

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Лукьянова Анна Александровна

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

1.5.11. Микробиология

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова и в лаборатории молекулярной биоинженерии отдела молекулярной биологии и биотехнологии растений Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Научные руководители – *Котова Ирина Борисовна*, доктор биологических наук, профессор

Мирошников Константин Анатольевич, член-корреспондент РАН, доктор химических наук

**Официальные
оппоненты**

– *Донова Марина Викторовна* — доктор биологических наук, ФГБУН «ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований» РАН», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, отдел аналитической биохимии, лаборатория микробиологической трансформации органических соединений, заведующая лабораторией

Пакина Елена Николаевна — доктор сельскохозяйственных наук, доцент, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Аграрно-технологический институт, агробиотехнологический департамент, директор

Дзантиев Борис Борисович — доктор химических наук, профессор, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии Российской академии наук», Институт биохимии им. А.Н. Баха, руководитель отдела лиганд-рецепторных взаимодействий и биосенсорики, заведующий лабораторией иммунобиохимии

Защита диссертации состоится «14» февраля 2023 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, аудитория М-2.

Е-mail: nvkostina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/517489973/>

Автореферат разослан «26» декабря 2022г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,

кандидат биологических наук



Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Pectobacteriaceae – семейство, включающее большое разнообразие фитопатогенных бактерий, способных поражать широкий спектр хозяев. В частности, ряд представителей этой группы способен инфицировать клубни и сосудистую систему картофеля, являясь возбудителями мягкой гнили и черной ножки. В среднем такие инфекции уносят 15-30% товарных клубней ежегодно. В некоторых случаях потери при хранении и дальнейшей транспортировке могут достигать 50%. 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. Основным средством контроля распространения мягкой гнили и черной ножки является сертификация семенного материала и своевременная диагностика латентной инфекции.

Дополнительной мерой, которая способна снизить потери урожайного картофеля при хранении, могла бы служить обработка клубней антимикробными агентами. 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, снижая риск развития мягкой гнили, а также повышая всхожесть картофеля. Однако, как правило, фаги специфичны к одному виду или даже штамму внутри вида. Поэтому, для использования фаготерапии необходимо понимать с точностью до вида, для какого конкретно патогена необходимо подобрать фаговый препарат. 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* произошло множество фундаментальных изменений в структуре и таксономическом составе этой группы бактерий. В последние годы было описано более десятка новых видов, а старые таксоны переформированы. Как следствие, для многих видов данного семейства, включая наиболее важные с точки зрения приносимого урона, 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 *Pectobacterium atrosepticum* (Pat). Наиболее встречаемым возбудителем мягкой гнили считается *P. carotovorum*. Однако стоит отметить, что за последние годы состав таксономического вида *P. carotovorum* неоднократно пересматривался и

существенно сужался. Часть штаммов, ранее причисляемая к данному виду, ранее была классифицирована как *P. wasabiae*, затем клада возбудителей внутри *P. wasabiae*, ассоциированная с картофелем, была выделена в отдельный вид *P. parmentieri* (Ppar). Кроме того, часть штаммов *P. carotovorum* была выделена в отдельный вид, *P. versatile* (Pver). Этот вид, по-видимому, гораздо более часто встречается на территории Российской Федерации, нежели собственно *P. carotovorum*. Другим распространенным патогеном картофеля является *P. brasiliense* (Pbr), первоначально идентифицированный как возбудитель бактериозов картофеля в Бразилии. До 2012–2013 гг. *P. brasiliense* не был выявлен в странах Европы, однако в настоящий момент данный патоген распространен не только в Европе, но и в России.

Для всех этих патогенов, за исключением Pat, средств видоспецифичной диагностики разработано не было. В то же время существующие ПЦР-системы для выявления Pat были разработаны два десятилетия назад и являются существенно устаревшими, а потому требуют обновления.

Разработка систем диагностики для 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 ее достижения 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 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 присутствия пектобактерий, 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 Горносталя 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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы состоит из пяти разделов. Первый раздел посвящен краткой характеристике картофеля как сельскохозяйственной культуры, истории его распространения и важности в современном мире. Второй раздел повествует о разнообразии бактериальных инфекций картофеля и наиболее вредоносных фитопатогенных бактериях этой группы. Третий раздел посвящен возбудителям мягкой гнили и черной ножки картофеля. В нем подробно изложены микробиологические и биохимические особенности данного семейства фитопатогенов, особенности развития инфекции, пути распространения патогенов и методы борьбы с ними. Особый акцент сделан на важность видоспецифичной детекции мягкогнилостных пектобактерий (МГП). Четвертый раздел рассматривает современные представления о таксономии группы и описывает существенные изменения в понимании таксономической структуры семейства *Pectobacteriaceae*, произошедшие в последние годы. Последний раздел посвящен существующим методам детекции МГП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Штаммы и условия культивирования

Для проведения данного исследования была использована коллекция лаборатории молекулярной биоинженерии ИБХ РАН, включающая более сотни штаммов бактерий, выделенных из картофельных гнилей на полуселективной кристалвиолет-пектатной 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. Рутинное культивирование штаммов проводили при 28 °С в среде LB (г/л): триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 10. 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

Геномный анализ

Геномный анализ, включавший сравнение среднегеномного сходства (average nucleotide identity, ANI) и филогенетический анализ, проводили с использованием последовательностей всех 221 полных и 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, а также отдельных представителей родственных групп.

