

АПРОБАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ *DICKEYA SOLANI* ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЁТА ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК, ВЫЗВАННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЕМ ИМПУЛЬСНОЙ КСЕНОНОВОЙ ЛАМПЫП.Ю. КРУПИН^{1,3}, А.Б. ЯРЕМКО¹, Ю.С. ПАНЫЧЕВА¹, К.А. ТУМАШЕВИЧ²,
А.Т. ОРЫНБАЕВ³, Е.С. МАЗУРИН⁴, М.Г. ДИВАШУК^{1,3}¹ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии;² Московский государственный технический университет имени Н.Э. Баумана;³ РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева;⁴ Всероссийский центр карантина растений)

Dickeya solani – один из возбудителей чёрной ножки картофеля, который представляет большую угрозу для картофельных хозяйств. Традиционным методом обеззараживания поверхностей является облучение ртутной кварцевой лампой. Бактерицидный эффект УФ-лампы заключается в том, что УФ-излучение вызывает образование циклобутановых пиримидиновых димеров и 6–4 фотопродуктов в ДНК, которые блокируют ДНК-полимеразу, синтезирующую дочернюю цепь ДНК на матрице повреждённой материнской в ходе репликации, и РНК-полимеразу, синтезирующую цепь РНК на матрице повреждённой ДНК. Большой перспективой в качестве альтернативы для обеззараживания семенного материала картофеля является облучение импульсной ксеноновой лампой. Ксеноновая лампа характеризуется широкополосным излучением, обеспечивая бактерицидный эффект по отношению к облучаемым микроорганизмам независимо от спектра их поглощения. При этом высокая интенсивность существенно снижает время, необходимое для достижения заданной степени обеззараживания. Для оценки эффекта бактерицидной лампы на ДНК бактерии *D. solani* нами было проведено сравнение различных способов проведения ПЦР-РВ с использованием ранее разработанного диагностикума. Установлено, что наиболее оптимальная схема ПЦР-РВ для данной цели предполагает вариант проведения ПЦР с зондом TaqMan® с ДНК, выделенной из бактериальной культуры после облучения. Зависимость доли повреждений от дозы облучения носит линейный характер ($R^2=0,99$). Исходя из данных о размере генома нами рассчитано, что для повреждения каждых 100 пн ДНК необходима доза излучения в УФ-С ~1 мДж/см². Обсуждается роль репарации при облучении и летальное количество мутаций для бактериальной клетки.

Ключевые слова: полимеразная цепная реакция в реальном времени, *Dickeya solani*, чёрная ножка картофеля, импульсная ксеноновая лампа, обеззараживание, ДНК, TaqMan, EvaGreen, зонд.

* Работа выполнена по теме государственного задания ФАНО России № 0574-2015-002. Работа была выполнена с использованием оборудования «Центра коллективного пользования научным оборудованием ВНИИСБ «Биотехнология».

Dickeya solani – граммотрицательная пектолитическая бактерия (син. *Erwinia chrysanthemi* или *Pectobacterium chrysanthemi*), вызывающая чёрную ножку картофеля. Чёрная ножка картофеля проявляется в виде некроза прикорневой части стеблей растений и мягкой гнили посадочных или хранящихся клубней, что приводит к существенным экономическим потерям. Были известны сведения, что бактерия поражала только декоративные культуры (гиацинт, ирис), но в 2004–2005 годах выделили штаммы, поражающие картофель, условно обозначенные «*Dickeya solani*» (биовариант 3 *Erwinia chrysanthemi*), которые начали распространяться по Европе с семенным картофелем из Голландии [20]. Геном бактерии размером около $4,8 \cdot 10^6$ пн был секвенирован [11, 17], и на основании молекулярно-биологических подходов бактерия была выделена в самостоятельный вид *Dickeya solani* [25]. Симптомы заражения сходны с заражением видами *Pectobacterium* и *D. dianthicola*, но при этом *D. solani* более агрессивна, нанося ущерб при большем диапазоне условий при меньшей бактериальной нагрузке [1, 5]. В настоящее время является одним из главных патогенов картофеля в Европе. В России заболевание картофеля, вызываемое *D. solani*, впервые было обнаружено в 2011 году. По данным обследования полей и партий клубней картофеля в 2013 г. в Московской, Тульской, Калужской, Брянской, Самарской и ряде других областях, бактерии рода *Dickeya*, в том числе *D. solani*, были обнаружены в качестве доминирующего возбудителя черной ножки картофеля по сравнению с бактериями *Pectobacterium* ssp. [2]. Так как этот патоген представляет большую угрозу для картофельных хозяйств, то во ВНИИСБ был разработан диагностический тест, который позволяет методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) идентифицировать бактерию в растительном материале [6].

Ультрафиолетовое (УФ) облучение является одним из перспективных методов обеззараживания семенного материала, в том числе и клубней картофеля [22], так как позволяет обработать всю поверхность клубня. Бактерицидный эффект УФ-лампы заключается в том, что УФ-излучение вызывает образование циклобутановых пиримидиновых димеров и 6–4 фотопродуктов в ДНК, которые блокируют ДНК-полимеразу, синтезирующую дочернюю цепь ДНК на матрице повреждённой материнской в ходе репликации, и РНК-полимеразу, синтезирующую цепь РНК на матрице повреждённой ДНК [10, 19].

В качестве альтернативы традиционной бактерицидной ртутной лампе в описываемых экспериментах использовалась импульсная ксеноновая лампа. Импульсная ксеноновая лампа – это газоразрядный прибор, состоящий из двух вольфрамовых электродов, впаянных в стеклянную колбу. Источником излучения является высокоинтенсивный дуговой разряд, возникающий в межэлектродном промежутке, заполненном ксеноном [4].

Выбор в пользу импульсной ксеноновой лампы обусловлен рядом ее преимуществ по сравнению с традиционными ртутными источниками. Импульсное излучение является широкополосным и непрерывно перекрывает всю УФ область от 190 нм (граница пропускания кварца) до 400 нм, обеспечивая бактерицидных эффект по отношению к облучаемым микроорганизмам, независимо от спектра их поглощения, при этом высокая интенсивность существенно снижает время, необходимое для достижения заданной степени обеззараживания [3].

