuqua C., Parsek M. R., Greenberg E. P. Regulation of Gene Expression by Cell-to-Cell Communication: Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing // Annu. Rev. Genet. – 2001. – V. 35. – № 1. – P. 439–468.
46. Gardan L., Gouy C., Christen R., Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2003. – V. 53. – № Pt 2. – P. 381–391.

47. Gascuel O. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. // *Molecular Biology and Evolution*. – 1997. – V. 14. – № 7. – P. 685–695.
48. Hauben L., Moore, E. R., Vauterin L., Steenackers M., Mergaert J., Verdonck, L., Swings J. Phylogenetic Position of Phytopathogens within the *Enterobacteriaceae* // *Systematic and Applied Microbiology*. – 1998. – V. 21. – № 3. – P. 384–397.
49. Hélias V., Andrivon D., Jouan B. Internal colonization pathways of potato plants by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* // *Plant pathology*. – 2000. – V. 49. – № 1. – P. 33–42.
50. Huelsenbeck J. P., Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees // *Bioinformatics*. – 2001. – V. 17. – № 8. – P. 754–755.
51. Jafra S., Przysowa J., Czajkowski R., Michta A., Garbeva P., Van der Wolf J. M. Detection and characterization of bacteria from the potato rhizosphere degrading N- acyl-homoserine lactone // *Can. J. Microbiol.* – 2006. – V. 52. – № 10. – P. 1006–1015.
52. Johnson D. A., Dung J. K., Cummings T. F., Schroeder B. K. Development and Suppression of Aerial Stem Rot in Commercial Potato Fields // *Plant Disease*. – 2011. – V. 95. – № 3. – P. 285–291.
53. Kabanova A., Shneider M., Bugaeva E., Ha V. T. N., Miroshnikov K., Korzhenkov, A., Kulikov E., Toschakov S., Ignatov A., Miroshnikov K. Genomic characteristics of vB_PpaP_PP74, a T7-like *Autographivirinae* bacteriophage infecting a potato pathogen of the newly proposed species *Pectobacterium parmentieri* // *Arch Virol*. – 2018. – V. 163. – № 6. – P. 1691–1694.
54. Kabanova A.P., Shneider M.M., Korzhenkov A.A., Bugaeva E.N., Miroshnikov K.K., Zdrovenko E.L., Kulikov E.E., Toschakov S.V., Ignatov A.N., Knirel Y.A., Miroshnikov K.A. Host Specificity of the *Dickeya* Bacteriophage PP35 Is Directed by a Tail Spike Interaction With Bacterial O-

- Antigen, Enabling the Infection of Alternative Non-pathogenic Bacterial Host
// *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 9., № 1. – P.3288–3299
55. Kang H. W., Kwon S. W., Go S. J. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band // *Plant Pathology*. – 2003. – V. 52. – № 2. . – P. 127-133.
56. Katoh K., Misawa, K., Kuma K. I., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform // *Nucleic Acids Research*. – 2002. – V. 30. – № 14. – P. 3059–3066.
57. Klopmeijer M. J., Kelman A. Use of monoclonal antibodies specific for pectate lyase as serological probes in the identification of soft rot *Erwinia* spp. // *Phytopathology*. – 1988 – V.78. – №11. – P.1430-1434.
58. Khayi S., Cigna J., Chong T. M., Quêtu-Laurent A., Chan K. G., Hélias V., Faure D. Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2016. – V. 66. – № 12. . – P. 5379-5383.
59. Kim M. H., Cho M. S., Kim B. K., Choi H. J., Hahn J. H., Kim C., Kang M.J., Kim S.H., Park D. S. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of *Pectobacterium wasabiae* Using YD Repeat Protein Gene-Based Primers // *Plant Disease*. – 2011. – V. 96. – № 2. – P. 253–257.
60. Koh Y. J., Kim G. H., Lee Y. S., Sohn S. H., Koh H. S., Kwon S., Hey S., Jung J. S. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *actinidiae* subsp. nov., a new bacterial pathogen causing canker-like symptoms in yellow kiwifruit, *Actinidia chinensis* // *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. – 2012. – V. 40. – № 4. – P. 269-279
61. Kõiv V., Roosaare M., Vedler E., Kivistik P. A., Toppi K., Schryer D. W. Microbial population dynamics in response to *Pectobacterium atrosepticum* infection in potato tubers // *Sci Rep*. – 2015. – V. 5. – № 1. – P. 1–18.
62. Laurila J., Hannukkala A., Nykyri J., Pasanen M., Hélias V., Garland L., Pirhonen M. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains

- isolated from potato and river water in Finland // Eur J Plant Pathol. – 2010. – V. 126. – № 2. – P. 249–262.
63. Lee I., Kim Y. O., Park S. C., Chun J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity // Int J Syst Evol Microbiol. – 2016. – V. 66. – № 2. – P. 1100–1103.
64. Li X., Nie J., Ward L. J., Nickerson J., de Boer S. H. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and identification of *Pectobacterium atrosepticum* // Canadian Journal of Plant Pathology. – 2011. – V. 33. – № 4. – P. 447–457.
65. Lukianova A.A., Evseev P.V., Tokmakova A.D., Ignatov A.N., Miroshnikov K.A. Analysis of updated *Pectobacteriaceae* sequences highlights the need for taxonomy revisions // 2021 IEEE Ural-Siberian Conference on Computational Technologies in Cognitive Science, Genomics and Biomedicine (CSGB). – 2021. – V. 1. – № 1. – P. 320–324.
66. Lukianova A.A., Shneider M.M., Evseev P.V., Shpirt A.M., Bugaeva E.N., Kabanova A.P., Obraztsova E.A., Miroshnikov K.K., Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Toschakov S.V., Knirel Y.A., Ignatov A.N. and Miroshnikov K.A. Morphologically Different *Pectobacterium brasiliense* Bacteriophages PP99 and PP101: Deacetylation of O-Polysaccharide by the Tail Spike Protein of Phage PP99 Accompanies the Infection // Frontiers in Microbiology. – 2020. – V. 10. – № 1 – P. 3147.
67. Lukianova A. A., Evseev P. V., Stakheev A. A., Kotova I. B., Zavriev S. K., Ignatov A. N., Miroshnikov K. A. Development of qPCR Detection Assay for Potato Pathogen *Pectobacterium atrosepticum* Based on a Unique Target Sequence // Plants. – 2021. – V. 10. – №. 2. – P. 355-368.
68. Ma B., Hibbing M. E., Kim H. S., Reedy R. M., Yedidia I., Breuer J., Glasner J.D., Perna N.T, Kelman A., Charkowski A. O. Host Range and Molecular Phylogenies of the Soft Rot *Enterobacterial* Genera *Pectobacterium* and *Dickeya* // Phytopathology. – 2007. – V. 97. – № 10. – P. 1150–1163.

69. Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S.V., Machado M.A., Toth I., Salmond G., Foster G. D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology: Top 10 plant pathogenic bacteria // *Molecular Plant Pathology*. – 2012. – V. 13. – № 6. – P. 614–629.
70. Meaden S., Paszkiewicz K., Koskella B. The cost of phage resistance in a plant pathogenic bacterium is context-dependent // *Evolution*. – 2015. – V. 69. – № 5. – P. 1321–1328.
71. Miroshnikov K. A., Evseev P. V., Lukianova A. A., Ignatov A. N. Tailed Lytic Bacteriophages of Soft Rot *Pectobacteriaceae* // *Microorganisms*. – 2021. – V. 9. – № 9. – P. 1819-1856.
72. Moussa H. B., Pédrón J., Bertrand C., Hecquet A., Barny M. A. *Pectobacterium quasiaquaticum* sp. nov., isolated from waterways // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2021. – V. 71. – № 10. – P. 005042.
73. Na S. I., Kim Y. O., Yoon S. H., Ha S. M., Baek I., Chun, J. UBCG: Up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction // *J Microbiol*. – 2018. – V. 56. – № 4. – P. 280–285.
74. Nabhan S., de Boer S. H., Maiss E., Wydra K. *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2013. – V. 63. – № Pt_7. – P. 2520–2525.
75. Nassar A., Darrasse A., Lemattre M., Kotoujansky A., Dervin C., Vedel R., Bertheau Y. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. // *Appl Environ Microbiol*. – 1996. – V. 62. – № 7. – P. 2228–2235.
76. Oulghazi S., Cigna J., Lau Y. Y., Moumni M., Chan K. G., Faure D. Transfer of the waterfall source isolate *Pectobacterium carotovorum* M022 to *Pectobacterium fontis* sp. nov., a deep-branching species within the genus

- Pectobacterium* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2019. – V. 69. – № 2. – P. 470-475.
77. O'Neill T. P. The scientific investigation of the failure of the potato crop in Ireland, 1845-6 // Irish historical studies. – 1946. – V. 5. – №. 18. – P. 123-138.
78. Parent J. G. Identification of *Erwinia carotovora* from Soft Rot Diseased Plants by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis // Plant Dis. – 1996. – V. 80. – № 5. – P. 494–499.
79. Pasanen M., Waleron M., Schott T., Cleenwerck I., Misztak A., Waleron K., Pritchard L., Bakr R., Degefu Y., van der Wolf J., Vandamme P., Pirhonen M. *Pectobacterium parvum* sp. nov., having a *Salmonella* SPI-1-like Type III secretion system and low virulence // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2020. – V. 70. – № 4. – P. 2440.
80. Pedron J. J., Bertrand C., Taghouti G., Portier P., Barny M. A. *Pectobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from waterways // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2019. – V. 69. – № 3. – P. 745–751.
81. Pérez-Mendoza D., Coulthurst S. J., Humphris S., Campbell E., Welch M., Toth I. K., Salmond G. P. A multi-repeat adhesin of the phytopathogen, *Pectobacterium atrosepticum*, is secreted by a Type I pathway and is subject to complex regulation involving a non-canonical diguanylate cyclase // Molecular Microbiology. – 2011. – V. 82. – № 3. – P. 719–733.
82. Pérombelon M. C. M. Potato diseases caused by soft rot *Erwinias*: an overview of pathogenesis // Plant Pathology. – 2002. – V. 51. – № 1. – P. 1–12.
83. Pérombelon M. C. M., Hyman L. J. Serological methods to quantify potato seed contamination by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* // EPPO Bulletin. – 1995. – V. 25. – № 1–2. – P. 195–202.

84. Phillips J. A., Kelman A. Direct fluorescent antibody stain procedure applied to insect transmission of *Erwinia carotovora*. // *Phytopathology*. – 1982. – V. 72. – № 7. – P. 898-901.
85. Popenoe H. *Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation*. Washington, D.C.: National Academies Press, 1989.
86. Portier P., Pédrón J., Taghouti G., Fischer-Le Saux M., Caullireau E., Bertrand C., Laurent A., Chawki K., Oulgazi S., Moumni M., Andrivon D., Dutrieux C., Faure D., Hélias V., Barny M. A. Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of *Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2019. – V. 69. – № 10. – P. 3207–3216.
87. Rasskazova P., Evseev P., Miroshnikov K. S3finder (v. 0.2.1) makes finding taxon-specific sequences easier// *Bioinformatics: from algorithms to applications* – 2021 – V. 1. – P. 25.
88. Rossmann S., Dees M. W., Perminow J., Meadow R., Brurberg M. B. Soft Rot *Enterobacteriaceae* Are Carried by a Large Range of Insect Species in Potato Fields // *Appl Environ Microbiol.* – 2018. – V. 84. – № 12. – P. e00281-18.
89. Ryazantsev D. Y., Abramova S. L., Evstratova S. V., Gagkaeva T. Y., Zavriev S. K. FLASH-PCR diagnostics of toxigenic fungi of the genus *Fusarium* // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2008. – V. 34. – № 6. – P. 716-724.
90. Sarfraz S., Riaz K., Oulghazi S., Cigna J., Sahi S. T., Khan S. H., Faure D. *Pectobacterium punjabense* sp. nov., isolated from blackleg symptoms of

- potato plants in Pakistan // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2018. – V. 68. – № 11. – P. 3551–3556.
91. Shirshikov F. V., Korzhenkov A. A., Miroshnikov K. K., Kabanova A. P., Barannik A. P., Ignatov A. N., Miroshnikov K. A. Draft Genome Sequences of New Genomespecies «Candidatus *Pectobacterium maceratum*» Strains, Which Cause Soft Rot in Plants // Genome announcements. – 2018. – V. 6. – № 15. – P. e00260-18.
92. Shneider M.M., Lukianova A.A., Evseev P.V., Shpirt A.M., Kabilov M.R., Tokmakova A.D., Miroshnikov K.K., Obraztsova E.A., Baturina O.A., Shashkov A.S., Ignatov A.N., Knirel Y.A., Miroshnikov K.A. *Autographivirinae* Bacteriophage Arno 160 Infects *Pectobacterium carotovorum* via Depolymerization of the Bacterial O-Polysaccharide // International Journal of Molecular Sciences. 2020. – V. 21. – № 9. – P. 3170.
93. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies // Bioinformatics. – 2014. – V. 30. – № 9. – P. 1312–1313.
94. Suárez M. B., Feria F. J., Martín-Robles M. J., Del Rey F. J., Palomo J. L. *Pectobacterium parmentieri* Causing Soft Rot on Potato Tubers in Southern Europe // Plant Disease. – 2017. – V. 101. – № 6. – P. 1029–1029.
95. Tokmakova A., Lukianova A., Gornostal E., Miroshnikov K. First insight on the *Dickeya* BOX-PCR fingerprints and its suitability for strain clustering // 2021 IEEE Ural-Siberian Conference on Computational Technologies in Cognitive Science, Genomics and Biomedicine (CSGB). – 2021. – V. 1. – № 1. – P. 340–343.
96. Toth I.K., Sullivan L., Brierley J.L., Avrova A.O., Hyman L.J., Holeva M., Broadfoot, L., Pérombelon M.C.M., McNicol, J. Relationship between potato seed tuber contamination by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, blackleg disease development and progeny tuber contamination // Plant Pathology. – 2003. – V. 52. – № 2. – P. 119–126.