Полногеномный сравнительный анализ проводился 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).

Филогенетический анализ с использованием отдельных генов проводили с использованием выравниваний генов 16S рРНК и с использованием соединённых (конкатенированных) выравниваний (т. н. «мультилокусный анализ», multilocus sequence analysis, MLSA), полученных с использованием нуклеотидных последовательностей 92 консервативных генов, 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 весовой матрицы BLOSUM62. Конкатенация выравниваний проводилась встроенным инструментом Geneious Prime 2020

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 отличающихся в остальных штаммах, не принадлежащих к целевому виду.

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. «позитивные» базы) и

нецелевых видов (т. н. «негативные» базы). 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 использовали типовой штамм.

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 далее, 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, содержащей все штаммы целевого вида. В результате выполнения третьего этапа алгоритма были отобраны для дальнейшей работы k -меры, гомологичные участкам целевых геномов.

Четвёртый этап алгоритма состоял из картирования отобранных k -меров на референсный геном с помощью Geneious Mapper и дополнительной проверки 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 отдавалось участкам, которые могли быть важными для вирулентности и жизнедеятельности бактерии, например, относящихся к локусам систем секреции, и генам, не принадлежащих к числу часто передающихся с помощью горизонтальных переносов, таких, 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 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 при проведении ПЦР ложноположительных результатов

Выделение ДНК из бактерий

Выделение ДНК бактерий проводили при помощи набора GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoScientific, США) согласно протоколу производителя. Для выделения ДНК из зараженного картофеля использовали протокол выделения с использованием бромида цетилтриметиламмония (СТАВ). Концентрацию полученных образцов ДНК оценивали, используя спектрофотометр NanoProteometer N60 (NanoProteometer, Германия). О надлежащей чистоте образцов судили по значениям A260/230 и A260/A280. После измерения концентрации образцы доводили до рабочей концентрации 10 нг/мкл.

Условия проведения ПЦР

Классическую ПЦР проводили в объеме 25 мкл. Каждая реакция содержала 5 мкл окрашенной реакционной смеси 5x ScreenMix (Евроген, Россия), 0,35 мМ прямого и обратного праймера и 60 нг ДНК. Условия термоциклирования: 94 °С – 300 с; далее 28 циклов: 94 °С – 10 с, 62 °С – 10 с, 72 °С – 20 с; хранение - 4 °С. Полученные ПЦР-продукты разделяли в 1,5% агарозном геле и визуализировали добавлением бромистого этидия.

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 прямого и обратного праймера и 60 нг ДНК. Условия термоциклирования: 94 °С – 300 с; далее 45 циклов: 94 °С – 10 с, 62 °С – 10 с, 72 °С – 10 с; хранение - 4 °С.

Получение тестовой плазмиды

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. atrosepticum*, *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 был клонирован в вектор pAL2-T (содержит кассету устойчивости к ампициллину в качестве селективного маркера) с использованием набора для ТА-клонирования Quick-TA kit (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Затем полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки штамма *E.coli* NovaBlue (Novagen, США).

После инкубации трансформированных клеток в течение ночи при °С на среде с ампициллином, 10-15 проверяли на наличие соответствующей вставки в плазмиде. Для этого клетки стерильным наконечником пипетки добавляли в ПЦР смесь с

соответствующей парой праймеров и проводили амплификацию. Наличие ПЦР-продукта соответствующей длины (около 200 н.п) свидетельствовало об успешно прошедшей вставке. Клоны, содержащие плазмиду со вставкой подращивали в 4 мл жидкой среды LB и выделяли плазмидную ДНК при помощи набора QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя. Успешное выделение плазмиды регистрировали, измеряя концентрацию ДНК в полученном растворе с очищенной плазмидой и на 1,5% агарозном геле. Корректность вставки проверяли секвенированием полученной плазмиды по Сэнгеру (Евроген, Россия).

Определение чувствительности и эффективности ПЦР

Для определения предела чувствительности метода проводили десятикратные разведения тестовой плазмиды и геномной ДНК, с которой изначально была амплифицирована лигированная в плазмиду последовательность каждого из четырех видов. Далее с полученными разведениями проводили qПЦР и строили зависимость порогового цикла (C_q) от логарифма количества копий целевой последовательности на реакцию. В качестве предела чувствительности вычисляли минимальное количество копий на миллилитр, детектируемое ПЦР системой. Эффективность ПЦР вычисляли исходя из угла наклона полученной калибровочной кривой.