Бактерицидная эффективность широкополосного импульсного облучения УФ неоднократно была показана на граммотрицательных бактериях кишечной палочки (*E. coli*) при обеззараживании воды [9, 27]. Исследования показали, что широкополосное излучение успешно инактивирует бактерии, в том числе и высокоустойчивые споры бактерий [21].

Достоинства импульсных ксеноновых ламп как источника бактерицидного излучения расширило их применение в отношении самых различных объектов: пищевых продуктов [13, 26], напитков [23], поверхностей предметов и помещений [15], упаковочных материалов [24] и т.д.

Несмотря на широкое использование импульсных ксеноновых ламп механизм патогенного воздействия импульсного УФ-излучения на микроорганизмы пока остается слабо изученным. Нами было проведено тщательное изучение бактерицидного действия импульсных ксеноновых ламп на клеточном, генетическом и молекулярном уровнях. Ранее нами было показано методом 10-ти кратного серийного разведения на среде YDC, что при сравнении результатов без облучения и с облучением наблюдается мощный бактерицидный эффект при дозах облучения 30 и 300 мДж/см². Результаты, полученные на искусственно инокулированных ломтиках картофеля, показали эффективность импульсного облучения при дозах 20, 1205, 3614 и 9637 кДж/см² (учитывался диаметр мацерированной ткани) [7]. Однако данный метод не даёт представления о том, какие изменения происходят на уровне белков и ДНК. Состояние ДНК определяет жизнеспособность клетки. Несмотря на способность клетки восстанавливать нарушения ДНК в ходе репарации, при значительном воздействии облучения клетка гибнет. К настоящему моменту разработаны подходы, которые позволяют оценить эффект воздействия облучения на структуру молекулы ДНК. На ДНК в результате облучения образуются повреждения, которые блокируют ДНК-полимеразу [8]. Следовательно, количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ) позволяет детектировать изменения, произошедшие с ДНК. В ходе ПЦР-РВ исследователь получает значение C_t , которое показывает номер цикла ПЦР, при котором начинается экспоненциальный рост продукта реакции. Чем меньше доступна ДНК для ДНК-полимеразы, тем позднее начинается экспоненциальный рост, то есть тем больше значение C_t . Данный подход успешно был испробован для изучения повреждений ДНК, вызванных ультрафиолетовым облучением [12, 16, 18]. Количественное использование показателя C_t возможно в случае, если эффективность праймеров (E) находится в диапазоне 90–100% [28, 29]. Смысл этого показателя заключается в том, что в идеальном случае ($E=100\%$) за один цикл ПЦР количество амплифицирующейся ДНК должно увеличиваться в два раза. Построение стандартной калибровочной кривой позволяет оценить, во сколько раз в реальности изменяется количество ДНК в ходе одного цикла ПЦР.

Система ПЦР-РВ может быть основана на разных источниках флуоресценции: с зондом или специфическим для ДНК красителем. Зонд типа TaqMan® представляет собой короткую олигонуклеотидную цепь, на 5'-конце которого иммобилизован флуорофор, а на 3'-конце – гаситель флуорофора. Благодаря тому, что гаситель находится пространственно рядом с флуорофором, сигнал последнего подавляется. В ходе ПЦР зонд связывается с матрицей ДНК по комплементарному ему участку. ДНК-полимераза в ходе синтеза разрушает зонд благодаря 5'-3' экзонуклеазной активности, в результате чего флуорофор высвобождается и испускает сигнал, интенсивность которого прямо пропорциональна количеству ампликонов. Использование зонда позволяет проводить детекцию амплификации даже в том случае, если образуется несколько различных по размеру амплифицируемых продуктов, так как он специфично связывается с конкретной последовательностью. Однако затраты на его синтез повышают общую стоимость анализа. ДНК-специфичные красители (SYBR-Green®, EvaGreen®), неспецифически связываясь с образующимися ампликонами, испускают сигнал. Специфичные ДНК-красители дешевле зондов, однако для их использования требуется оптимизация ПЦР-РВ таким образом, чтобы синтезировался только один продукт.

ПЦР при работе с бактериями в качестве источника ДНК можно использовать как предварительно выделенную ДНК, так и добавляя в пробирку с ПЦР-смесью бактериальную культуру. Преимуществом использования непосредственно бактериальной культуры является быстрота процедуры за счёт отсутствия этапа выделения ДНК и уменьшение ошибки опыта из-за меньшего числа манипуляций с матрицей. Однако при этом часть ДНК может оказаться недоступной для ДНК-полимеразы. ДНК, выделенная из бактерии после облучения, полностью доступна для ДНК-полимеразы. Но в ходе выделения ДНК из бактерии неизбежны её потери и нарушение её нативности, что может повлиять на достоверность и воспроизводимость полученных данных. Таким образом, существуют различные подходы для проведения самой ПЦР-РВ для оценки повреждений ДНК. При наличии ПЦР-РВ набора для детекции патогенной бактерии необходимо выбрать оптимальную систему флуоресценции и источник ДНК. При этом основным критерием выбора должна служить эффективность праймеров E в разных условиях проведения ПЦР. Цель нашего исследования состояла в апробации и оптимизации ПЦР-РВ с использованием набора для детекции *D. solani* для целей количественной оценки фотоповреждений ДНК.

Методика исследований

Приготовление культуры бактерий

Облучалась суточная культура бактерии *D. solani* штамма D. Fil. Культуру бактерии выращивали на среде ПДА (расчет на 1 л): дрожжевой экстракт – 5 г, пептон – 10 г, глюкоза – 5 г, агар-агар – 20 г. Для получения суточной культуры используют 50 мкл суспензии (D. Fil в PBS-буфере) на 1 чашку Петри и равномерно распределяют по чашке стерильным шпателем. Выставляют на 24 часа в термостат при $t=27^{\circ}\text{C}$. После культуру на чашке собирали микробиологической петлей прокаленной в пламени горелки и переносили в пробирку по 1,5 мл в раствор PBS-буфера (фосфатно-солевой буфер). Тщательно перемешивали суспензию для дальнейшего использования.

