

ПУНИНА
НАТАЛИЯ ВЛАДИМИРОВНА

**Оценка генетического разнообразия
фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas*
и разработка молекулярных маркеров для их диагностики**

03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Центре “Биоинженерия”
РАН

Научный руководитель доктор биологических наук
Игнатов Александр Николаевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Пирузян Элеонора Суреновна

кандидат биологических наук
Турова Татьяна Павловна

Ведущая организация РГАУ Московская сельскохозяйственная академия
(МСХА) имени К.А. Тимирязева

Защита состоится 24 ноября 2009 года в 15 ч 30 мин. на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан ____ октября 2009 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.

Пискункова Н.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. По данным FAO доля бактериальных болезней в среднегодовых потерях урожая сельскохозяйственных растений составляет около 25% (FAO, 2005). Бактерии рода *Xanthomonas* поражают более 400 видов растений (Leyns et al, 1984), включая основные продовольственные и технические культурные растения. Род *Xanthomonas* включает более 27 видов (Vauterin et al, 1997), обладающих сходными физиологическими и генетическими признаками. В связи с отсутствием эффективных мер борьбы с бактериозами и недостатком устойчивых сортов растений, ранняя диагностика бактериального заражения семян и посадочного материала является ключевым способом снижения вредоносности заболеваний. В большинстве случаев бактерии рода *Xanthomonas* специализируются на определенном роде или семействе растений, однако некоторые растения поражаются сразу несколькими видами патогена, а некоторые виды бактерии заражают растения различных семейств и классов.

В последние годы наблюдается усиление вредоносности бактериозов, что является результатом нескольких факторов: 1) появления новых штаммов фитопатогенных бактерий, которые поражают более широкий круг сельскохозяйственных культур; 2) глобального изменения климата; 3) распространения патогенов из-за расширяющихся международной торговли и туризма; 4) внедрения индустриальной технологии растениеводства (Ежегодник ГЭП, 2006). В связи с этим проблема идентификации патогена становится все более актуальной при диагностике зараженности материала.

Недостатком официально рекомендованных методов диагностики является тестирование штаммов на одном таксономическом уровне, и только для ожидаемой группы фитопатогенных бактерий. Кроме этого, диагностика фитопатогенов затруднена присутствием на растении эпифитных бактерий родственных видов (Vauterin et al, 1997). Применение интегрального анализа, куда входят фенотипические и молекулярные методы для всех таксономических уровней, позволит диагностировать штаммы не только ожидаемых групп бактерий, но и новых, потенциально вирулентных групп.

Цель и задачи исследования. Целью работы явилась оценка разнообразия последовательностей ключевых генов и межгенных регионов ДНК у наиболее вредоносных в России видов бактерий рода *Xanthomonas* для последующей разработки диагностических молекулярных маркеров.

Задачи исследования состояли в следующем:

- 1) Проанализировать коллекцию штаммов *X. campestris*, *X. vesicatoria* и других видов бактерий рода *Xanthomonas* и выбрать штаммы представительные для наиболее распространенных в Российской Федерации фенотипических/генотипических групп *Xanthomonas*.
- 2) Изучить фенотипическое разнообразие выбранных штаммов.
- 3) Определить последовательности таксономически важных генов (*16S* рРНК, *gyrB*, *cyt-P450* сем. CYP133B3/B4, *Xcc0006*, *Xcc0007*, *avrXccC*), межгенных регионов (*16S-23S* рРНК ITS и *Xcc0006-0007*). Изучить

генетически индуцированную делецию гена авирулентности *avrXccC*, приводящую к изменению специализации патогена.

4) Разработать праймеры и протоколы ПЦР-диагностики фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas* на уровне рода, вида и патоварианта.

Научная новизна работы. При выполнении настоящей работы впервые проведено комплексное исследование разнообразия последовательностей генов *gyrB*, *cyt-P450* сем. СУР133В3/В4 и региона *Xcc0006-0007* для представительного набора российских и коллекционных штаммов *X. campestris* pv. *campestris* и родственных видов бактерий. Выявлены устойчивые меж- и внутривидовые различия последовательностей генов *16S* рРНК, *gyrB*, *cyt-P450* сем. СУР133В3/В4, межгенного региона *16S-23S* рРНК ITS и региона *Xcc0006-0007* для *Xanthomonas* spp..

Впервые обнаружены бактерии вида *X. arboricola*, поражающие крестоцветные, злаковые и сложноцветные растения, полифаговость (многохозяинность) которых связана с уникальным физиологическим свойством – утилизацией хинной кислоты. Впервые в России обнаружены штаммы *X. campestris* pv. *raphani*, поражающие пасленовые растения и относящиеся к расе 3 этого патогена. Для диагностики этого патогена предложены специфические праймеры на основе характерных нуклеотидных последовательностей региона *Xcc0006-0007*.

Установлены нуклеотидные замены в ДНК последовательностях генов *gyrB*, *cyt-P450* сем. СУР133В3/В4 и *16S-23S* рРНК ITS и региона *Xcc0006-0007*, характерные для различных видов и внутривидовых групп бактерий рода *Xanthomonas*, пригодные для создания диагностических маркеров.

Созданы и апробированы маркеры для диагностики *Xanthomonas* spp. на различных таксономических уровнях: рода, вида, патоварианта и рас *X. campestris* pv. *campestris* и маркеры для успешной диагностики вида *X. arboricola*. На основании исследования полиморфизма ДНК последовательностей изученных регионов предложены праймеры и пробы для диагностики видов и патовариантов *Xanthomonas*.

Доказана связь изменения расы патогена *X. campestris* pv. *campestris* с делецией гена *avrXccC*, индуцированной заражением растения с геномом АВС (т.н. “*Brassica composita*”) и геном устойчивости *Rxcc1*.

Практическая значимость работы. Полученные результаты могут использоваться для оценки генетического разнообразия фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas*; диагностики, детекции и идентификации бактерий данного рода; разработки рекомендаций для молекулярной диагностики бактерий.