97. Toth I. K., Avrova A. O., Hyman L. J. Rapid Identification and Differentiation of the Soft Rot *Erwinias* by 16S-23S Intergenic Transcribed Spacer-PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism Analyses // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – V. 67. – № 9. – P. 4070–4076.
98. Trias R., Bañeras L. Lactic acid bacteria from fresh fruit and vegetables as biocontrol agents of phytopathogenic bacteria and fungi // International Microbiology. – 2008. – № 11. – P. 231–236.
99. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye, J., Faircloth B. C., Remm M., Rozen S. G. Primer3—new capabilities and interfaces // Nucleic acids research. – 2012. – V. 40. – №. 15. – P. e115-e115.
100. Voronina M. V., Kabanova A. P., Shneider M. M., Korzhenkov A. A., Toschakov S. V., Miroshnikov, K. K., Miroshnikov K. A., Ignatov A. N. First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Causing Blackleg and Stem Rot Disease of Potato in Russia // Plant Disease. – 2018. – V. 103. – №. 2. – P. 364-364.
101. Voronina M. V., Bugaeva E. N., Vasiliev D. M., Kabanova A. P., Barannik A. P., Shneider M. M., Kulikov E. E., Korzhenkov A. A., Toschakov S. V., Ignatov A. N., Miroshnikov, K. A. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Bacteriophage PP16 Prospective for Biocontrol of Potato Soft Rot // Microbiology. – 2019. – V. 88. – № 4. – P. 451–460.
102. Waldee E. L. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria // 1942. – P. 6970837.
103. Waleron M., Waleron K., Podhajska A. J., Łojkowska E. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment // Microbiology. – 2002. – V. 148. – № 2. – P. 583–595.
104. Waleron M., Misztak A., Waleron M., Franczuk M., Wielgomas B., Waleron K. Transfer of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains isolated from potatoes grown at high altitudes to *Pectobacterium*

- peruviense* sp. nov. // Systematic and Applied Microbiology. – 2018. – V. 41. – № 2. – P. 85–93.
105. Waleron M., Misztak A., Waleron M., Franczuk M., Jońca J., Wielgomas B., Mikiciński A., Popović T., Waleron K. *Pectobacterium zantedeschiae* sp. nov. a new species of a soft rot pathogen isolated from Calla lily (*Zantedeschia* spp.) // Systematic and Applied Microbiology. – 2019a. – V. 42. – № 3. – P. 275–283.
106. Waleron M., Misztak A., Waleron M., Jonca J., Furmaniak M., Waleron K. *Pectobacterium polonicum* sp. nov. isolated from vegetable fields // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2019b. – V. 69. – № 6. – P. 1751–1759.
107. Waleron M., Waleron K., Lojkowska E. First Report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Causing Soft Rot on Potato and Other Vegetables in Poland // Plant Disease. – 2015. – V. 99. – № 9. – P. 1271–1271
108. de Werra P., Bussereau F., Keiser A., Ziegler D. First Report of Potato Blackleg Caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Switzerland // Plant Disease. 2015. – V. 99. – № 4. – P. 551–551.
109. Wolf J. M. van der, De Boer S. H. Bacterial Pathogens of Potato In: Potato Biology and Biotechnology: Elsevier, 2007. P. 595–617.
110. Zaczek-Moczydłowska M. A., Young G. K., Trudgett J., Fleming C. C., Campbell K., O’Hanlon R. Genomic Characterization, Formulation and Efficacy in Planta of a *Siphoviridae* and *Podoviridae* Protection Cocktail against the Bacterial Plant Pathogens *Pectobacterium* spp. // Viruses. – 2020a. – V. 12. – № 2. – P. 150-166.
111. Zaczek-Moczydłowska M. A., Young G. K., Trudgett J., Plahe C., Fleming C. C., Campbell K., O’Hanlon R. Phage cocktail containing *Podoviridae* and *Myoviridae* bacteriophages inhibits the growth of *Pectobacterium* spp. under *in vitro* and *in vivo* conditions // PLoS ONE. – 2020b. – V. 15. – № 4. – P. e0230842.

112. Zhang Y., Fan Q., Loria R. A re-evaluation of the taxonomy of phytopathogenic genera *Dickeya* and *Pectobacterium* using whole-genome sequencing data // Systematic and Applied Microbiology. – 2016. – V. 39. – № 4. – P. 252–259.
113. Zhou J., Hu M., Hu A., Li C., Ren X., Tao M., Xue Y., Chen S., Tang C., Xu Y., Zhang L., Zhou X. Isolation and Genome Analysis of *Pectobacterium colocasium* sp. nov. and *Pectobacterium aroidearum*, Two New Pathogens of Taro // Frontiers in Plant Science. – 2022. – V. 13. – № 1. – P. 852750
114. FAOSTAT [Электронный ресурс]. URL: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (дата обращения: 21.06.2022).
115. Potatoes | ОЕС [Электронный ресурс]. URL: <https://oec.world/en/profile/hs/potatoes> (дата обращения: 21.06.2022).

Приложение 1

Результаты тестирования полученных систем детекции на коллекции штаммов *Pectobacterium*, а также сопутствующей микрофлоры, выделенной из картофельной гнили

№	Лабораторное название штамма	Другие названия	Где выделен	Вид	Метод идентификации	Pat	Pbr	Ppa r	Pver
						Cq	Cq	Cq	Cq
1	F004	PB72	Москва	<i>Pat</i>	NZ_PDDK0000000 0.1	21,35	-	-	-
2	F041		Москва	<i>Pat</i>	16S, BOX-PCR, MLST	23,01	-	-	-
3	F048	14	Москва	<i>Pat</i>	16S, BOX-PCR, MLST	18,8	-	-	-
4	F162	SCRI1043	Шотландия	<i>Pat</i>	NC_004547	16,28	-	-	-
5	F163	21A	Беларусь	<i>Pat</i>	NZ_CP009125	20,01	-	-	-
6	F241	36A	Беларусь	<i>Pat</i>	16S, BOX-PCR, MLST	21,13	-	-	-
7	F152	PB29	Москва	<i>Pbr</i>	NZ_PJDM0000000 0.1	-	17.34	-	-
8	F126		Самара	<i>Pbr</i>	NZ_RRYQ0000000 0.1	-	18.31	-	-
9	F128		Самара	<i>Pbr</i>	16S, BOX-PCR	-	21.03	-	-