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 замочены на 15 мин в 3% перекиси водорода для поверхностной стерилизации и тщательно промыты стерильной дистиллированной водой. Затем картофель высушивали на воздухе, после чего на поверхность клубней наносили насечки. Клубни замачивали в бактериальной суспензии с 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. С полученными пробами ставили ПЦР для определения возможности детекции патогена.

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.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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.

Одним из наиболее популярных методов сравнения полных геномов является кластеризация по признаку среднегеномного сходства (ANI, average nucleotide identity), поэтому в первую очередь были вычислены значения ANI для таксонов семейства *Pectobacteriaceae*. Пороговым значением в таком анализе, позволяющем сказать, что два генома принадлежат организмам одного вида, считается 95-96%. Кластеризация по данному признаку является важным параметром, который следует учитывать при таксономическом анализе, однако одного только этого признака недостаточно. Как показали вычисленные значения ANI, для многих представителей рода *Pectobacterium* характерно высокое общегеномное сходство и ANI близки к пороговым. 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 важные отличия, которые можно выявить другими методами анализа.

Кроме того, нами было построено филогенетическое дерево порядка *Enterobacteriales*, используя полные последовательности генов 16S рРНК. Как показала полученная дендрограмма, 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.

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. Построенная с помощью этого алгоритма кладограмма (Рисунок 1) 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.

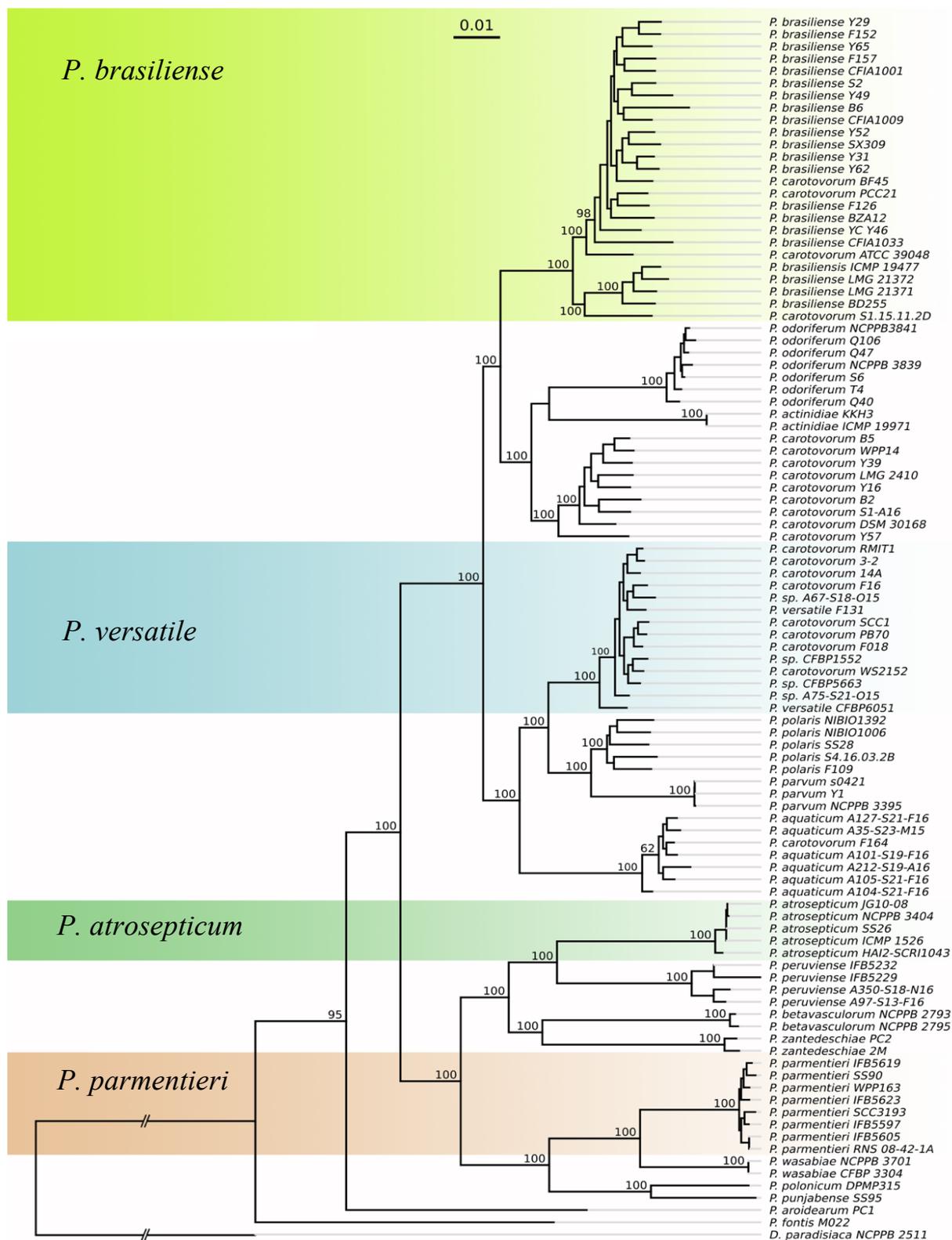


Рисунок 1. Мультилокусный анализ рода *Pectobacterium* по последовательностям 92 коровых генов, выделенных с помощью алгоритма UBCG. Филогенетическое дерево получено с помощью метода максимального правдоподобия, реализованного программой RAxML, результаты бутстрэп-анализа приведены около соответствующих узлов, количество реплик составило 1000, внешняя группа — *Dickeya paradisiaca* NCPPB