Апробация работы. Материалы были представлены на российских и международных конференциях: “Bioinformatics of Genome regulation and structure”-ВGRS (Новосибирск, 2006); “2-ой Международной конференции по болезням томатов” (Турция, 2007); “Международной конференции молодых ученых” (Киев, 2007); “Вычислительная филогенетика и геносистематика” (Москва, МГУ, 2007); VIII молодежная научная конференции “Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии” (Москва,

2008), а также “Школе молодых ученых и аспирантов по молекулярной биологии-NOVA” (Финляндия, 2008).

Публикации. Основные материалы, обсуждаемые в диссертации, опубликованы в ___ статьях (в т.ч. 1 статья в журнале списка ВАК) и ___ материалах конференций.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертации изложены на ___ страницах машинописного текста и включают ___ рисунков и ___ таблиц. Диссертация состоит из разделов: “Введение”, “Обзор литературы”, “Экспериментальная часть” (включает главы “Материалы и методы исследования”, “Результаты и обсуждения”), “Выводы” и “Список литературы”, который содержит ___ отечественных и ___ иностранных наименования.

Место проведения работы. Физиологическая и биохимическая характеристика штаммов бактерий проводилась в Лаборатории бактериальных болезней ВНИИ фитопатологии РАСХН. Определение нуклеотидных последовательностей генов *16S* рРНК, *gyrB*, *cyt-P450* сем. СУР133В3/В4, *avrXccC*, межгенного региона *16S-23S* рРНК ITS и региона *Xcc0006-0007* было выполнено в Учреждении Российской Академии Наук Центре «Биоинженерия» РАН. Автор выражает глубокую благодарность Колгановой Т.В., Булыгиной Е.В., Кузнецову Б.Б., Матвеевой Е.В., Корневу К.П. и другим сотрудникам Центра «Биоинженерия» и ВНИИ фитопатологии РАСХН за помощь в выполнении работы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследований. В работе была использована коллекция бактерий рода *Xanthomonas* (113 штаммов), предоставленная лабораторией бактериальных болезней ГНУ-ВНИИ фитопатологии РАСХН. Коллекция включала:

1. типовые штаммы видов *X. campestris*, *X. gardneri*, *X. oryzae*, *X. fuscans*, *X. malvacearum* и *X. vesicatoria*, собранные в разных странах мира;
2. штаммы, определенные позднее как *X. arboricola*, выделенные в России из пораженных растений капусты, подсолнечника и зерновых;
3. штаммы *X. campestris* pv. *raphani*, выделенные в России из пораженных растений томатов.
4. Все бактерии были проверены на принадлежность к роду *Xanthomonas* с помощью оценки вирулентности на соответствующих растениях-хозяевах, диагностических биохимических тестов, ПЦР со специфичными праймерами или анализа нуклеотидной последовательности фрагмента гена *16S* рРНК.

Проверка вирулентности. Растения выращивались в 15-см вазонах до стадии 3-5 настоящего листа и инокулировались методами опрыскивания и прищипывания края листа. Симптомы учитывались через 21 день после заражения. Все использованные в работе штаммы вызвали системное или локальное поражение соответствующих растений в тепличных условиях.

Биохимические тесты. Определение биохимических свойств проводили согласно методам, описанным в «Лабораторном руководстве по

идентификации фитопатогенных бактерий», раздел “*Xanthomonads*” (Schaad et al, 2000), а также с помощью системы BIOLOG («Biolog» Inc., USA), согласно рекомендованной производителем методике.

Выделение ДНК. Для выделения препаратов суммарной клеточной ДНК бактерии культивировали на агаризованной среде Кинга Б при 28°С в течение 72 ч.. ДНК была выделена с помощью модифицированной методики щелочного выделения ДНК Бирнбойма-Доли (Birnboim and Doly, 1979) и набора для Wizard-технологии фирмы («Promega», США).

Очистка ПЦР-фрагментов. Продукты ПЦР очищали от посторонних примесей при помощи электрофореза в 0.8% легкоплавкой агарозе с применением набора реактивов “Wizard PCRPreps” («Promega», США).

Клонирование ПЦР-фрагментов. Выделенный ПЦР-фрагмент гена *avrXccC* клонировали в компетентных клетках *Escherichia coli* DH10β с использованием наборов реактивов “pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems” («Promega», США). Выделение и очистку плазмидной ДНК проводили с помощью набора “Wizard MiniPrep” («Promega», США).

Выбор молекулярных маркеров и ПЦР. Молекулярно-диагностические маркеры (МДМ), были выбраны на основании анализа имеющихся в ГенБанке полностью секвенированных геномов *Xanthomonas* spp. и близкородственных бактерий. Фрагменты генов *16S* рРНК, *gyrB*, *cyt-P450* сем. СУР133В3/В4, межгенного региона *16S-23S* рРНК ITS и региона *Xcc0006-0007* были амплифицированы с использованием разработанных нами специфических праймерных систем.

Секвенирование. Прямое секвенирование (Sanger et al, 1977) нуклеотидных последовательностей генов *16S* рРНК, *gyrB*, *cyt-P450* сем. СУР133В3/В4, межгенного региона *16S-23S* рРНК ITS и региона *Xcc0006-0007* проводили с использованием специфических прямых и обратных праймеров. Фрагмент гена *avrXccC* клонировали в клетках *Escherichia coli* и затем секвенировали с применением универсального плазмидного праймера SP6 и набора реактивов BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США). Нуклеотидные последовательности определяли на автоматическом секвенаторе DNA Analyzer 3730 («Applied Biosystems», США).

Биоинформационный анализ данных. Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями базы данных ГенБанка проводили с помощью программы NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) при вероятности случайного совпадения не более 10^{-50} . Процедуры выравнивания нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы CLUSTALW v.1.75 (Thompson et al, 1997). Проверку и редактирование последовательностей вручную проводили с помощью редактора BioEdit v.7.0.5.3 (Hall, 1999). Подбор праймеров и проб осуществлялся с помощью программ Oligo v.6.01 и AlleleID v.6.0 («Premier Biosoft International», USA).