Облучение бактерий

Для облучения использовали суточную культуру бактерии *D. solani*. По 2 мл суспензии переносили на чашки Петри. опыты проведены на экспериментальной установке, в которой в качестве источника УФ-излучения использовалась импульсная ксеноновая лампа ИНП 7/80 (диаметр тела свечения – 7 мм, длина – 80 мм). Контроль средней облученности чашки с микрофлорой в УФ-С диапазоне осуществлялся фотодетектором TOCON C8, калиброванным на длине волны 253 нм. Приемник располагался на расстоянии 19 см от оси лампы напротив разрядного промежутка. Выходной сигнал приемника излучения фиксировался цифровым запоминающим осциллографом Tectronix TDS 2014C и усреднялся по 16 импульсам. Средняя облученность (в Вт/см²) рассчитывалась по формуле:

$$P_s = U \cdot A_{\lambda} \cdot f,$$

где U – сигнал (В), A_{λ} – калибровочный коэффициент фотоприемника (Дж/В·см²), f – частота повторения импульсов.

Время экспозиции определялось как отношение заданной энергетической дозы облучения к средней облученности.

Чашки и пробирки располагались под лампой вдоль ее оси на расстоянии 19 см с целью равномерного облучения и обеспечения одинаковой дозы на всех облучаемых объектах. Каждую чашку с культурой облучали отдельно с открытыми крышками при каждой дозе. После облучения с чашки Петри культуру переносили в пробирки

по 1,5 мл. В опыте было четыре варианта дозы облучения (в скобках время экспозиции): контроль (без облучения), 50 мДж/см² (1 мин. 8 с.), 500 мДж/см² (11 мин. 16 с.) и 1000 мДж/см² (22 мин. 31 с.).

Выделение ДНК из бактерий

Непосредственно после облучения из бактерии *D. solani* выделяли ДНК с помощью набора для выделения «ФитоСорб» (ООО «Синтол», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Для выделения брали образцы бактериальной культуры объемом в 500 мкл. Концентрацию ДНК измеряли на приборе Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Постановка ПЦР-РВ

Набор для детекции *D. solani* разработан в Лаборатории диагностики патогенов растений ВНИИСБ и Центре коллективного пользования научным оборудованием ВНИИСБ «Биотехнология» [6]. ПЦР ставили в зависимости от вариантов опыта либо с ДНК, выделенной непосредственно после облучения бактерии, либо с суспензией бактериальной культуры сразу же после облучения.

Набор с зондом Dick_sola_P типа TaqMan®, меченым красителем ROX: ПЦР-смесь общим объемом 25 мкл для проведения ПЦР-РВ с зондом ROX готовили из следующих компонентов (все – синтез «Синтол», Россия): 2,5х реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ - 10 мкл, Dick_sola_F/R – 4 пМ, Dick_sola_P – 2,5 пМ, СПЗ «ВПК-9-Су5» – 0,1 мкл (внутренний положительный контроль), SynTaq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами T+ - 0,5 мкл, H₂O – 8,35 мкл, ДНК-матрица (или суспензия бактериальной культуры) – 5 мкл [6].

Набор EvaGreen®: ПЦР-смесь общим объемом 25 мкл для проведения ПЦР-РВ красителем EvaGreen® готовили из следующих компонентов (все – синтез «Синтол», Россия): 2,5х реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EvaGreen® – 10 мкл, Dick_sola_F/R – 4 пМ, СПЗ «ВПК-9-Су5» – 0,1 мкл (внутренний положительный контроль), SynTaq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами T+ 0,5 мкл, H₂O – 8,6 мкл, ДНК-матрица – 5 мкл.

Каждую реакцию ставили в двукратной технической повторности. Амплификацию для обоих наборов (с зондом TaqMan® и EvaGreen®) проводили при следующих температурно-временных параметрах: начальная денатурация (95°C – 5 мин.); последующие 45 циклов: денатурация (95°C – 15 с.), отжиг (60°C – 40 с.) – точка съемки сигнала. Амплификацию проводили на амплификаторе для ПЦР RealTime - CFX96 (Bio-Rad, США).

Для построения калибровочных кривых была приготовлена серия из восьми последовательных двукратных разведений выделенной из бактерии ДНК (88,4 нг/мкл) и серия из семи последовательных двукратных разведений суточной бактериальной культуры. При расчётах количества молекул ДНК предполагалось, что масса одного нуклеотида составляет 649 г/моль.

Статистическая обработка данных

Для оценки наличия существенных различий между St, полученных на ДНК при различных дозах облучения и на ДНК от независимых выделений, использовали однофакторный дисперсионный анализ, оценку существенности различий между частными осуществляли с помощью критерия НСР на 95% уровне значимости.

При построении калибровочного графика (стандартной кривой) зависимости значения St от концентрации ДНК или разведения культуры бактерий было расчи-

тано уравнение линейной корреляции типа $y=kx+b$, где y – это значение порогового цикла ПЦР-РВ (C_t), x – десятичный логарифм концентрации ДНК ($\lg m$) или двоичный логарифм разведения бактериальной культуры ($\log_2 C$), k – выборочный коэффициент регрессии. На основании выборочного коэффициента регрессии k была рассчитана эффективность праймеров $E=[(10^{-1/k}) - 1] \times 100\%$ и коэффициент детерминации R^2 . Праймеры считаются эффективными при значении коэффициента k от -3 до -3.6, в пределах 90–100%, а R^2 в пределах 0.98-0.99 [28]. Так как амплификация ДНК идёт в геометрической прогрессии 2^n , где n – номер цикла, то при 100% эффективности количество раз, во сколько изменилось количество ДНК между двумя циклами C_{t_2} и C_{t_1} , составляет 2^{dCt} , где $dCt=C_{t_2}-C_{t_1}$.