№	Лабораторное название штамма	Другие названия	Где выделен	Вид	Метод идентификации	Pat	Pbr	Ppr	Pver
						Cq	Cq	Cq	Cq
10	F157	PB38	Москва	<i>Pbr</i>	NZ_PJDL00000000 .1	-	19,05	-	-
11	F127	B5	Калуга	<i>Ppa</i>	16S, BOX-PCR, MLST	-	-	20,0 1	-
12	F148	PB20	Москва	<i>Ppa</i>	NZ_PDDJ00000000 .1	-	-	21.3 4	-
13	F149	PB21	Москва	<i>Ppa</i>	16S, BOX-PCR	-	-	19.8 1	-
14	F174	536 / I3	Москва	<i>Ppa</i>	BOX-PCR	-	-	22.3 1	-
15	F177		-	<i>Ppa</i>	BOX-PCR	-	-	20.9 9	-
16	F034	B9	Калуга	<i>Ppa</i>	16S, PCR	-	-	18,0 1	-
17	F035	B7	Калуга	<i>Pwa/Ppa</i>	BOX-PCR	-	-	21.5 6	-
18	F178		-	<i>Ppa/Pwa</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
19	F007	2892	ВКПМ	<i>Pwa</i>	16S, PCR, MLST	-	-	-	-
20	F002	PB69	Москва	<i>Pve</i>	NZ_PD VY00000000 0.1	-	-	-	15,8 3

№	Лабораторное название штамма	Другие названия	Где выделен	Вид	Метод идентификации	Pat	Pbr	Ppr	Pver
						Cq	Cq	Cq	Cq
22	F016		Рязань	<i>Pve</i>	NZ_RRYR0000000 0.1	-	-	-	19,6 1
23	F018		Москва	<i>Pve</i>	NZ_PDVV0000000 0.1	-	-	-	17,7
24	F020	523 / I6	Москва	<i>Pve</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	24,9 6
25	F021	526 / I4	Москва	<i>Pve</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	30,1 8
26	F040	524 / H4	Москва	<i>Pve</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	23,4 9
27	F131	12a	ВИЗР	<i>Pve</i>	NZ_PD VW0000000 0.1	-	-	-	14,8
28	F135	2.1 / F5	Москва	<i>Pve</i>	NZ_PD VX0000000 0.1	-	-	-	16,8 7
29	F015	D6	Москва	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
30	F023	2.4 / F1	Томск	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
31	F025	A7	Литва	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
32	F027	B9	Москва	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
33	F028	D1	Москва	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
34	F047	10b	Москва	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	24,5 9

№	Лабораторное название штамма	Другие названия	Где выделен	Вид	Метод идентификации	Pat	Pbr	Ppr r	Pver
						Cq	Cq	Cq	Cq
35	F050	10a	Москва	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	23,8
36	F058	512 / I1	Москва	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	23,8
37	F061	35 / F8	Эфиопия	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	25,7 5
38	F062	246 / I8	Москва	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	21,1 9
39	F063	D3	Неизвестно	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
40	F064	520 / F6	Москва	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	19,9 8
41	F073	5	Неизвестно	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	20,7 7
42	F077	B6	Эфиопия	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
43	F092	E2	Москва	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
44	F098	A4	Москва	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
45	F121	C8	Москва	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
46	F124	2019.14	Тверь	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
47	F133	C1	Тюмень	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
48	F136		Брянск	<i>Pca/Pve</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
49	F008	3455	ВКПМ	<i>Pca/Pve</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
50	F053	B6	Неизвестно	<i>Pca/Pve</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-

№	Лабораторное название штамма	Другие названия	Где выделен	Вид	Метод идентификации	Pat	Pbr	Ppr	Pver
						Cq	Cq	Cq	Cq
51	F089	G5	Москва	<i>Pca/Pve</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
52	F118	522 / G2	Москва	<i>Pca/Pve</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	21,44
53	F160	NCPPB31 2	Дания	<i>Pca</i>	NZ_QNHJ00000000. 1	-	-	-	-
54	F008	3455	ВКПМ	<i>Pca</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
55	F053	B6	Неизвестно	<i>Pca</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
56	F089	G5	Москва	<i>Pca</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
57	F118	522 / G2	Москва	<i>Pca</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
58	F164	PB31	Москва	<i>Paq</i>	NZ_PJJA00000000. 1	-	-	-	-
59	F109	35 / E6	Эфиопия	<i>Ppo</i>	NZ_RRYS00000000 0.1	-	-	-	-
60	F171	2019.19-4	Москва	<i>Ppo</i>	16S, BOX-PCR, MLST	-	-	-	-
61	F182	2019.41	Москва	<i>Ppo</i>	16S, BOX-PCR, MLST	-	-	-	-
62	F012	Dfil	Воронеж	<i>Dso</i>	NZ_PGOJ00000.1	-	-	-	-
63	F085	H3	Москва	<i>Ddi</i>	NZ_RSBK0000000 0.1	-	-	-	-

№	Лабораторное название штамма	Другие названия	Где выделен	Вид	Метод идентификации	Pat	Pbr	Ppr	Pver
						Cq	Cq	Cq	Cq
64	F090	18b	Калуга	<i>Ddi</i>	16S, BOX-PCR, MLST	-	-	-	-
65	F014	B1	Тула	<i>Ddi</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
66	F056	A4	Москва	<i>Ddi</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
67	F069	C7	Москва	<i>Ddi</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
68	F071	C3	Москва	<i>Ddi</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
69	F072	B6	Москва	<i>Ddi</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
70	F097	1913 / H9	Москва	<i>Ddi</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
71	F117	C9	Брянск	<i>Ddi</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
72	F119	F8	Москва	<i>Ddi</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
73	F120	C7	Самара	<i>Ddi</i>	BOX-PCR	-	-	-	-
74	F082	H4	Москва	<i>Dickeya sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
75	F096	F9	Самара	<i>Dickeya sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
76	F153	PB30	Москва	<i>Lelliottia</i>	NZ_PKFT00000000 .1	-	-	-	-
77	F154	PB35	Москва	<i>Lelliottia</i>	NZ_PKFV00000000 0.1	-	-	-	-
78	F159	PB66	Москва	<i>Lelliottia</i>	NZ_PKFU00000000 0.1	-	-	-	-

№	Лабораторное название штамма	Другие названия	Где выделен	Вид	Метод идентификации	Pat	Pbr	Ppr	Pver
						Cq	Cq	Cq	Cq
79	F113		Неизвестно	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
80	F009	2220	Москва	<i>Clavibacter michiganensis</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
81	F010	2222	Неизвестно	<i>Clavibacter michiganensis</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
82	F091		Литва	<i>Curtobacterium sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
83	F094		Эфиопия	<i>Curtobacterium sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
84	F065	442 / H8	Москва	<i>Serratia sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
85	F036		Неизвестно	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
86	F037	20/I3	Москва	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
87	F038	1808v	Новгород	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
88	F045	A3	Краснодар	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
89	F049	1808b	Новгород	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
90	F055		Москва	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-