Попарные генетические расстояния между последовательностями были определены по 2-параметрной модели Кимуры (Kimura, 1980). Построение филогенетических деревьев проводили с использованием различных

методов: метода ближайшего связывания («neighbor-joining») (Saitou & Nei, 1987); невзвешенного парно-группового метода с арифметическим усреднением (UPGMA) (Sokal, Sneath, 1963); и метода минимально эволюции (ME) (Saitou and Nei, 1987), реализованных в пакете программ MEGA 4.0 (Nei and Kumar, 2000). Статистическая достоверность полученных деревьев оценивалась с помощью «бутстреп» («bootstrap»)-анализа путем построения 1000 альтернативных деревьев и дана в процентах от исходного значения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЯ

Оценка фенотипического (физиологического) разнообразия исследуемой коллекции бактерий рода *Xanthomonas*.

Бактерии рода *Xanthomonas* имеют сходные фенотипические признаки, отличаясь лишь немногим по утилизации некоторых источников азота и углерода и другим физиологическим признакам. По результатам анализа 295 морфологических, биохимических и физиологических признаков бактерии рода *Xanthomonas* были разделены на 9 фенонов (Рис.1) (Mooter, Swings, 1990). Только штаммы видов *X. fragariae*, *X. albilineans*, *X. populi*, *X. translucens* (*X. campestris* pv. *graminis*) и *X. oryzae* имели видоспецифичные фенотипические признаки. Для фенона 9 (*X. campestris* до реклассификации Vauterin, 1995) у штаммов, принадлежащих различным патовариантам (геномовидам) фенотипические признаки существенно не различались и были обнаружены сходные фенотипические характеристики. В то же время патоварианты (геномовиды) *X. (campestris* pv.) *citri* и *X. (campestris* pv.) *vesicatoria* включали штаммы с контрастными фенотипическими свойствами.

В данной работе был проведен анализ 44 штаммов *X. campestris*, выделенных из культурных и дикорастущих растений сем. Капустные, по 95 физиологическим признакам с помощью системы BIOLOG («Biolog» Inc., USA), всего 34 из них были вариабельны. При сравнении патогенных бактерий вида *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* и *Xanthomonas* spp., достоверные различия были найдены только по использованию тиранозы, лимонной кислоты, метил-сукцината, малониновой кислоты, аланин-глицина и пролина штаммами рода *Xanthomonas*.

Штаммы *X. campestris* обладали различной физиологической активностью и утилизировали от 40% до 81% диагностических источников углерода и азота. В целом, степень физиологической активности соответствовала кластеризации штаммов, представленной на Рис. 2. Группа с активностью ниже средней включала типовой штамм *X. campestris* NCPPB528^T и ряд типичных для патоварианта *X. campestris* pv. *campestris* штаммов, в основном, зарубежного происхождения. 4 штамма из России и США, обладающие также низкой физиологической активностью, вошли в кластер 2, соответствовавший группе *XccA* (вызывает, как правило, бактериальный ожог) (Mguni, 1996; Massomo et al., 2003). Третий кластер был образован штаммами *X. campestris* pv. *raphani* и *X. campestris* pv. *campestris* из России, Бразилии, Канады, Танзании, Германии и Японии. Некоторые из них вызывали как сосудистый бактериоз, так и листовую пятнистость растений или поражали альтернативных растений-хозяев (штаммы *X. campestris* pv. *raphani* 5001-5003 из томата). Штаммы со средней активностью, вошедшие в кластер 4, были выделены на территории России и по профилю реакции сходны с т.н. *X. campestris* pv. *abberance*. Пятый кластер был сформирован наиболее активными штаммами и включал штаммы *X. campestris* pv. *armoraciae* и ряд культур *X. campestris* pv. *campestris* из России и Германии. Разнообразие биохимических свойств штаммов вида *X. campestris*, а также встречаемость сходной реакции у штаммов других видов *Xanthomonas*, не

позволяет использовать их для целей диагностики, но служит важным инструментом для оценки разнообразия популяции патогена.

В работе были также изучены штаммы *X. arboricola*, выделенные из пораженных растений в России. Данный вид, помимо поражения косточковых культур, вызывает сосудистое поражение растений подсолнечника, капусты и подсолнечника, ячменя. Штаммы отличались от *X. campestris* и других *Xanthomonas* spp. по способности утилизировать хинаты (соли хинной кислоты) по шикиматному метаболическому пути, характерному для растительной клетки, что, вероятно, и позволяло им поражать растения различных семейств. Данное свойство встречается у ряда других патогенных бактерий с широким спектром растений-хозяев.