Долю повреждений в молекуле ДНК (количество повреждённых нуклеотидов относительно размер генома) для каждой лампы определяли по формуле (1) [30]:

$$r = -\frac{\ln(N_1 / N_0)}{l}, \quad (1)$$

где, l – размер амплифицируемого фрагмента (матрицы ДНК для ДНК-полимеразы) (100 пн), N_0 и N_1 – соответственно количество матриц ДНК в контрольном варианте (без облучения) и после облучения. N_0 рассчитывали исходя из данных, что размер генома *Dickeya solani* составляет в среднем 4,8·10⁶ пн [14, 17]. Количество матриц ДНК после облучения N_1 определяли по формуле (2):

$$N = N_0 E^{C - C_0}, \quad (2)$$

где N_0 – количество матрицы ДНК в контрольной пробирке (без облучения), E – эффективность праймеров, C_0 и C – значение порогового цикла амплификации ПЦР-РВ соответственно в контрольном варианте (без облучения) и после облучения.

Все расчёты осуществлялись с использованием Microsoft Office Excel и Statistica 6.0.

Результаты и их обсуждение

Количественный учёт накопления ампликонов в ходе полимеразной цепной реакции в реальном времени осуществляется либо за счёт разрушения зонда полимеразой после его связывания с целевой последовательностью ДНК-матрицы, либо за счёт связывания специфического красителя с ДНК. В нашей работе были использованы две модификации наборов для детекции *D. solani*: с зондом Dick_sola_P типа TaqMan®, меченый красителем ROX™, и прямая детекция ПЦР продукта с помощью красителя EvaGreen®. Для того, чтобы выбрать оптимальную систему флуоресценции, наиболее качественно отражающую возможные повреждения ДНК, нами была поставлена ПЦР-РВ на серии разведений с выделенной ДНК *D. solani*. По результатам ПЦР-РВ, нами была построена калибровочная кривая (рисунок 1) и рассчитано уравнение линейной регрессии и эффективность праймеров E . Как видно на рисунке 1, в системе TaqMan® эффективность праймеров составляет 97,8%, $R^2=0,99$, что близко к идеальному значению (рисунок 1а). В системе EvaGreen® эффективность праймеров превышает 100% (160,8%), что может быть вызвано неспецифическим связыванием EvaGreen® (рисунок 1б). Таким образом, использование системы флуоресценции с ROX-зондом позволяет рассчитывать относительные потери ДНК в ходе облучения с использованием величины C_t [29].

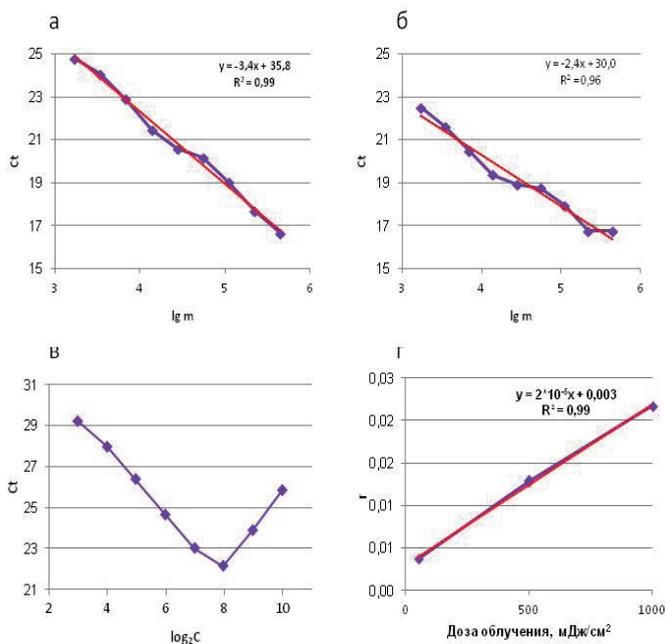


Рис. 1. Калибровочные кривые, построенные в результате ПЦР-РВ, проведённой с использованием серии разведений (по оси абсцисс – десятичный логарифм массы ДНК в пробирке (пкг) $\lg m$ или двоичный логарифм разведения культуры бактерий $\log_2 C$, по оси ординат – значение Ct): а) с ДНК *D. solani* с зондом Dick_sola_P; б) с ДНК *D. solani* с красителем EvaGreen®; в) с суточной культурой бактерий *D. solani* с зондом Dick_sola_P; г) график зависимости количества неповреждённых матриц ДНК Q в зависимости от дозы облучения (мДж/см²)

Полимеразная цепная реакция может идти как при добавлении самой бактерии из культуры клеток, так и с использованием ДНК, выделенной из бактерии. Для выбора наиболее оптимального источника матрицы нами были построены калибровочные кривые по результатам ПЦР-РВ с использованием бактериальной культуры. В результате построен график, линейный характер которого находится в диапазоне разведений $1/128 - 1/4$, на большей концентрации зависимость Ct от концентрации бактерий меняется (рис. 1в). Если учитывать только линейную часть графика, то эффективность праймеров составляет 59,2%. Следовательно, использование в качестве источника ДНК культуры бактерий не позволяет вести количественный учёт повреждений молекулы ДНК.

Таким образом, для учёта количества доступной для ДНК-полимеразы ДНК после облучения нами была применена система с зондом Dick_sola_P с использованием выделенной из ДНК бактерии.

Облучение бактериальной культуры ксеноновой импульсной лампой проводили на следующих дозах: контроль (без облучения), 50 мДж/см² (1 мин. 8 с.), 500 мДж/см² (11 мин. 16 с.) и 1000 мДж/см² (22 мин. 31 с.). Для ПЦР-РВ использовалась ДНК, полученная в результате трёх независимых выделений (ДНК-1, ДНК-2 и ДНК-3). Результаты

эксперимента представлены в таблице 1. В варианте ДНК-1 нет существенных различий между вариантами без облучения и 50 мДж/см², в вариантах ДНК-2 и ДНК-3 различия существенны между всеми дозами. При этом во всех вариантах наблюдается общая тенденция к увеличению значения Ct по мере увеличения дозы облучения, то есть при повышении дозы облучения уменьшается количество доступной для ДНК-полимеразы ДНК вследствие возникновения ошибок в виде фотопродуктов. Данные ошибки включают в себя одноцепочечные и двуцепочечные разрывы ДНК, фотодимеры тимина, а также различные мутации ДНК, вызываемые свободными радикалами. Существенных различий между выделениями не выявлено (данные не представлены), что говорит о воспроизводимости метода с выделением ДНК из облучённой культуры бактерий.