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

Кроме того, была исследована группа штаммов *Pectobacterium* sp., для которых был отмечен высокий уровень среднегеномного сходства. Из описанных видов пектобактерий наибольшее сходство по этому признаку данная группа штаммов разделяет с *P. aquaticum*. Анализ с использованием последовательностей 92 конкатенированных генов, полученных с использованием алгоритма UBCG, подтвердил выдвинутую на основании значений ANI гипотезу о том, что эта группа образует отдельную кладу, сестринскую *P. aquaticum*. Результаты проведенного анализа, в ходе которого мы предположили, что данные штаммы вероятно являются представителями нового вида, были опубликованы нашей научной группой в мае 2021 (Lukianova et al., 2021), а в октябре того же года, вышла статья, в которой эта группа штаммов утверждается как новый вид, *P. quasiaquaticum* (Moussa et al., 2021).

Поиск участков 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 ранее. 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 составляла около 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.

Таблица 1. Полученные в этой работе праймеры и зонды для видоспецифичной детекции бактерий рода *Pectobacterium*.

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)-GCCCAAGATATGACTT-(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)-AATGTCACAAGAAAACCG AT-(dT-BHQ-1)-TCATGG-(Pi)
		PbrR: 5'-GTA GCA ACG CCG CAT TCC-3'	

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

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

Первичная проверка селективности детекции представителей рода *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. zea* (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).

Для каждого участка, выбранного для видоспецифичной детекции (Таблица 1), была показана амплификация только с целевыми штаммами и отсутствие ложноположительных сигналов (Рисунок 2).

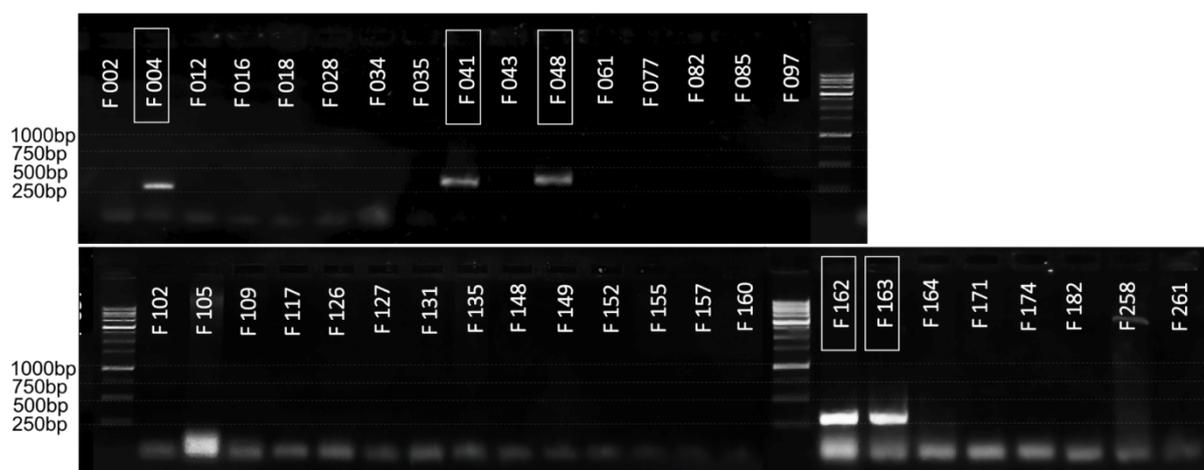


Рисунок 2. Пример результатов эксперимента, демонстрирующего специфичность ПЦР с набором праймеров PatF и PatR для детекции *P. atrosepticum*. Дорожки, соответствующие реакции со штаммами целевого вида, обозначены рамкой. Для определения размера фрагмента использован маркер длин «1 kb DNA Ladder» (Евроген, Россия).

Оценка селективности детекции штаммов рода *Pectobacterium* в режиме qПЦР

Далее проводили аналогичное исследование с использованием ПЦР в реальном времени (qПЦР), используя набор из 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.

В данном случае для всех четырех систем детекции также была показана высокая селективность, наличие амплификации со всеми целевыми штаммами и отсутствие сигнала с изолятами других видов (Рисунок 3).