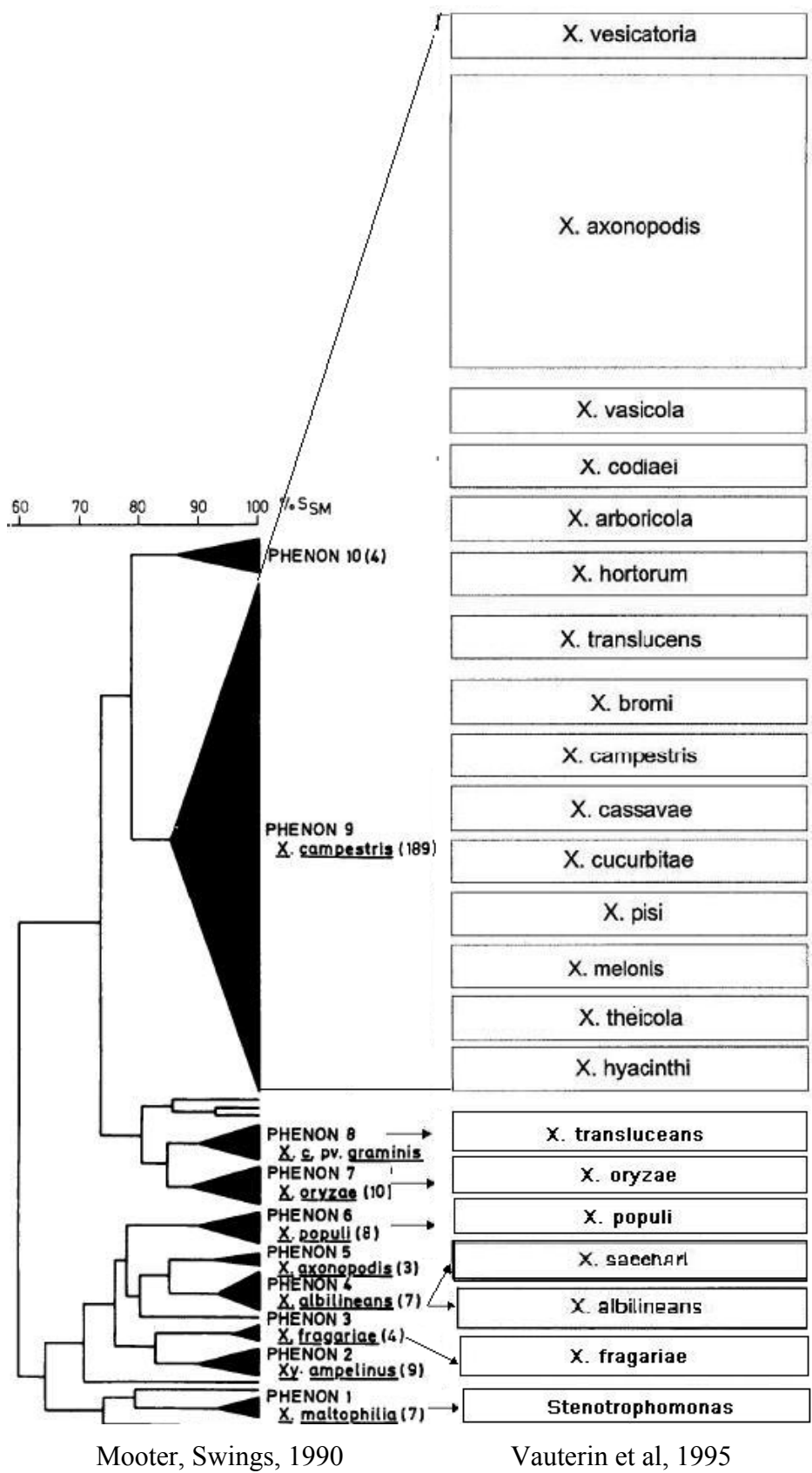


Рис. 1. Схематическое представление реклассификации видов рода *Xanthomonas* (согласно Vauterin et al, 1995).

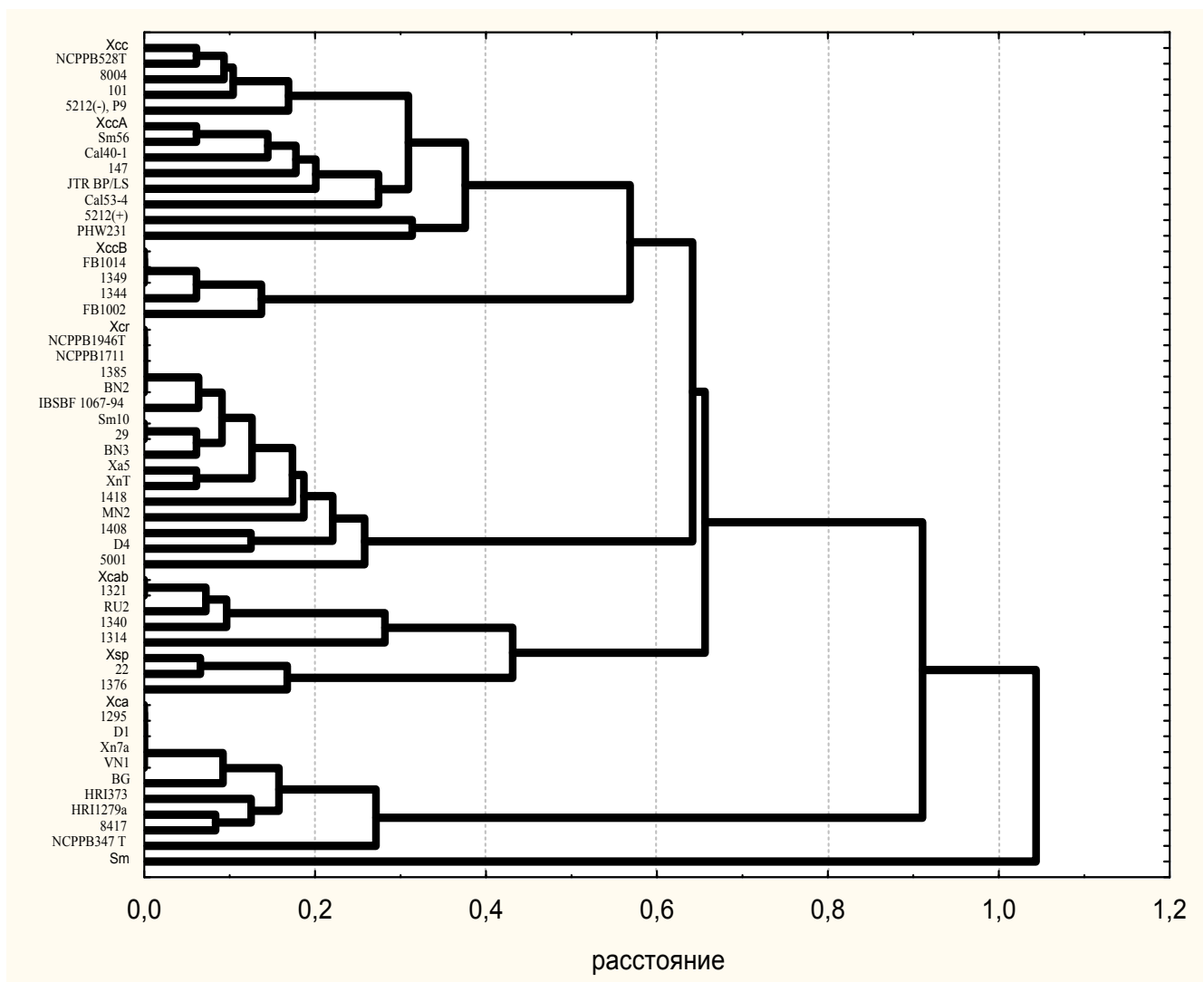


Рис. 2. Кластерный анализ методом Варда (Ward, 1963) 44 штаммов *X. campestris* по результатам утилизации ими 95 (34 переменных) источников углерода и азота.