№	Лабораторное название штамма	Другие названия	Где выделен	Вид	Метод идентификации	Pat	Pbr	Ppr	Pver
						Cq	Cq	Cq	Cq
91	F060		Эфиопия	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
92	F066		Самара	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
93	F079	1860b	Воронеж	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
94	F059	2354	Неизвестно	<i>Stenotrophomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
95	F039	A8	Литва	<i>Pseudomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
96	F052		Москва	<i>Pseudomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
97	F054	E4	Москва	<i>Pseudomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
98	F080	C7	Неизвестно	<i>Pseudomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
99	F093		Литва	<i>Pseudomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
100	F114		Неизвестно	<i>Pseudomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
101	F115	1861a	Белгород	<i>Pseudomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
102	F123		Москва	<i>Pseudomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
103	F125		Неизвестно	<i>Pseudomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
104	F013	DD	Москва	<i>Xanthomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
105	F030		Москва	<i>Xanthomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
106	F076	C3	Москва	<i>Xanthomonas sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-

№	Лабораторное название штамма	Другие названия	Где выделен	Вид	Метод идентификации	Pat	Pbr	Ppr r	Pver
						Cq	Cq	Cq	Cq
107	F019	I9	Москва	<i>Advenella sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
108	F024	A1	Москва	<i>Advenella sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
109	F033	245/G8	Москва	<i>Morganella sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-
110	F074		Неизвестно	<i>Morganella sp.</i>	16S, BOX-PCR	-	-	-	-

Приложение 2

Общие характеристики геномов семейства *Pectobacteriaceae*, использовавшихся при сравнении среднегеномного сходства, филогенетическом анализе и для поиска видоспецифичных последовательностей. Номенклатура указана в соответствии с данными NCBI по состоянию на 01.12.2020 г.

Сокращения: *D.* – *Dickeya*, *P.* – *Pectobacterium*, *P. c.* – *Pectobacterium carotovorum* subsp.

№ п/п	NCBI Accession	Штамм	Общая длина последовательностей, н.п.	% ГЦ	Тип генома (■ – драфт, ● – полный)
1	CP014137	<i>Brenneria goodwinii</i> FRB141	5360730	53,1	●
2	CP034036	<i>Brenneria nigrifluens</i> ATCC 13028	4891702	55,9	●
3	LT615367	<i>D. aquatica</i> 174/2	4501560	53,6	●
4	JSYH	<i>D. chrysanthemi</i> L11	4767879	54,3	■
5	CM001981	<i>D. chrysanthemi</i> NCPPB 3533	4681779	54,5	●
6	CM001974	<i>D. chrysanthemi</i> NCPPB 402	4669628	54,4	●
7	CM001904	<i>D. chrysanthemi</i> NCPPB 516	4549457	54,3	●
8	NC_014500	<i>D. dadantii</i> 3937	4922802	56,3	●
9	CP023467	<i>D. dadantii</i> DSM 18020	4997541	56,4	●
10	CM001982	<i>D. dadantii</i> NCPPB 3537	4781918	56,5	●
11	CM001976	<i>D. dadantii</i> NCPPB 898	4829443	56,3	●
12	CM001978	<i>D. dadantii</i> subsp. <i>dieffenbachiae</i> NCPPB 2976	4802068	56,5	●
13	PJJB	<i>D. dianthicola</i> DE440	4867975	55,7	■
14	CM001838	<i>D. dianthicola</i> GBBC 2039	4649420	56,4	●
15	CM002023	<i>D. dianthicola</i> IPO 980	4662278	55,9	●
16	CP031560	<i>D. dianthicola</i> ME23	4909058	55,7	●
17	CM001840	<i>D. dianthicola</i> NCPPB 3534	4775960	55,8	●

18	CM001841	<i>D. dianthicola</i> NCPPB 453	4652956	56,0	●
19	CP017638	<i>D. dianthicola</i> RNS04.9	4720132	56,0	●
20	QZDO	<i>D. dianthicola</i> S4.16.03.LID	4863939	55,7	■
21	QZDN	<i>D. dianthicola</i> S4.16.03.P2.4	4865147	55,7	■
22	QESZ	<i>D. dianthicola</i> SS70	4797592	55,9	■
23	PJJC	<i>D. dianthicola</i> WV516	4906266	55,6	■
24	JXBN	<i>D. fangzhongdai</i> B16	4888679	56,7	■
25	CP025003	<i>D. fangzhongdai</i> DSM 101947	5027163	56,8	●
26	JSXD	<i>D. fangzhongdai</i> M005	5105736	56,6	■
27	JRWY	<i>D. fangzhongdai</i> M074	4952363	56,8	■
28	CP009460	<i>D. fangzhongdai</i> ND14b	5052868	56,9	●
29	CP020872	<i>D. fangzhongdai</i> PA1	4979223	56,9	●
30	JXBO.2	<i>D. fangzhongdai</i> S1	4942112	56,9	■
31	CM001857	<i>D. paradisiaca</i> NCPPB 2511	4631867	55,0	●
32	AMWE	<i>D. solani</i> D s0432-1	4904518	56,2	■
33	PDVN	<i>D. solani</i> F012	4879104	56,2	■
34	CM001860	<i>D. solani</i> GBBC 2040	4860047	56,3	●
35	CP024711	<i>D. solani</i> IFB 0099	4932920	56,2	●
36	PENA	<i>D. solani</i> IFB_0158	4879070	56,2	■
37	PEMZ	<i>D. solani</i> IFB_0221	4878255	56,2	■
38	CP024710	<i>D. solani</i> IFB0223	4937554	56,2	●
39	CP015137	<i>D. solani</i> IPO 2222	4919833	56,2	●
40	CM001839	<i>D. solani</i> MK10	4934019	56,2	●
41	CM001842	<i>D. solani</i> MK16	4865372	56,2	●
42	CP017454	<i>D. solani</i> PPO 9019	4918850	56,3	●
43	JWLT	<i>D. solani</i> PPO 9134	4870830	56,2	■
44	JWMJ	<i>D. solani</i> RNS 05.1.2A	4985571	56,1	■
45	JWLR	<i>D. solani</i> RNS 07.7.3B	4871815	56,2	■
46	CP016928	<i>D. solani</i> RNS 08.23.3.1.A	4922468	56,3	●
47	JSYG	<i>D. sp.</i> 2B12	4349790	54,5	■
48	CM001973	<i>D. sp.</i> CSL RW240	4264625	53,6	●