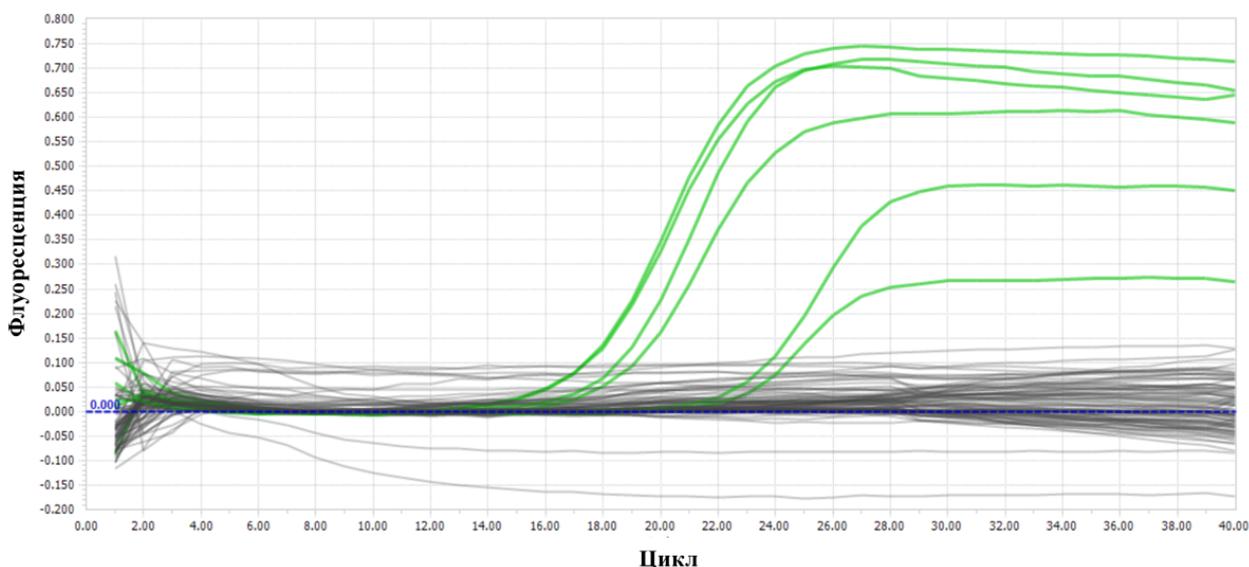


Рисунок 3. Пример кривых амплификации для эксперимента по оценке селективности метода. Зеленым обозначены кривые амплификации, полученные для образцов с целевыми штаммами. Черным обозначены кривые всех остальных штаммов и контроля.

Оценка чувствительности и эффективности ПЦР

Для оценки чувствительности и расчета эффективности амплификации для каждой из четырех ПЦР-систем была сконструирована тестовая плаزمида. Такая плаزمида представляет собой вектор рAL2-T со вставкой целевого участка и кассетой устойчивости к ампициллину в качестве селективного маркера. Данная плаزمида 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 4).

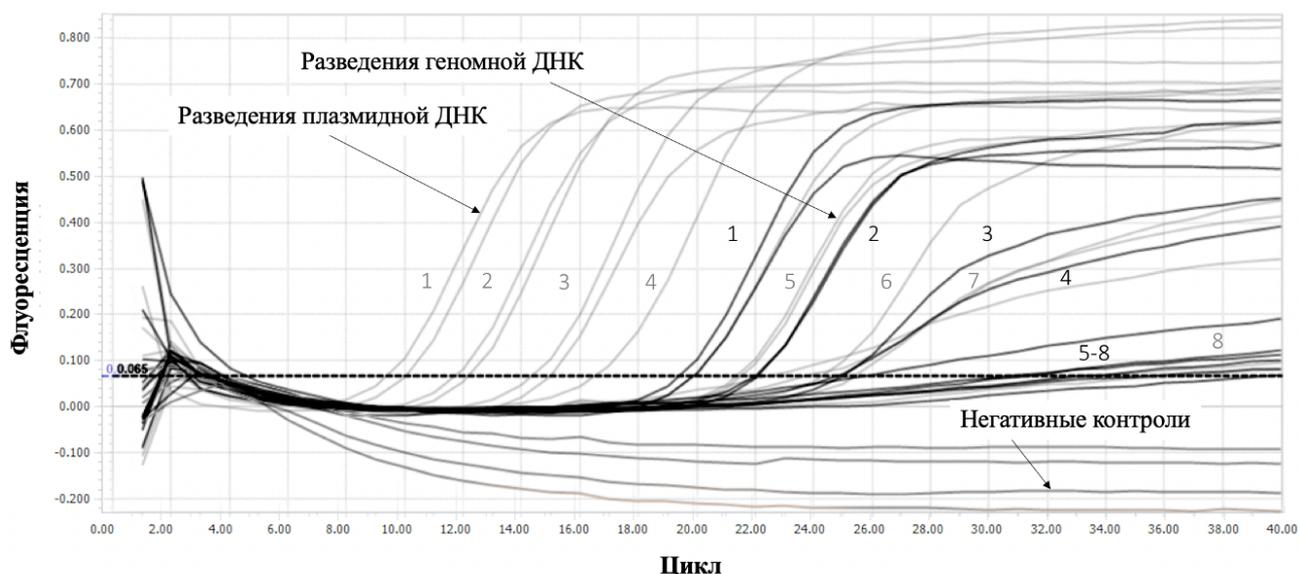


Рисунок 4. Пример внешнего вида кривых амплификации в эксперименте с определением чувствительности qПЦР. Серым обозначены кривые амплификации, полученные для образцов с разведениями плазмидной ДНК. Черным обозначены разведения геномной ДНК, снизу – негативные контроли, с добавлением воды вместо ДНК. 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 (Рисунок 5).