Таблица 1

Результаты ПЦР-РВ (Ct) на ДНК, полученной в серии трёх независимых выделений из бактериальной культуры *D. solani*, подверженной различным дозам облучения импульсной ксеноновой лампы*

Доза облучения	ДНК1	ДНК2	ДНК3
контроль (без облучения)	14,2a	13,5a	13,7a
50 мДж/см ²	14,4a	14,2b	14,4b
500 мДж/см ²	15,5b	15,4c	16,0c
1000 мДж/см ²	17,0c	16,6d	17,1d
F _{факт}	962,9	445,4	102,80
НСР ₀₅	0,2	0,3	0,6

* Разными буквами обозначены значения, существенно отличающиеся друг от друга на 95% уровне значимости ($F_{05}=6,59$).

На основании данных, полученных в результате построения калибровочной кривой, мы принимаем, что за один цикл ПЦР-РВ с праймерами Dick_sola_F, Dick_sola_R и зондом Dick_sola_P(ROX) из одной молекулы ДНК (ПЦР-матрицы) образуется две молекулы ДНК. Следовательно, мы можем определить, во сколько раз уменьшилось количество доступной для ДНК-полимеразы ДНК после облучения по сравнению с контролем: при дозе 50 – в 1,5 раза, при дозе 500 – в 3,6 раза, при дозе 1000 – в 8,8 раз (в среднем по трём вариантам ДНК-1, ДНК-2 и ДНК-3).

Нами была рассчитана доля повреждений в геноме по формуле (1) и полученные значения отложены на графике (рис. 1г). Зависимость доли повреждений от дозы облучения носит линейный характер ($R^2=0,99$), что согласуется с данными других авторов по индуцированным повреждениям ДНК [29]. Исходя из данных о размере генома [14,17] нами рассчитано, что для повреждения каждых 100 пн ДНК необходима доза излучения в УФ-С ~1 мДж/см².

Разные повреждения ДНК бактерии могут приводить к разным последствиям. Так, если не затрагиваются гены ферментов репарации, то бактерия способна восстанавливать повреждения с помощью фотореактивации, темновой репарации и SOS-репарации. В том случае, если затронуты эти гены или количество поврежде-

ний превышает критическое количество, когда ферментативная машина не в состоянии с ними справиться, бактерия гибнет. При внесении не менее 100 фото-мутаций в геном, с высокой долей вероятности бактерия погибнет.

В перспективе разработанный нами подход может быть использован на других микроорганизмах для сравнения различных бактерицидных эффектов оказывающих мутационное воздействие на ДНК.

Выводы

Набор для ПЦР-РВ с зондом ROX, разработанный для детекции фитопатогенной бактерии *D. solani*, может быть использован для количественной оценки фотоповреждения её геномной ДНК.

Оценку фотоповреждений бактериальной ДНК *D. solani* методом ПЦР-РВ следует проводить с использованием выделенной из облучённой бактерии ДНК и зонда Dick_sola_P типа TaqMan®, меченого красителем ROX.

Для получения не менее 100 фотоповреждений в ДНК одного генома *D. solani* при облучении импульсной ксеноновой лампой необходима доза УФ-С излучения ~1 мДж/см².

Библиографический список

1. Ерохова М.Д., Дренова Н.В. Черная ножка – опасное заболевание картофеля // Защита и карантин растений, 2014. № 7. С. 28–30.
2. Игнатов А.Н., Карлов А.Н., Джалилов Ф.С., Карандашов А.Е., Князькина М.С., Корнев К.П., Пехтерева Э.Ш. Распространение в России черной ножки картофеля, вызываемой бактериями р. *Dickeya* // Защита и карантин растений, 2015. № 5. С. 6–9.
3. Камруков А.С., Козлов Н.П., Шапковский С.Г., Яловик М.С. Новые биоцидные ультрафиолетовые технологии и аппараты для санитарии, микробиологии и медицины // Безопасность жизнедеятельности, 2003. № 1. С. 32–40.
4. Камруков А.С., Кулебякина А.И. Инженерные методы расчета импульсных ксеноновых ламп: Учеб. пособие / Под ред. Н.П.Козлова; кафедра «Плазменные энергетические установки» (Э-8). – М.: ООО НИЦ «Инженер» (Союз НИО), 2010. – С. 3–5.
5. Карлов А.Н., Зотов В.С., Пехтерева Э.Ш., Матвеева Е.В., Джалилов Ф.С., Фесенко И.А., Карлов Г.И., Игнатов А.Н. *Dickeya dianthicola* – новый для России бактериальный патоген картофеля // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии, 2010. №3. С. 134–141.
6. Панычева Ю.С. Разработка наборов реагентов для выявления и идентификации возбудителей черной ножки картофеля // «Отечественное картофелеводство – научное обеспечение селекции и семеноводства». Материалы конференции 10–11 октября 2016 г. Москва, ФАНО России, ФГБНУ ВНИИСБ. 2016 г.
7. Яремко А.Б., Мазурин Е.С. Новые биоцидные ультрафиолетовые технологии для обеззараживания клубней картофеля от бактериальных возбудителей на примере возбудителя черной ножки *Dickeya solani* // XVI Молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» ФГБНУ ВНИИСБ. М., 2016. С. 21–22.
8. Axelrod J. D., Majors J. An improved method for photofootprinting yeast genes in vivo using Taq polymerase // Nucleic Acids Res., 1989. 17(1). P. 171–183.
9. Bohrerova Z., Shemer H., Lantis R., Impellitteri C.A., Linden K.G. Comparative disinfection efficiency of pulsed and continuous-wave UV irradiation technologies // Water Research, 2008. 42. P. 2975–2982.