Выбор нуклеотидных последовательностей для создания молекулярных маркеров. По литературным данным известно, что для патогенности бактериям рода *Xanthomonas* необходимы, примерно, 100 генов, и еще от 400 до 500 генов влияют на уровень ее проявления (Qian et al, 2008). Гены, определяющие патогенность бактерий рода *Xanthomonas*, относятся к следующим функциональным категориям: гены транспортных систем II (*Xps*), III (*hrp*, *avr*, *Xop*) и IV типа (*pilC*, *pilB*), гены систем детоксикации (разрушение ЖК, вторичных метаболитов и дефензинов растения – *cyt*, *FadB*, *KatE*, *Glutathion S-transferase*), гены трансмембранного транспорта (*TonB* и *TonB*-зависимые рецепторы), гены синтеза ЛПС и ЭПС. Специфичность патогенеза определяется, видимо, составом генов-эффекторов, системой детоксикации (*cyt-P450*) и селекцией основных МAMP's (ЛПС, ЭПС, флагеллина, Trigger Factor, факторов элонгации) для ухода от взаимодействия с рецепторами неспецифической иммунной системы растения.

Для проведения работы были выбраны 2 типа молекулярных маркеров: 1) высококоррелирующие с расстоянием между геномами и широко используемые для таксономических исследований; 2) участвующие, по литературным данным, в специализации фитопатогена на растении-хозяине (патогенезе). Для диагностики на уровне рода/вида в качестве молекулярных маркеров первого типа применялись последовательности генов *16S* рРНК, *gyrB* и межгенного региона *16S-23S* рРНК ITS; второго типа – *cyt-P450* сем. СУР133В3/В4. Для диагностики на уровне вида/патоварианта был выбран ген *cyt-P450* сем. СУР133В3/В4 и оперон *Xcc0006-0007* (Игнатов и др., 2004), для расовой диагностики *X. campestris* pv. *campestris* - ген авирулентности *avrXccC* (Castaneda et al, 2005).

Генетическое разнообразие нуклеотидной последовательности гена *16S* рРНК у рода *Xanthomonas*. Были амплифицированы и секвенированы 28 нуклеотидных последовательностей гена у штаммов, представительных для физиологических и географических групп, или требующих подтверждения принадлежности к роду *Xanthomonas*. Длина секвенированной нуклеотидной последовательности составила 1522 п.о.. Полученные фрагменты ДНК были сравнены со 170 последовательностями *16S* рРНК *Xanthomonas* spp., отобранными в базе данных NCBI. По выровненным последовательностям с помощью алгоритма минимальной эволюции (ME) было построено филогенетическое дерево, отражающее эволюцию анализируемого гена (Рис. 3). Топология полученного дерева имела значительное сходство с филогенетической структурой рода, установленной с помощью ДНК-ДНК гибридизации (Vauterin et al, 1995), и филогенией, полученной для типовых штаммов 20 видов *Xanthomonas* spp. на основе анализа фрагмента *16S* рРНК (Hauben et al, 1997) rep-PCR и AFLP (Vauterin et al, 1995; Rademaker et al, 2000) анализа. Штаммы образовывали 2 отдельных достоверно различимых кластера (бутстреп 92%): группу «*Xanthomonas I*» и «*Xanthomonas II*». Группа «*Xanthomonas I*» включала виды *X. campestris*, *X. cucubitae*, *X. oryzae*, *X. bromi*, *X. vesicatoria*, *X. axonopodis*. Группа «*Xanthomonas II*» включала виды *X. codiaei*, *X. sacchari*, *X. albilineans*, *X. theicola*, *X. hyacinthi* и *X. translucens* с достоверным значением бутстрепа (72%). Для 26 штаммов *Xanthomonas* spp., использованных в нашей работе, *X. vesicatoria* LMG 911^T и типового штамма *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB 528^T нуклеотидные последовательности гена *16S* рРНК были идентичны. Для нуклеотидных последовательностей таких видов как *X. oryzae* pv. *oryzae* LMG 5047^T и *X. axonopodis* LMG 538^T были найдены соответственно 2 и 10 нуклеотидных замен. Изучаемые нами штаммы *X. arboricola* и *X. campestris* pv. *raphani* принадлежали роду *Xanthomonas*, группе *Xanthomonas I*, подгруппе 1 и имели идентичные с *X. campestris* нуклеотидные последовательности. Таким образом, вследствие высокой консервативности, применение гена *16S* рРНК для оценки и изучения филогении на уровне ниже рода может привести к ошибке. Так, для большинства видов группы I было невозможно выделить специфичные нуклеотидные замены. Таким образом, ген *16S* рРНК может быть использован для диагностики *Xanthomonas* spp. только на уровне рода и

группы (I и II) видов. Достоверные отличия между генами рНК малой рибосомальной субъединицы у видов группы I и II и высокое сходство последней со штаммами рода *Stenotrophomonas* подтверждают недавно сделанное предположение о полифилетичности данного рода в его нынешнем составе (Young et al, 2009).