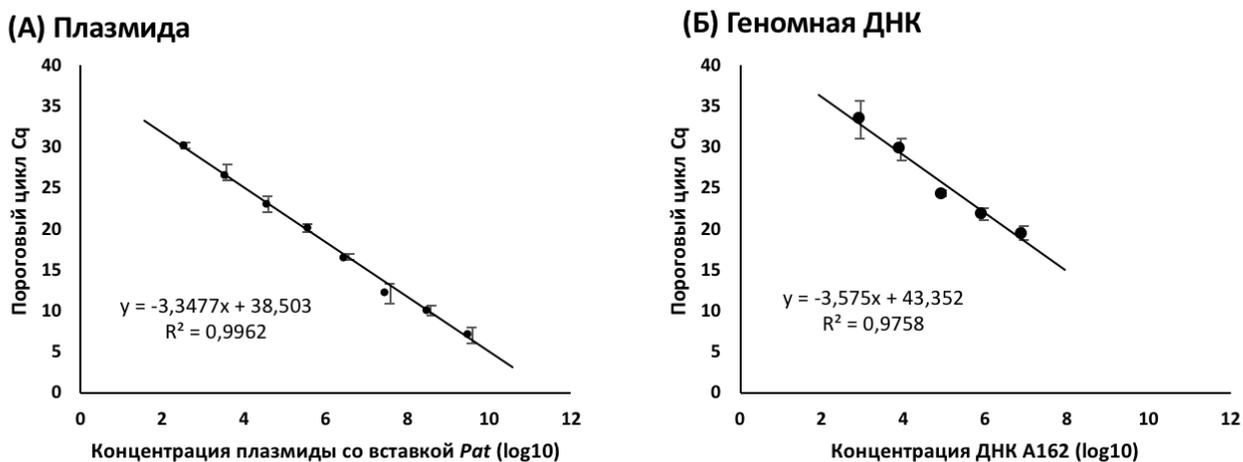


Рисунок 5. Пример зависимости порогового цикла амплификации от концентрации ДНК в пробе в эксперименте с разведениями тестовой плазмиды rAL2-T-Pat (А) и геномной ДНК *P. atrosepticum* F162 (Б).

Во всех случаях графики имели линейный характер со значением R^2 от 0,93 до 0,99, 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 составил 10^2 - 10^3 копий/мл и был сопоставим с аналогичными тестами для детекции фитопатогенных бактерий (Kim et al., 2011; Li et al., 2011). Данные значения концентраций патогена находятся ниже уровня развития симптомов инфекции. 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.

Тестирование возможности детекции пектобактерий на искусственно зараженных растениях

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

Для этого было экспериментально подтверждено 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, содержащей как картофельную ДНК, так и компоненты картофельного сока. Во всех случаях присутствие картофельного экстракта не оказало существенного влияния на протекание реакции. Эффективность амплификации во всех случаях была близка к 100% и сравнима как на фоне картофельного экстракта, так и без него (Рисунок 6).