10. *Epshtein V., Kamarthapu V., McGary K., Svetlov V., Ueberheide B., Proshkin S., Mironov A., Nudler E.* UvrD facilitates DNA repair by pulling RNA polymerase backwards // *Nature*, 2014. 505. P. 372–377.
11. *Garlant L., Koskinen P., Rouhiainen L., Laine P., Paulin L., Auvinen P., Holm L., Pirhonen M.* Genome Sequence of *Dickeya solani*, a New soft Rot Pathogen of Potato, Suggests its Emergence May Be Related to a Novel Combination of Non-Ribosomal Peptide/Polyketide Synthetase Clusters // *Diversity*, 2013. 5. P. 824–842.
12. *Govan H.L., Valles-Ayoub Y., Braun J.* Fine-mapping of DNA damage and repair in specific genomic segments // *Nucleic Acids Res.*, 1990. 18(13): 3823–3830.
13. *Ignat A., Manzocco L., M.Maifreni., Bartolomeoli I., Nicoli M.C.* Surface decontamination of fresh-cut apple by pulsed light: Effects on structure, colour and sensory properties // *Postharvest Biology and Technology*, 2014. 91. P. 122 – 127.
14. *Khayl S., Blin P., Chong T. M., Chan K.-G., Faure D.* Complete genome anatomy of the emerging potato pathogen *Dickeya solani* type strain IPO 2222T // *Standards in Genomic Sciences*, 2016. 11:87
15. *Levy C., Aubert X., Lacour B., Carlin F.* Relevant factors affecting microbial surface decontamination by pulsed light // *International Journal of Food Microbiology*, 2012. 152. P. 168–174.
16. *Poepping C, Beck S.E., Wright H., Linden K.G.* Evaluation of DNA damage reversal during medium-pressure UV disinfection. // *Water Res.*, 2014 56:181–189.
17. *Pritchard L., Humphris S., Baeyen S., Maes M., Van Vaerenbergh J., Elphinstone J., Saddler G., Toth I.* Draft Genome Sequences of Four *Dickeya dianthicola* and Four *Dickeya solani* Strains // *Genome Announcements*, 2013. 1(4):e00087-12
18. *Rudi K., Hagen I., Johnsrud B.C., Skjefstad G., Tryland I.* Different length (DL) qPCR for quantification of cell killing by UV-induced DNA damage // *Int J Environ Res Public Health*, 2010. 7(9). P. 3376–3381.
19. *Sinha R. P., Häder D.-P.* UV-induced DNA damage and repair: a review // *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002. 1. P. 225–236.
20. *Toth I. K., van der Wolf J. M., Saddler G., Lojkowska E., Helias V., Pirhonen M., Tsrör (Lahkim) L., Elphinstone J. G.* *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe // *Plant Pathology*, 2011. 60. P. 385–399.
21. *Turtoi, M.* Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* using new non-thermal technologies. A review // *Romanian Biotechnological letters*, 2014. 19. P. 8901–8909.
22. *Turtoi M.* Ultraviolet light treatment of fresh fruits and vegetables surface: A review // *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 2013. 19(3). P. 325–337
23. *Turtoi M., Borda D.* Ultraviolet light efficacy for microbial inactivation on fruit juices, nectars and apple cider // *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 2013. 19(1). P. 130–140.
24. *Turtoi M., Nicolau A.* Intense light pulse treatment as alternative method for mould spores destruction on paper –polyethylene packaging material // *J. Food Eng.*, 2007. 83(1). P. 47–53.
25. *Van der Wolf J.M.I., Nijhuis E.H., Kowalewska M.J., Saddler G.S., Parkinson N., Elphinstone J.G., Pritchard L., Toth I.K., Lojkowska E., Potrykus M., Waleron M., de Vos P., Cleenwerck I., Pirhonen M., Garland L., Hélias V., Pothier J.F., Pflüger V., Duffy B., Tsrör L., Manulis S.* *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*) // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2014. 64(3). P. 768–774.
26. *Vicente M., Ragaert P., Debevere J., Devlieghere F.* Pulsed light for food decontamination: a review // *Trends in food science & technology*, 2007. 18. P. 464–473.
27. *Wang T., MacGregor S.J., Anderson J.G., Woolsey G.A.* Pulsed ultra-violet inactivation spectrum of *Escherichia coli* // *Water Research*, 2005. 39. P. 2921–2925.

28. Yaakov B, Meyer K, Ben-David S, Kashkush K. Copy number variation of transposable elements in *Triticum-Aegilops* genus suggests evolutionary and revolutionary dynamics following allopolyploidization // *Plant Cell Rep.*, 2013 32(10). P. 1615–1624.

29. Yakes F. M., Chen Y., Van Houten B. PCR-Based Assays for the Detection and Quantitation of DNA Damage and Repair // *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations* Editors: Pfeifer, G.P. (Ed.) Springer Science+Business Media New York 1996, P. 171–184.

APPROBATION OF A SET OF REAGENTS TO DETECT *DICKEYA SOLANI* FOR THE QUANTITATIVE ASSESSMENT OF DNA DAMAGE CAUSED BY THE IMPULSED XENON LAMP

P.Yu. KRUPIN^{1,3}, A.B. YAREMKO¹, Yu.S. PANICHEVA¹, K.A. TUMASHEVICH²,
A.T. ORYNBAEV³, E.S. MAZURIN⁴, M.G. DIVASHUK^{1,3}

(¹ All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural Biotechnology;

² Moscow State Technical University named after N.E. Bauman;

³ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy;

⁴ All-Russian Plant Quarantine Center)

Dickeya solani is one of the pathogens that causes the blackleg of potato, which presents a big threat to plant production farms. The traditional method of surface disinfecting is irradiation with a mercury quartz lamp. The bactericidal effect of the UV lamp is that the UV irradiation causes the formation of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts in DNA that block the DNA polymerase synthesizing the daughter DNA chain on the damaged parent matrix during the replication and the RNA polymerase synthesizing RNA chain on the damaged DNA matrix. One of the promising methods of the disinfection of seed potato is irradiation with a pulsed xenon lamp.

The xenon lamp is characterized by broadband radiation, providing a bactericidal effect against irradiated microorganisms regardless of their absorption spectrum. At the same time, high intensity significantly reduces the time required to achieve a required degree of disinfection. To assess the effect of a bactericidal lamp on the DNA of *D. solani*, the authors have compared different variants of real-time qPCR using the previously developed reagent kit.