49	CM001983	<i>D. sp.</i> DW 0440	4306477	53,4	●
50	RJLS	<i>D. sp.</i> FVG10-MFV-A16	4542143	54,5	■
51	RJLR	<i>D. sp.</i> FVG1-MFV-O17	4613716	54,5	■
52	CM001984	<i>D. sp.</i> MK7	4905506	56,6	●
53	CM001979	<i>D. sp.</i> NCPPB 3274	4993902	56,7	●
54	CM001975	<i>D. sp.</i> NCPPB 569	4214632	52,7	●
55	QNUT	<i>D. sp.</i> S29	4306505	53,1	■
56	CP023484	<i>D. sp.</i> Secpp 1600	5108113	56,6	●
57	CM001972	<i>D. zeaе</i> CSL RW192	4693747	53,4	●
58	APMV	<i>D. zeaе</i> DZ2Q	4646517	53,2	■
59	CP006929	<i>D. zeaе</i> EC1	4532364	53,4	●
60	NC_013592	<i>D. zeaе</i> Ech586	4818394	53,6	●
61	CM001985	<i>D. zeaе</i> MK19	4658967	53,6	●
62	APWM	<i>D. zeaе</i> MS1	4748283	53,3	■
63	CP025799	<i>D. zeaе</i> MS2	4740052	53,4	●
64	CM001977	<i>D. zeaе</i> NCPPB 2538	4552467	53,6	●
65	CM001980	<i>D. zeaе</i> NCPPB 3531	4622940	53,7	●
66	CM001858	<i>D. zeaе</i> NCPPB 3532	4557062	53,6	●
67	AJVN	<i>D. zeaе</i> ZJU1202	4587105	53,3	■
68	CP023009	<i>Lonsdalea britannica</i> 477	4015569	55,1	●
69	LUTP	<i>Lonsdalea iberica</i> LMG 26264	3781823	55,0	■
70	LUTA	<i>Lonsdalea populi</i> CFCC 13280	3691323	55,4	■
71	FNQS	<i>Lonsdalea quercina</i> ATCC 29281	3779259	55,1	■
72	JRMH	<i>P. actinidiae</i> KKH3	4922167	51,5	■
73	QHJV	<i>P. aquaticum</i> A101-S19-F16	4274151	51,5	■
74	QHJU	<i>P. aquaticum</i> A104-S21-F16	4395676	51,4	■
75	QHJT	<i>P. aquaticum</i> A105-S21-F16	4310812	51,4	■
76	QHJS	<i>P. aquaticum</i> A127-S21-F16	4465102	51,2	■
77	QHJR	<i>P. aquaticum</i> A212-S19-A16	4348076	51,2	■
78	QHJW	<i>P. aquaticum</i> A35-S23-M15	4467243	51,3	■
79	CP009125	<i>P. atrosepticum</i> 21A	4991806	51,1	●

80	CP024956	<i>P. atrosepticum</i> 36A	4965575	51,1	●
81	ASAB	<i>P. atrosepticum</i> CFBP 6276	4860368	51,1	■
82	AODV	<i>P. atrosepticum</i> HAI2- SCRI1043	4933394	51,0	■
83	ALIV	<i>P. atrosepticum</i> ICMP 1526	4869384	50,9	■
84	CP007744	<i>P. atrosepticum</i> JG10-08	5004926	51,1	●
85	JQHO	<i>P. atrosepticum</i> NCPPB 3404	4898736	51,0	■
86	JQHK	<i>P. atrosepticum</i> NCPPB 549	5104595	50,9	■
87	PDDK	<i>P. atrosepticum</i> PB72	4985525	51,1	■
88	QESY	<i>P. atrosepticum</i> SS26	4927512	51,0	■
89	JQHL	<i>P. betavascularum</i> NCPPB 2793	4675732	51,0	■
90	JQHM	<i>P. betavascularum</i> NCPPB 2795	4685213	51,2	■
91	CP034276	<i>P. carotovorum</i> 14A	4997114	51,8	●
92	CP024842	<i>P. carotovorum</i> 3-2	4975878	51,8	●
93	NCQM	<i>P. carotovorum</i> BF20	4797319	52,2	■
94	NCQL	<i>P. carotovorum</i> BF45	4773619	52,2	■
95	FQWI	<i>P. carotovorum</i> DSM 30168	4759459	51,9	■
96	MWOH	<i>P. carotovorum</i> Ecc71	4925135	51,9	■
97	RRYR	<i>P. carotovorum</i> F16	5065330	51,8	■
98	PJJA	<i>P. carotovorum</i> F164	4564609	51,1	■
99	OANO	<i>P. carotovorum</i> s0416	4928901	51,0	■
100	OANP	<i>P. carotovorum</i> s0421	5255635	51,0	■
101	QZDH	<i>P. carotovorum</i> S1.15.11.2D	4818836	51,2	■
102	QZDG	<i>P. carotovorum</i> S1.16.01.3K	4946598	52,0	■
103	QZDJ	<i>P. carotovorum</i> S1-A16	4835633	51,9	■
104	QZDI	<i>P. carotovorum</i> S4.16.03.1C	4944722	52,0	■
105	QZDM	<i>P. carotovorum</i> S4.16.03.3F	4852595	51,9	■
106	QZDK	<i>P. carotovorum</i> S4.16.03.3I	4854084	51,9	■
107	QZDL	<i>P. carotovorum</i> S4.16.03.3K	4870940	51,9	■
108	CP021894	<i>P. carotovorum</i> SCC1	4974798	51,9	●
109	QESV	<i>P. carotovorum</i> SS96	5042015	51,8	■
110	MPUI	<i>P. c. actinidiae</i> ICMP 19971	4891911	51,5	■