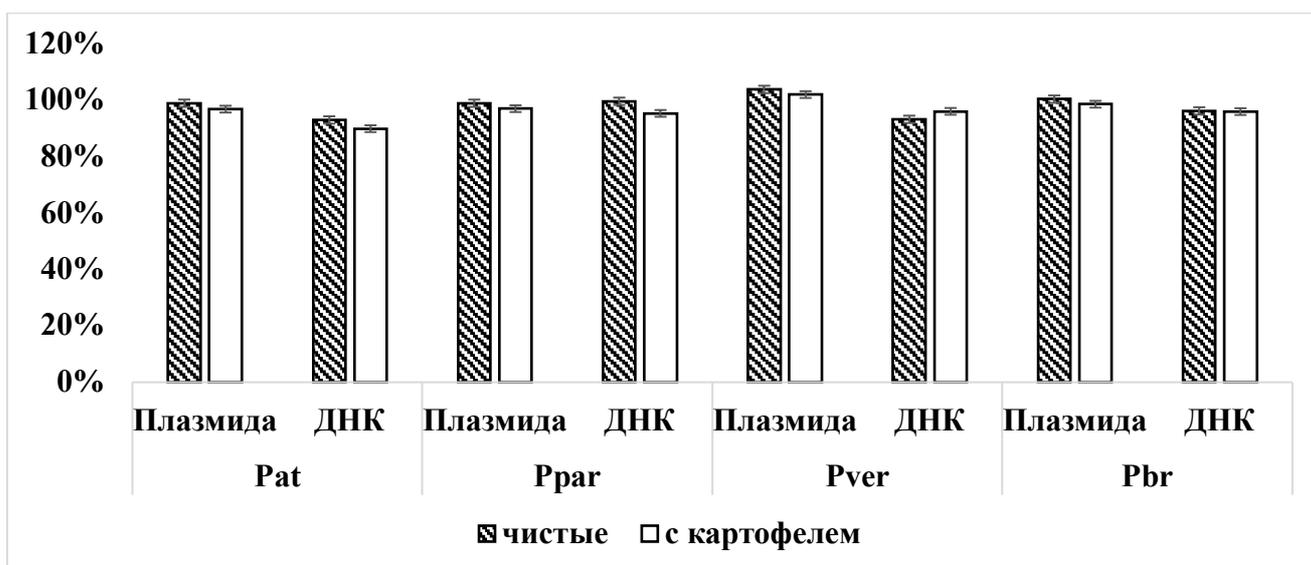


Рисунок 6. Сравнение эффективности ПЦР с тестовой плазмидой и геномной ДНК в обычных условиях (отмечено черным) и на фоне добавления картофельного экстракта в реакционную смесь (отмечено белым)

Кроме того, был проведен эксперимент на искусственно зараженных растениях. Для этого были получены клубни картофеля, зараженные каждым из четырех патогенов. Далее была выделена тотальная ДНК из кусочка ткани, не подверженного симптомам гниения, и проведена оценка инфицированности полученных тканей. В качестве контроля использовали визуально здоровый картофель, вымоченный в питательной среде вместо бактериальной суспензии.

В результате эксперимента во всех зараженных образцах была обнаружена инфекция с концентрацией патогена от 10^3 до 10^5 КОЕ/мл картофельного экстракта, что соответствует потенциально опасной латентной инфекции. Таким образом, в модельном эксперименте было успешно выявлено латентное заражение 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, способную производить одновременную детекцию всех четырех патогенов в одном образце, что существенно упрощает их анализ.

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

Для оценки распространения целевых видов в Московской области было взято 59 образцов картофеля, собранных в 2020-2021 годах (Рисунок 7). Как видно из полученных данных, среди отобранных образцов картофеля у 29% была выявлена латентная инфекция. В собранных образцах были обнаружены все четыре патогена, на которых сфокусирована работа. Полученные данные согласуются с мониторингом 2010-2014 годов, в котором посредством ИФА выявляли зараженность картофеля рядом важных бактериальных фитопатогенов, в том числе

МГП. Зараженность продовольственного картофеля МГП тогда составила 28% (Зайцев и др., 2016).

Результаты нашего исследования показали, что наиболее встречаемым видом оказался *P. versatile*. Им были заражены более 15% образцов картофеля. Кроме того, оказался достаточно распространённым теплоустойчивый *P. brasiliense*: 7% образцов были заражены этим патогеном. Реже встречались *P. parmentieri* (3%) и *P. atrosepticum* (3%).