To evaluate the effect of a bactericidal lamp on the DNA of *D. solani*, the authors have compared different methods of PCR-RT conducting using the previously developed diagnosticum. It has been found that the most optimal PCR-RT scheme for this purpose involves the TaqMan® variant with the DNA that has been isolated from the bacterial culture after irradiation. The dependence of the amount of damage on the radiation dose is linear ($R^2 = 0.99$). Basing on the data on the genome size, the authors have estimated that a dose of UV-C radiation of $\sim 1 \text{ mJ/cm}^2$ is required to damage every 100 pb of DNA. The paper also discusses the role of reparation in irradiation and the lethal number of mutations for a bacterial cell.

Key words: real-time quantitative polymerase chain reaction, *Dickeya solani*, blackleg of potato, pulsed xenon lamp, disinfection, DNA, TaqMan, EvaGreen, probe.

References

1. Erohova M.D., Drenova N.V. Chernaya nozhka – opasnoe zabolevanie kartofelya [Black leg - a dangerous disease of potatoes] // *Zashhita i karantin rasteniy*, 2014. No. 7. Pp. 28–30.

2. Ignatov A.N., Karlov A.N., Dzhililov F.S., Karandashov A.E., Knyaz'kina M.S., Kornev K.P., Pekhtereva E.Sh. Rasprostranenie v Rossii chernoy nozhki kartofelya, vyzyvaemoy bakteriyami r. Dickeya [Distribution in Russia of a blackleg of potato caused by p. Dickeya bacteria] // Zashhita i karantin rasteniy, 2015. No. 5. Pp. 6–9.
3. Kamrukov A.S., Kozlov N.P., Shashkovskiy S.G., Yalovik M.S. Novyye biotsidnyye ul'trafiioletovyye tekhnologii i apparaty dlya sanitarii, mikrobiologii i meditsiny [New biocidal ultraviolet technologies and devices for sanitation, microbiology and medicine] // Bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti, 2003. No. 1. Pp. 32–40.
4. Kamrukov A.S., Kozlov N.P., Shashkovskiy S.G., Yalovik M.S. Novye biotsidnyye ul'trafiioletovyye tekhnologii i apparaty dlya sanitarii, mikrobiologii i meditsiny [New biocidal ultraviolet technologies and devices for sanitation, microbiology and medicine] // Bezopasnost' zhiznedeyatel'nosti, 2003. No. 1. Pp. 32–40.
5. Karlov A.N., Zotov V.S., Pekhtereva E.S., Matveeva E.V., Dzhililov F.S., Fesenko I.A., Karlov G.I., Ignatov A.N. Dickeya dianthicola - novyy dlya Rossii bakterial'nyy patogen kartofelya [Dickeya dianthicola is a new bacterial pathogen for potato in Russia] // Izvestiya Timiryazevskoy sel'skohozyaystvennoy akademii, 2010. No. 3. Pp. 134–141.
6. Panycheva Yu.S. Razrabotka naborov reagentov dlya vyyavleniya i identifikatsii vzbuditeley chernoy nozhki kartofelya [Development of reagent kits for identification and identification of causative agents of the blackleg of potato] // "Otechestvennoe kartofelevodstvo – nauchnoe obespechenie selektsii i semenovodstva". Materialy konferentsii 10–11 oktyabrya 2016 g. Moskva, FANO Rossii, FGBNU VNIISB. 2016.
7. Yaremko A.B., Mazurin E.S. Novye biotsidnyye ul'trafiioletovyye tekhnologii dlya obezzarazhivaniya klubney kartofelya ot bakterial'nykh vzbuditeley na primere vzbuditeley chernoy nozhki Dickeya solani [New biocidal ultraviolet technologies for disinfecting potato tubers from bacterial pathogens as exemplified by Dickeya solani that causes blackleg] // XVI Molodezhnaya nauchnaya konferentsiya "Biotekhnologiya v rastenievodstve, zhivotnovodstve i veterinarii" FGNBU VNIISB. M., 2016. Pp. 21–22.
8. Axelrod J.D., Majors J. An improved method for photofootprinting yeast genes in vivo using Taq polymerase // Nucleic Acids Res., 1989. 17(1). Pp. 171–183.
9. Bohrerova Z., Shemer H., Lantis R., Impellitteri C.A., Linden K.G. Comparative disinfection efficiency of pulsed and continuous-wave UV irradiation technologies // Water Research, 2008. 42. Pp. 2975–2982.
10. Epshtein V., Kamarthapu V., McGary K., Svetlov V., Ueberheide B., Proshkin S., Mironov A., Nudler E. UvrD facilitates DNA repair by pulling RNA polymerase backwards // Nature, 2014. 505. Pp. 372–377.
11. Garland L., Koskinen P., Rouhiainen L., Laine P., Paulin L., Auvinen P., Holm L., Pirhonen M. Genome Sequence of Dickeya solani, a New soft Rot Pathogen of Potato, Suggests its Emergence May Be Related to a Novel Combination of Non-Ribosomal Peptide/Polyketide Synthetase Clusters // Diversity, 2013. 5. Pp. 824–842.
12. Govan H.L., Valles-Ayoub Y., Braun J. Fine-mapping of DNA damage and repair in specific genomic segments // Nucleic Acids Res., 1990. 18(13): 3823–3830.
13. Ignat A., Manzocco L., M.Maifreni., Bartolomeoli I., Nicoli M.C. Surface decontamination of fresh-cut apple by pulsed light: Effects on structure, colour and sensory properties // Postharvest Biology and Technology, 2014. 91. Pp. 122–127.
14. Khayi S., Blin P., Chong T. M., Chan K.-G., Faure D. Complete genome anatomy of the emerging potato pathogen Dickeya solani type strain IPO 2222T // Standards in Genomic Sciences, 2016. 11:87
15. Levy C., Aubert X., Lacour B., Carlin F. Relevant factors affecting microbial surface decontamination by pulsed light // International Journal of Food Microbiology, 2012. 152. Pp. 168–174.