111	MPUJ	<i>P. c. actinidiae</i> ICMP 19972	4886946	51,5	■
112	JUJT	<i>P. c. brasiliense</i> B6	4683764	52,2	■
113	CP009769	<i>P. c. brasiliense</i> BC1	4920350	51,8	●
114	LGRF	<i>P. c. brasiliense</i> BD255	4820279	52,0	■
115	CP024780	<i>P. c. brasiliense</i> BZA12	4924809	52,0	●
116	JPSM	<i>P. c. brasiliense</i> CFIA1001	4765951	52,1	■
117	JPSN	<i>P. c. brasiliense</i> CFIA1009	4757978	52,2	■
118	JPSO	<i>P. c. brasiliense</i> CFIA1033	4706268	51,3	■
119	RRYQ	<i>P. c. brasiliense</i> F126	5026308	52,0	■
120	PJDM	<i>P. c. brasiliense</i> F152	4765091	51,9	■
121	PJDL	<i>P. c. brasiliense</i> F157	4863659	51,9	■
122	JQOE	<i>P. c. brasiliense</i> LMG 21371	4831535	52,1	■
123	JQOD	<i>P. c. brasiliense</i> LMG 21372	4926602	52,2	■
124	LKKQ	<i>P. c. brasiliense</i> PcbHPI01	4822177	52,1	■
125	JUJF	<i>P. c. brasiliense</i> S2	4836921	52,0	■
126	CP020350	<i>P. c. brasiliense</i> SX309	4966299	52,2	●
127	JUJJ	<i>P. c. brasiliense</i> Y21	4762596	52,1	■
128	JUJK	<i>P. c. brasiliense</i> Y29	4815476	51,9	■
129	JUJM	<i>P. c. brasiliense</i> Y3	4740143	52,1	■
130	JUJL	<i>P. c. brasiliense</i> Y31	4826010	52,0	■
131	JUJB	<i>P. c. brasiliense</i> Y49	4702692	52,0	■
132	JUJC	<i>P. c. brasiliense</i> Y52	4780080	52,2	■
133	JUJP	<i>P. c. brasiliense</i> Y60	4832431	52,0	■
134	JUJD	<i>P. c. brasiliense</i> Y62	4857062	52,0	■
135	JUJE	<i>P. c. brasiliense</i> Y64	4816280	52,1	■
136	JUJN	<i>P. c. brasiliense</i> Y65	4680590	52,0	■
137	JUJH	<i>P. c. brasiliense</i> YC Y46	4777745	52,0	■
138	ALIU	<i>P. c. brasiliensis</i> ICMP 19477	4979055	52,1	■
139	ABVX	<i>P. c. brasiliensis</i> PBR1692	4918574	51,9	■
140	QHMC	<i>P. c. carotovorum</i> ATCC 39048	4637928	52,0	■
141	JUJR	<i>P. c. carotovorum</i> B2	4756023	52,0	■

142	JUJS	<i>P. c. carotovorum</i> B5	4826332	52,2	■
143	AODT	<i>P. c. carotovorum</i> ICMP 5702	4774457	51,9	■
144	VBUA	<i>P. c. carotovorum</i> LMG 2410	4780562	51,9	■
145	JQHJ	<i>P. c. carotovorum</i> NCPPB 312	4764922	51,9	■
146	NC_012917	<i>P. c. carotovorum</i> PC1	4862913	51,9	●
147	NC_018525	<i>P. c. carotovorum</i> PCC21	4842771	52,2	●
148	BGPS	<i>P. c. carotovorum</i> RMIT1	4995997	51,8	■
149	ABVY	<i>P. c. carotovorum</i> WPP14	4823187	52,0	■
150	JUJO	<i>P. c. carotovorum</i> Y16	4741163	51,9	■
151	JUJQ	<i>P. c. carotovorum</i> Y39	4965577	51,9	■
152	JUJG	<i>P. c. carotovorum</i> Y57	4819926	51,9	■
153	CP009678	<i>P. c. odoriferum</i> BC S7	4933575	51,8	●
154	JQOG	<i>P. c. odoriferum</i> NCPPB 3839	5066211	51,6	■
155	JQOF	<i>P. c. odoriferum</i> NCPPB3841	5472601	51,5	■
156	MTAK	<i>P. c. odoriferum</i> Q106	5058220	51,5	■
157	MTAL	<i>P. c. odoriferum</i> Q115	5085540	51,4	■
158	MTAO	<i>P. c. odoriferum</i> Q142	5083832	51,4	■
159	MTAP	<i>P. c. odoriferum</i> Q166	5086265	51,4	■
160	MTAG	<i>P. c. odoriferum</i> Q3	5050068	51,4	■
161	MTAI	<i>P. c. odoriferum</i> Q32	4972249	51,5	■
162	MTAH	<i>P. c. odoriferum</i> Q40	5144582	51,3	■
163	MTAJ	<i>P. c. odoriferum</i> Q47	4922397	51,6	■
164	MTAQ	<i>P. c. odoriferum</i> S6	4869321	51,7	■
165	MTAM	<i>P. c. odoriferum</i> S6-2	4867089	51,7	■
166	MTAN	<i>P. c. odoriferum</i> T4	5061459	51,4	■
167	MTAR	<i>P. c. odoriferum</i> T5	5129710	51,3	■
168	QEKR	<i>P. carotovorum</i> WS2152	5023534	51,8	●
169	JSXC	<i>P. fontis</i> M022	4151564	51,2	■
170	JENG	<i>P. parmentieri</i> CFIA1002	5008535	50,6	■
171	CP026977	<i>P. parmentieri</i> IFB5408	5022017	50,4	●
172	CP027260	<i>P. parmentieri</i> IFB5427	5125304	50,4	●

173	CP026979	<i>P. parmentieri</i> IFB5432	5010533	50,5	●
174	CP026980	<i>P. parmentieri</i> IFB5441	5082177	50,3	●
175	CP026981	<i>P. parmentieri</i> IFB5485	4885249	50,6	●
176	CP026982	<i>P. parmentieri</i> IFB5486	5038122	50,5	●
177	PSZH	<i>P. parmentieri</i> IFB5597	5046647	50,6	■
178	CP026983	<i>P. parmentieri</i> IFB5604	4877201	50,6	●
179	CP026984	<i>P. parmentieri</i> IFB5605	5040694	50,4	●
180	CP026985	<i>P. parmentieri</i> IFB5619	4959302	50,6	●
181	CP026986	<i>P. parmentieri</i> IFB5623	5006798	50,3	●
182	PSZG	<i>P. parmentieri</i> IFB5626	5059731	50,5	■
183	PDDJ	<i>P. parmentieri</i> PB20	4822743	50,5	■
184	CP015749	<i>P. parmentieri</i> RNS 08-42-1A	5030841	50,4	●
185	NC_017845	<i>P. parmentieri</i> SCC3193	5164411	50,4	●
186	QESW	<i>P. parmentieri</i> SS90	4917173	50,5	■
187	NC_013421	<i>P. parmentieri</i> WPP163	5063892	50,5	●
188	PYUP	<i>P. peruvienne</i> A350-S18-N16	4871019	51,1	■
189	PYUO	<i>P. peruvienne</i> A97-S13-F16	4755191	51,0	■
190	LUBB	<i>P. peruvienne</i> IFB5229	3975456	51,2	■
191	LXFV	<i>P. peruvienne</i> IFB5232	4785880	51,1	■
192	AODU	<i>P. peruvienne</i> UGC32	4797741	51,1	■
193	RRYS	<i>P. polaris</i> F109	4858646	51,9	■
194	JQHN	<i>P. polaris</i> NCPPB 3395	4574142	51,0	■
195	CP017481	<i>P. polaris</i> NIBIO1006	4826824	52,0	●
196	CP017482	<i>P. polaris</i> NIBIO1392	5008416	52,0	●
197	QZDF	<i>P. polaris</i> S4.16.03.2B	4862009	51,7	■
198	QESX	<i>P. polaris</i> SS28	4722413	51,9	■
199	JUJI	<i>P. polaris</i> Y1	3884778	51,3	■
200	RJTN	<i>P. polonicum</i> DPMP315	4836128	51,3	■
201	PYSO	<i>P. punjabense</i> SS95	4732531	50,6	■
202	RMBP	<i>P. sp.</i> A67-S18-O15	4965960	51,9	■
203	RMBQ	<i>P. sp.</i> A69-S13-O15	4887126	51,9	■