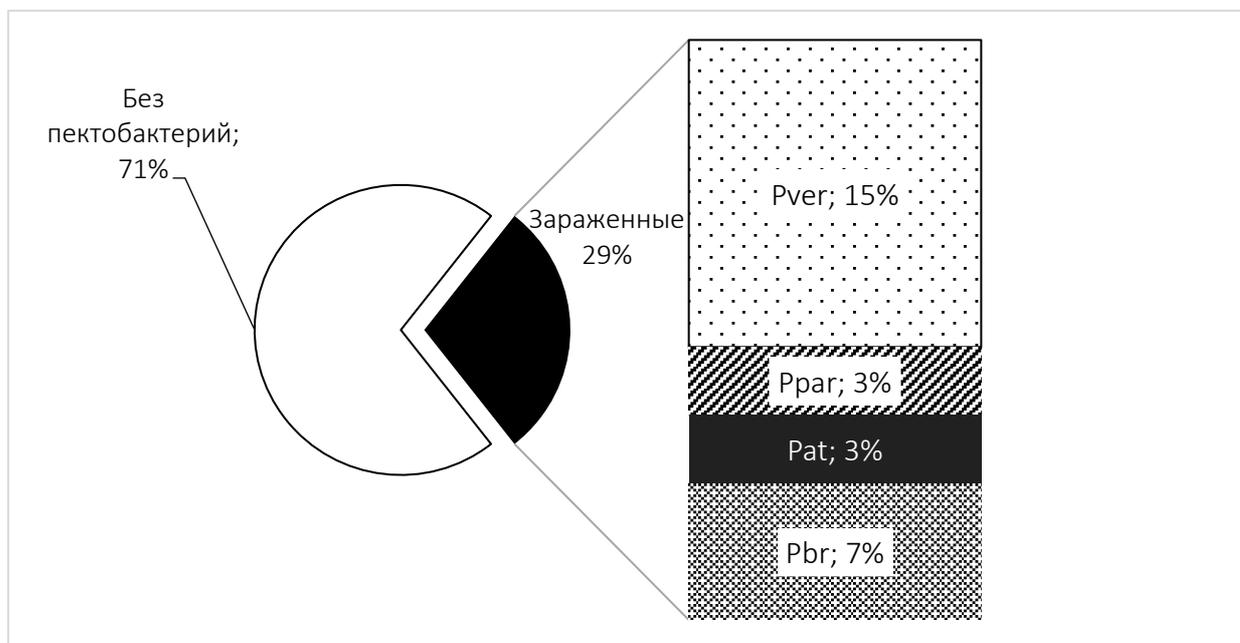


Рисунок 7. Зараженность образцов картофеля видами рода *Pectobacterium*

Любопытно отметить, что *P. atrosepticum* и *P. parmentieri*, обнаруженные в образцах 107/3, 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 образце 166/2. В среднем она составила $1,03 \times 10^4$ кл/мл для *P. versatile*, $7,16 \times 10^4$ кл/мл для *P. parmentieri*, $9,02 \times 10^6$ кл/мл для *P. atrosepticum* и $1,51 \times 10^5$ кл/мл для *P. brasiliense* (Рисунок 8).

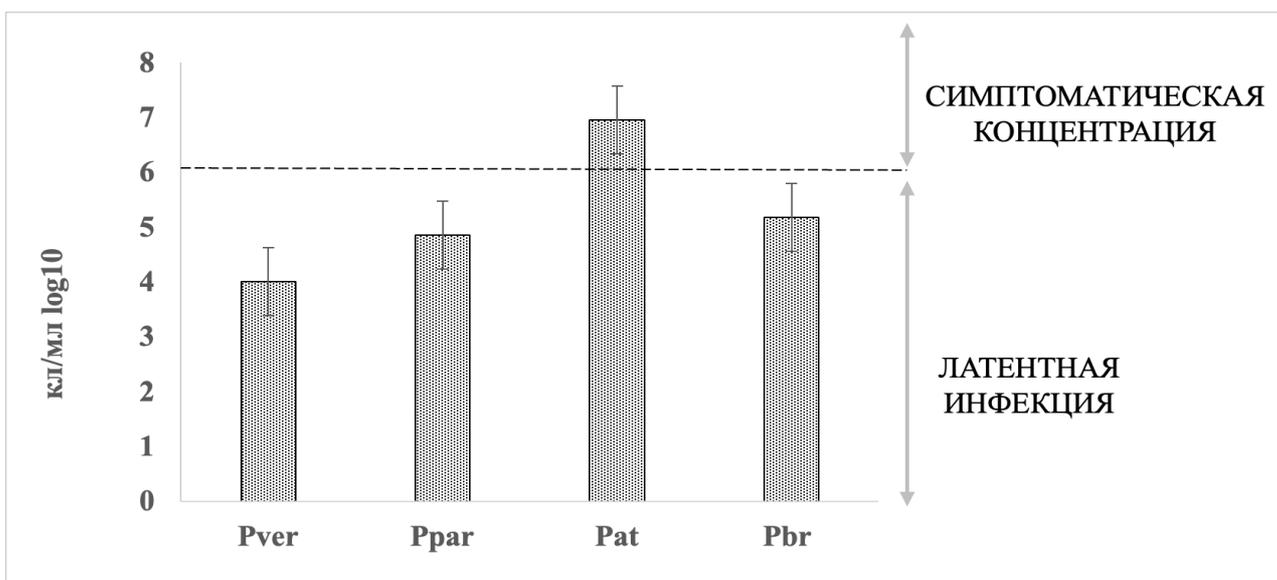


Рисунок 8. Обсемененность исследованных образцов картофеля пектобактериями

Таким образом, большинство образцов были инфицированы латентно. Согласно данным литературы, такая концентрация патогена обычно встречается в зараженном картофеле без признаков гниения (Pérombelon, 2002), которая при транспортировке или хранении в неоптимальных условиях 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 гнили, но и представляют из себя угрозу как агент контаминации здорового картофеля.

Своевременная диагностика и выбраковка таких партий могла бы позволить существенно снизить риск потерь и предотвратить развитие мягкой гнили.

Кроме того, на основании информации о распространённости и соотношении МГП в микробиоте картофеля, можно планировать дополнительные профилактические мероприятия. 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)

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и RSCI:

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. DOI: 10.3390/plants10020355 (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. — Vol. 106, no. 6. — P. 1851. DOI: 10.1094/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. DOI: 10.3390/plants10091880 (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, Dmitry 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)

1 монография:

1. Бактериофаги возбудителей мягкой гнили растений (*Pectobacterium* и *Dickeya*) / К. А. Мирошников, А. А. Лукьянова, П. В. Евсеев, А. Н. Игнатов. — УлГАУ им. П. А. Столыпина Ульяновск, 2020., ISBN 978-5-6045035-3-9 — 96 с.