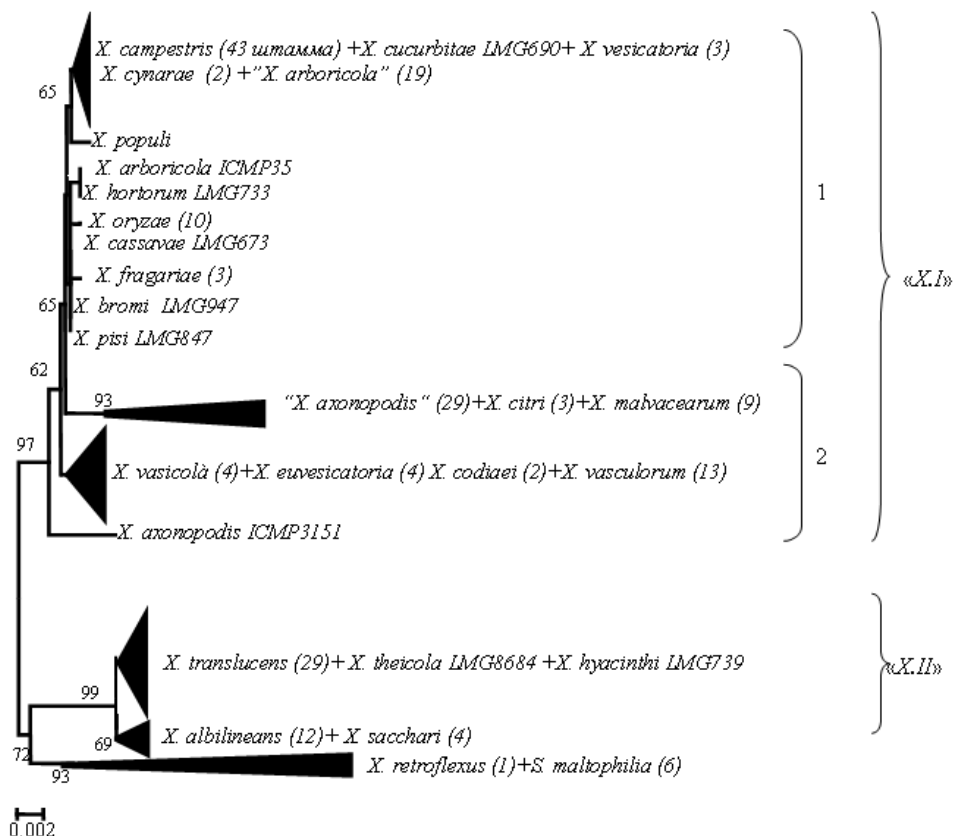


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе данных сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов гена 16S рРНК бактерий рода *Xanthomonas* с использованием алгоритма ME. Масштаб соответствует 0.2 заменам на 100 пар оснований (эволюционным расстояниям). Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления (в %), определенная с помощью «bootstrap»-анализа 1000 альтернативных деревьев. В скобках дано количество штаммов, сгруппированных вместе. Группы «*Xanthomonas* I» и «*Xanthomonas* II» обозначены «X.I» и «X.II», соответственно.

Генетическое разнообразие нуклеотидной последовательности 16S-23S рРНК ITS. Наряду с геном 16S рРНК для таксономических исследований и идентификации бактерий рода *Xanthomonas* на уровне вида (Yamamoto, 1999) также широко применяется нуклеотидная последовательность 16S-23S рРНК внутреннего транскрибируемого межгенного региона (ITS) рибосомального оперона (Goncalves and Rosato, 2002).

Для изучения генетического разнообразия ДНК последовательностей 16S-23S рРНК ITS были взяты штаммы *Xanthomonas* spp., использованные в работе с геном 16S рРНК. С помощью праймеров 11-27F/530R были

амплифицированы и определены нуклеотидные последовательности длиной 500-550 п.о. (100% полной последовательности), которые затем были сравнены со 173 нуклеотидными последовательностями *16S-23S* рРНК ITS *Xanthomonas* spp., отобранными в базе данных NCBI. По всем последовательностям были рассчитаны попарные генетические расстояния (2-параметрическая модель Кимуры) и с помощью метода UPGMA проведена группировка штаммов (Рис. 4). Топология полученного дерева имела значительное сходство с филогенетическими деревьями, полученными для *16S* рРНК и *16S-23S* рРНК ITS типовых штаммов 20 геномовидов (Goncalves and Rosato, 2002). Также как и при анализе гена *16S* рРНК, штаммы рода *Xanthomonas* были достоверно разделены на 2 группы: «*Xanthomonas I*» и «*Xanthomonas II*». Разделение по группам «*Xanthomonas I*» и «*Xanthomonas II*» шло в зависимости от наличия/отсутствия вставки в *16S-23S* рРНК ITS, специфических нуклеотидных замен или делеций/вставок. 3'-конец в районе 469 - 484 нуклеотидов у большинства штаммов различных видов отличался высокой степенью полиморфизма. У группы «*Xanthomonas I*» нуклеотидные последовательности гена тРНК^{Ала} были идентичны на всем протяжении (75-79 п.о.), в то время как группа «*Xanthomonas II*» имела единичные нуклеотидные замены в позициях 10, 69, а также 4 делеции. Последовательности гена тРНК^{Иле} (73-79 п.о.) и межгенных регионов МТР1, МТР2 и МТР3 имели вариабельные нуклеотидные последовательности. Группа «*Xanthomonas II*» имела единичные нуклеотидные замены и делеции в позициях 17, 59, 68-69. Нуклеотидные замены носили случайный характер. Однако сходные замены нуклеотидов встречались одновременно у разных видов *Xanthomonas* spp., что затрудняло оценку генетического разнообразия и идентификацию видов по данной последовательности. Штаммы *X. campestris* на филогенетическом дереве были разделены на 2 отдельные группы: 1 - включала 32 штамма *X. campestris*, а также близкородственные виды *X. vasicola* и *X. arboricola*; и 2 - была представлена 23 штаммами *X. campestris* и видами *X. oryzae*, *X. carotae*, *X. zinniae*. Данное разделение свидетельствует о генетическом разнообразии последовательности *16S-23S* рРНК ITS внутри вида *X. campestris*.