204	RMBR	<i>P. sp.</i> A75-S21-O15	4957380	51,8	■
205	RMBS	<i>P. sp.</i> CFBP1552	4934970	51,8	■
206	RMBT	<i>P. sp.</i> CFBP5663	5101804	51,4	■
207	RMBU	<i>P. sp.</i> CFBP6051	4949375	51,9	■
208	PDVV	<i>P. versatile</i> F018	4911663	51,9	■
209	PDVW	<i>P. versatile</i> F131	4786484	52,1	■
210	PDVX	<i>P. versatile</i> F135	4891351	52,0	■
211	PDVY	<i>P. versatile</i> PB69	4993011	51,8	■
212	PDVZ	<i>P. versatile</i> PB70	4992983	51,8	■
213	AKVS	<i>P. wasabiae</i> CFBP 3304	5149301	50,6	■
214	JQHP	<i>P. wasabiae</i> NCPPB 3701	5009192	50,5	■
215	JQOH	<i>P. wasabiae</i> NCPPB3702	5010624	50,5	■
216	PESL	<i>P. zantedeschiae</i> 2M	4985156	50,6	■
217	QETE	<i>P. zantedeschiae</i> PC2	5094003	50,4	■
218	LT897836	<i>Sodalis</i> endosymbiont of <i>Henestaris halophilus</i> HBA	1622395	36,8	●
219	AP008232	<i>Sodalis glossinidius</i> str. <i>morsitans</i>	4171146	54,7	●
220	CP006569	<i>Sodalis praecaptivus</i> HS1	4709528	57,5	●
221	BASS	<i>Sodalis</i> -like symbiont of <i>Philaenus spmarius</i> PSPU	1386675	54,2	■

Приложение 3

Список 92 генов, использовавшихся для мультилокусного анализа.

№ п/п	Ген	Функция гена
1	alaS	Аланин-тРНК лигаза
2	argS	Аргинин-тРНК лигаза
3	aspS	Аспартат-тРНК лигаза
4	cgtA	ГТФаза ObgE/CgtA
5	coaE	Дефосфо-СоА киназа
6	cysS	Цистеин-тРНК лигаза
7	dnaA	Репликационный протеин DnaA
8	dnaG	ДНК праймаза
9	dnaX	ДНК полимеразы III, субъединица γ
10	engA	ГТФаза Der
11	ffh	Белок SRP
12	fnt	Метионил-тРНК формилтрансфераза
13	frr	Фактор рециркуляции рибосом
14	ftsY	Рецептор SRPFtsY
15	gmk	Гуанилат киназа
16	hisS	Гистидин-тРНК лигаза
17	ileS	Изолейцин-тРНК лигаза 1
18	infB	Фактор инициации трансляции IF-2
19	infC	Фактор инициации трансляции IF-3
20	ksgA	Малая субъединица метилтрансферазы рибосомальной РНК А
21	lepA	Фактор элонгации 4
22	leuS	Лейцин-тРНК лигаза
23	ligA	ДНК лигаза
24	nusA	Белок терминации транскрипции NusA
25	nusG	Белок терминации транскрипции NusG
26	pgk	Фосфоглицерат киназа
27	pheS	Фенилаланин-тРНК лигаза субъединица α
28	pheT	Фенилаланин-тРНК лигаза субъединица β
29	prfA	Фактор высвобождения пептидной цепи 1
30	pyrG	ЦТФ синтаза
31	recA	Белок рекомбинации и репарации ДНК
32	rbfA	Фактор связывания рибосомы 30S

33	rnc	Рибонуклеаза 3
34	rplA	50S рибосомальный белок L1
35	rplB	50S рибосомальный белок L2
36	rplC	50S рибосомальный белок L3
37	rplD	50S рибосомальный белок L4
38	rplE	50S рибосомальный белок L5
39	rplF	50S рибосомальный белок L6
40	rplI	50S рибосомальный белок L9
41	rplJ	50S рибосомальный белок L10
42	rplK	50S рибосомальный белок L11
43	rplL	50S рибосомальный белок L7/L12
44	rplM	50S рибосомальный белок L13
45	rplN	50S рибосомальный белок L14
46	rplO	50S рибосомальный белок L15
47	rplP	50S рибосомальный белок L16
48	rplQ	50S рибосомальный белок L17
49	rplR	50S рибосомальный белок L18
50	rplS	50S рибосомальный белок L19
51	rplT	50S рибосомальный белок L20
52	rplU	50S рибосомальный белок L21
53	rplV	50S рибосомальный белок L22
54	rplW	50S рибосомальный белок L23
55	rplX	50S рибосомальный белок L24
56	rpmA	50S рибосомальный белок L27
57	rpmC	50S рибосомальный белок L29
58	rpmI	50S рибосомальный белок L35
59	rpoA	ДНК-зависимая РНК полимеразы субъединица α
60	rpoB	ДНК-зависимая РНК полимеразы субъединица β
61	rpoC	ДНК-зависимая РНК полимеразы субъединица β'
62	rpsB	30S рибосомальный белок S2
63	rpsC	30S рибосомальный белок S3
64	rpsD	30S рибосомальный белок S4
65	rpsE	30S рибосомальный белок S5
66	rpsF	30S рибосомальный белок S6
67	rpsG	30S рибосомальный белок S7

68	rpsH	30S рибосомальный белок S8
69	rpsI	30S рибосомальный белок S9
70	rpsJ	30S рибосомальный белок S10
71	rpsK	30S рибосомальный белок S11
72	rpsL	30S рибосомальный белок S12
73	rpsM	30S рибосомальный белок S13
74	rpsO	30S рибосомальный белок S15
75	rpsP	30S рибосомальный белок S16
76	rpsQ	30S рибосомальный белок S17
77	rpsR	30S рибосомальный белок S18
78	rpsS	30S рибосомальный белок S19
79	rpsT	30S рибосомальный белок S20
80	secA	Субъединица транслоказы SecA
81	secG	Мембранный белок экспорта SecG
82	secY	Субъединица транслоказы SecY
83	serS	Серин-тРНК лигаза
84	smpB	SsrA-связывающий белок
85	tig	Триггерный фактор
86	tilS	тРНК(изолейцин)-лизидин synthase
87	truB	тРНК псевдоуридинсинтаза B
88	tsaD	тРНК N6-аденозин треонилкарбамоилтрансфераза
89	tsf	Фактор элонгации Ts
90	uvrB	Системный белок UvrABC B
91	ybeY	Эндорибонуклеаза YbeY
92	ychF	Рибосом-связывающая АТФаза YchF