16. *Poepping C, Beck S.E., Wright H., Linden K.G.* Evaluation of DNA damage reversal during medium-pressure UV disinfection. // *Water Res.*, 2014 56:181-9.
17. *Pritchard L., Humphris S., Baeyen S., Maes M., Van Vaerenbergh J., Elphinstone J., Saddler G., Toth I.* Draft Genome Sequences of Four *Dickeya dianthicola* and Four *Dickeya solani* Strains // *Genome Announcements*, 2013. 1(4):e00087-12
18. *Rudi K., Hagen I., Johnsrud B.C., Skjefstad G., Tryland I.* Different length (DL) qPCR for quantification of cell killing by UV-induced DNA damage // *Int J Environ Res Public Health*, 2010. 7(9). Pp. 3376–33 81.
19. *Sinha R.P., Häder D.-P.* UV-induced DNA damage and repair: a review // *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2002. 1. Pp. 225–236.
20. *Toth I.K., van der Wolf J.M., Saddler G., Lojkowska E., Helias V., Pirhonen M., Tsrör (Lahkim) L., Elphinstone J.G.* *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe // *Plant Pathology*, 2011. 60. Pp. 385–399.
21. *Turtoi M.* Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* using new non-thermal technologies. A review // *Romanian Biotechnological letters*, 2014. 19. Pp. 8901–8909.
22. *Turtoi M.* Ultraviolet light treatment of fresh fruits and vegetables surface: A review // *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 2013. 19(3). Pp. 325–337
23. *Turtoi M., Borda D.* Ultraviolet light efficacy for microbial inactivation on fruit juices, nectars and apple cider // *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 2013. 19(1). P. 130–140.
24. *Turtoi M., Nicolau A.* Intense light pulse treatment as alternative method for mould spores destruction on paper –polyethylene packaging material // *J. Food Eng.*, 2007. 83(1). Pp. 4–53.
25. *Van der Wolf J.M.I., Nijhuis E.H., Kowalewska M.J., Saddler G.S., Parkinson N., Elphinstone J.G., Pritchard L., Toth I.K., Lojkowska E., Potrykus M., Waleron M., de Vos P., Cleenwerck I., Pirhonen M., Garlant L., Hélias V., Pothier J.F., Pflüger V., Duffy B., Tsrör L., Manulis S.* *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*) // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2014. 64(3). Pp. 768–774.
26. *Vicente M., Ragaert P., Debevere J., Devlieghere F.* Pulsed light for food decontamination: a review // *Trends in food science & technology*, 2007. 18. Pp. 464–473.
27. *Wang T., MacGregor S.J., Anderson J.G., Woolsey G.A.* Pulsed ultra-violet inactivation spectrum of *Escherichia coli* // *Water Research*, 2005. 39. Pp. 2921–2925.
28. *Yaakov B., Meyer K., Ben-David S., Kashkush K.* Copy number variation of transposable elements in *Triticum-Aegilops* genus suggests evolutionary and revolutionary dynamics following allopolyploidization // *Plant Cell Rep.*, 2013 32(10). Pp.1615–16 24.
29. *Yakes F.M., Chen Y., Van Houten B.* PCR-Based Assays for the Detection and Quantitation of DNA Damage and Repair // *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations* Editors: Pfeifer, G.P. (Ed.) Springer Science+Business Media New York 1996, pp. 171–184.

Крупин Павел Юрьевич – к. б. н., ст. науч. сотр. лаборатории диагностики патогенов растений ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: pavel-krupin@yandex.ru); ст. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 977-70-01; e-mail: pavel-krupin@yandex.ru).

Яремко Анастасия Богдановна – асп. ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (140150, Московская область, Раменский район, п. Быково, ул. Пограничная, д. 32; тел.: (499) 707-22-27; e-mail: n-a-s-t-e-n-a94@inbox.ru).

Панычева Юлия Сергеевна – асп. лаборатории диагностики патогенов растений ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: yulya_panycheva@mail.ru).

Тумашевич Константин Александрович – асп. кафедры «Плазменные энергетические установки» факультета «Энергомашиностроение» МГТУ им. Н.Э. Баумана (105005, Москва, Лefортовская наб., д. 1; тел.: 8 (499) 263-65-16; e-mail: al-vaisari@yandex.ru).

Орынбаев Аспен Турсынгалиевич – асп. кафедры защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: aspen_kz@mail.ru).

Мазурин Евгений Сергеевич – к. б. н., зам. директора ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (140150, Московская область, Раменский район, п. Быково, ул. Пограничная, д. 32; тел. (499) 707-22-27; e-mail: zarauh@mail.ru).

Дивашук Михаил Георгиевич – к. б. н., зав. лабораторией диагностики патогенов растений ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42; e-mail: divashuk@gmail.com); ст. науч. сотр. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 977-70-01; e-mail: divashuk@gmail.com).

Pavel Yu. Kroupin – PhD (Bio), senior research associate, Laboratory for Diagnosis of Plant Pathogens, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42; e-mail: pavel-krupin@yandex.ru), senior research associate, Center for Molecular Biotechnology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49; phone: +7 (499) 977-70-01 e-mail: pavel-krupin@yandex.ru).

Anastasiya B. Yaremko – postgraduate student, All-Russian Plant Quarantine Center, Pogranichnaya Str., 32, Bykovo, Ramenskoe, Moscow region, 140150, Russia; phone: +7 (499) 707-22-27; e-mail: n-a-s-t-e-n-a94@inbox.ru).

Yuliya S. Panycheva – postgraduate student, Laboratory for Diagnosis of Plant Pathogens, All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42; e-mail: yulya_panycheva@mail.ru).

Konstantin A. Tumashevich – postgraduate student, the Plasma Power Plants” Department, the Power Engineering Faculty, Bauman Moscow State Technical University (Lefortovskaya Emb., 1, Moscow, 105005; phone: 8 (499) 263-65-16; e-mail: al-vaisari@yandex.ru).

Aspen T. Orynbaev – postgraduate student, the Department of Plant Protection, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49; phone: +7 (499) 977-70-01 e-mail: aspen_kz@mail.ru).

Evgeniy S. Mazurin – Deputy Director of All-Russian Plant Quarantine Center, Pogranichnaya Str., 32, Bykovo, Ramenskoe, Moscow region, 140150, Russia; phone: +7 (499) 707-22-27; e-mail: zarauh@mail.ru).

Mikhail G. Divashuk – PhD (Bio), Head of Laboratory for Diagnosis of Plant Pathogens; All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 42; e-mail: divashuk@gmail.com); senior research associate, Center for Molecular Biotechnology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49; +7 (499) 977-70-01; e-mail: divashuk@gmail.com).