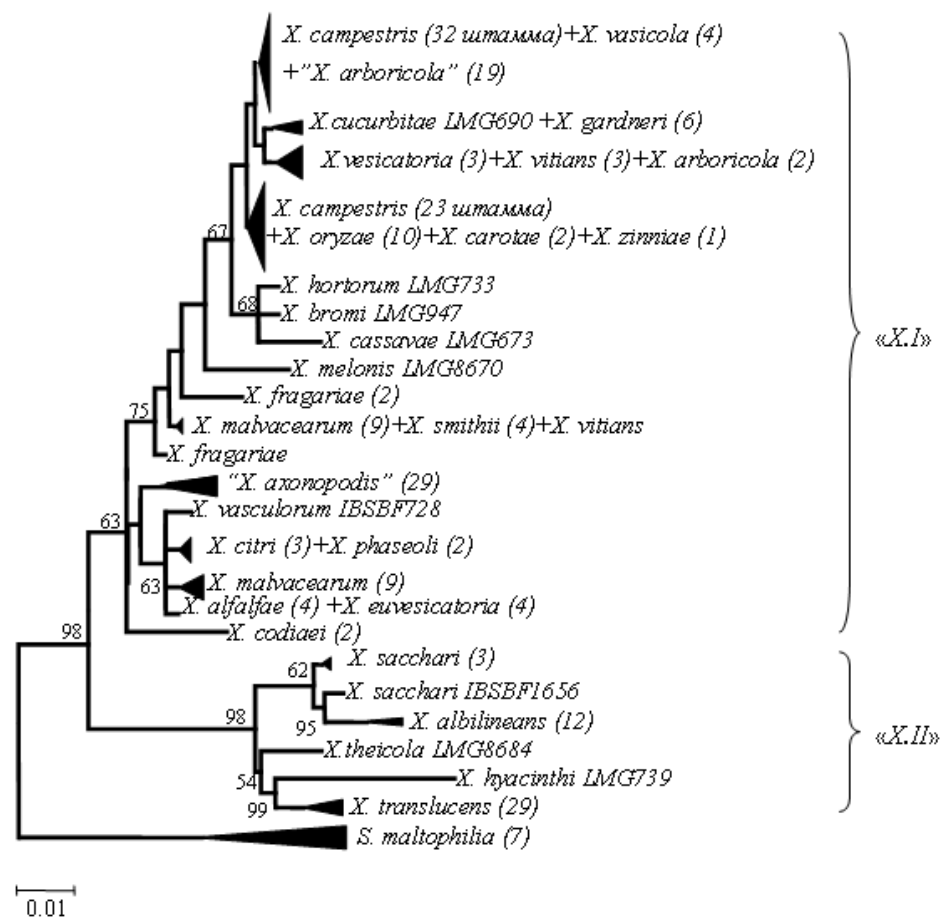


Рис. 4. Кластерный анализ, полученный на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей межгенного региона 16S-23S рРНК ITS бактерий рода *Xanthomonas* с использованием алгоритма UPGMA. Масштаб соответствует 1 замене на 100 пар оснований (эволюционным расстояниям).

Как известно, регион 16S-23S-5S рРНК представляет собой оперон (Srivastava and Schlessinger, 1990). Для рода *Xanthomonas* вторичная структура данного оперона ранее не была изучена. По результатам исследования в данной работе предложена модель вероятной вторичной структуры оперона 16S-23S-5S рРНК для бактерий данного рода (Рис. 5). Нами была определена нуклеотидная последовательность антитерминаторного *boxA-boxB* региона для рода *Xanthomonas* – 5'-ATGTTCTTTKAY-3' (длина 11 п.о.), которая способна давать информативные фингерпринты для различных патовариантов и штаммов *Xanthomonas* spp. по аналогии с последовательностью *boxA* энтеробактерий (Louws et al, 1995).

Таким образом, нами было показано, что ген 16S рРНК и межгенный участок 16S-23S рРНК ITS могут быть применены для успешной диагностики бактерий только на уровне рода *Xanthomonas*, групп видов, а также отдельных видов «*Xanthomonas* II». Для проведения успешной диагностики бактерий на более низком таксономическом уровне вида и патоварианта требуется использование иных молекулярно - биологических маркеров, таких

как протеин-кодирующие гены, детерминирующие различные процессы метаболизма, а также патогенеза.

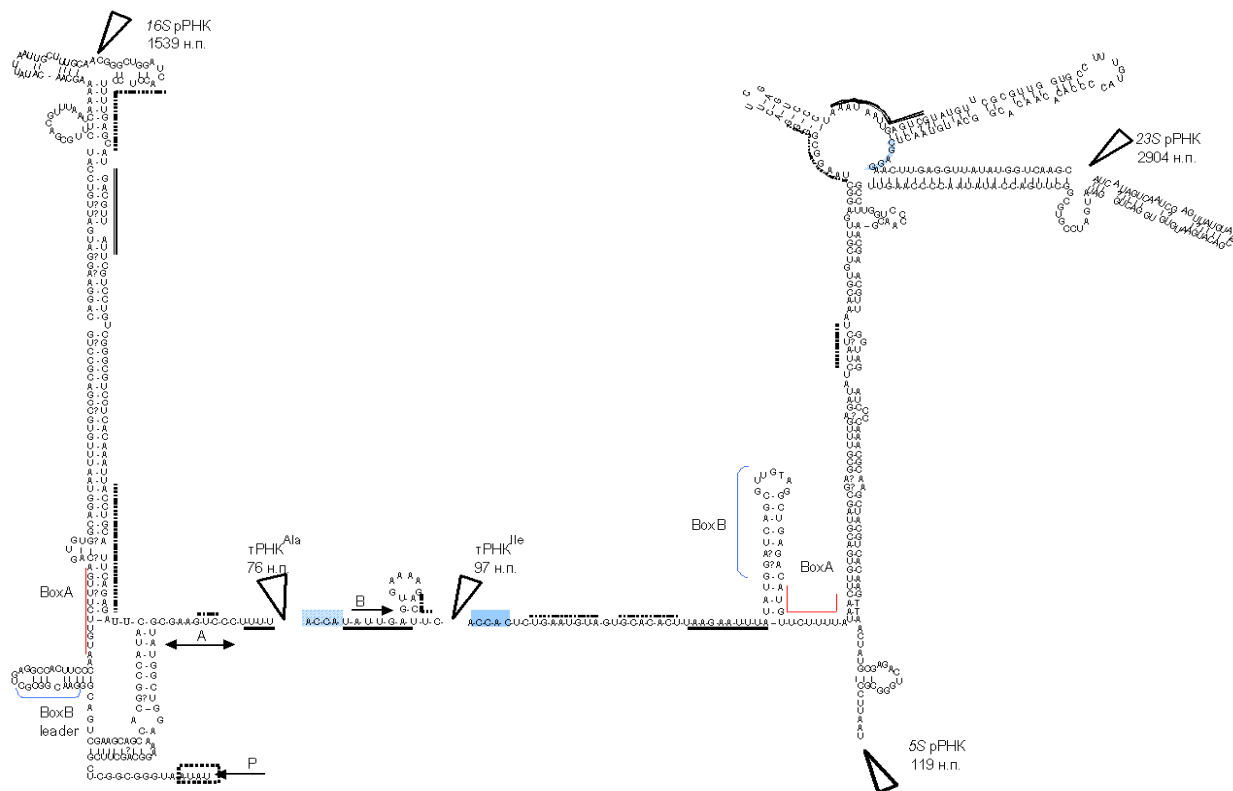


Рис. 5. Вероятная вторичная структура оперона 16S – 23S – 5S рРНК для штамма *X. campestris* pv. *campestris* ATCC33913. Консервативные участки для рода *Xanthomonas* обозначены K1-K5, переменные – V1-V3, позиция промоторной области (TATA - блок) – P, антитерминаторная область обозначены и в лидерном и в спейсерном регионе – BoxA, BoxB. Гены 16S рРНК, 23S рРНК, 5S рРНК тРНК^{Ala} и тРНК^{Ile} обозначены треугольниками.

Генетическое разнообразие нуклеотидной последовательности гена *gyrB*.

В качестве таксономического маркера видовой принадлежности штаммов был выбран ген субъединицы бета ДНК гиразы (далее *gyrB*). Он эволюционирует до 38 раз быстрее, чем 16S рРНК. Является надежным маркером, часто применяемым в настоящее время для изучения филогении бактерий на таксономическом уровне рода-вида и, иногда, патоварианта (Yamamoto et al, 1996, 1997, 1998, 1999). С помощью праймеров F5063-R6500 и F6361-R7437 нами были амплифицированы и секвенированы фрагменты гена *gyrB* общей длиной 2395 п.о. (97.96% всего гена) для 113 штаммов и с помощью метода ближайшего соседа (NJ) построено филогенетическое дерево, показанное на Рис. 6. Топология полученного дерева имела значительное сходство с филогенетическими деревьями, полученными для 16S рРНК и 16S-23S рРНК ITS. Анализ выявил межвидовые и внутривидовые различия между видами *X. campestris*, *X. vesicatoria*, *X. oryzae*, *X. fuscans*, *X. malvacearum*, *X. albilineans*. В результате кластерного анализа полной последовательности гена было выделено 3 достоверные группы *X. campestris*

pv. *campestris*. Группа 1 объединяла 41 штамм с бутстрепом 99%, включая типовой штамм *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB528^T. Группа 2 включала штаммы *X. campestris* pv. *campestris* 1385-1391. Группа 3 включала штаммы, выделенные из капустных культур в США (*X. campestris* pv. *campestris* PNH117), *X. campestris* pv. *raphani* NCPPB1946^T и штаммы *X. campestris* pv. *raphani* (5001 – 5003), выделенные из растений томата в Северо-Кавказском регионе РФ. Штаммы *X. arboricola* (1392-1397, C-3, 5-4, 3, 26, F-4, Y3004) выделялись в отдельный кластер с высоким уровнем вероятности 99% и образовывали по результатам анализа 2 группы. Группа 1 «*X. arboricola*» содержала штаммы, выделенные в Краснодарском крае в 2006 г. (1392-1397), группа 2 – штаммы, выделенные из подсолнечника (C-3, 5-4, 3, 26, F-4) и ячменя (Y3004).

В 2008 году Паркинсоном и др. было проведено секвенирование 3' – конца гена *gyrB* длиной 530 п.о. для всех известных видов бактерий рода *Xanthomonas* (203 штаммов), что позволило создать статистически значимую выборку для проведения видовой идентификации штаммов.

Нуклеотидные последовательности гена *gyrB* из ГенБанка были сравнены со 113 последовательностями штаммов *Xanthomonas* spp., полученными в данной работе. По всем последовательностям были рассчитаны попарные генетические расстояния (2-параметрная модель Кимуры) и с помощью метода ближайшего соседа (NJ) построено филогенетическое дерево, представленное на Рис. 7.

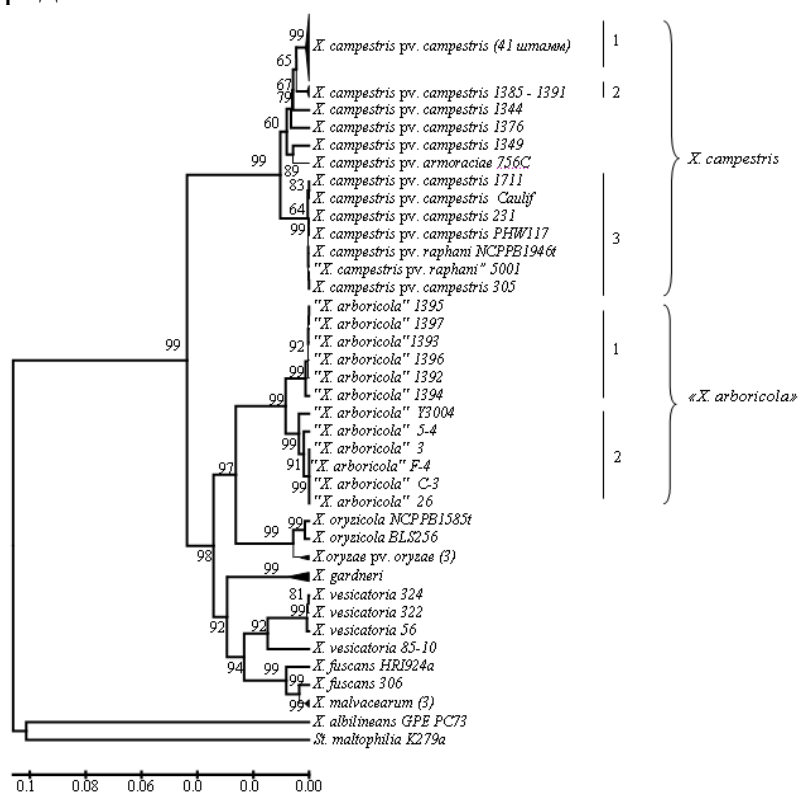


Рис. 6. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена *gyrB* бактерий рода *Xanthomonas* с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 2 заменам на 100 пар оснований.

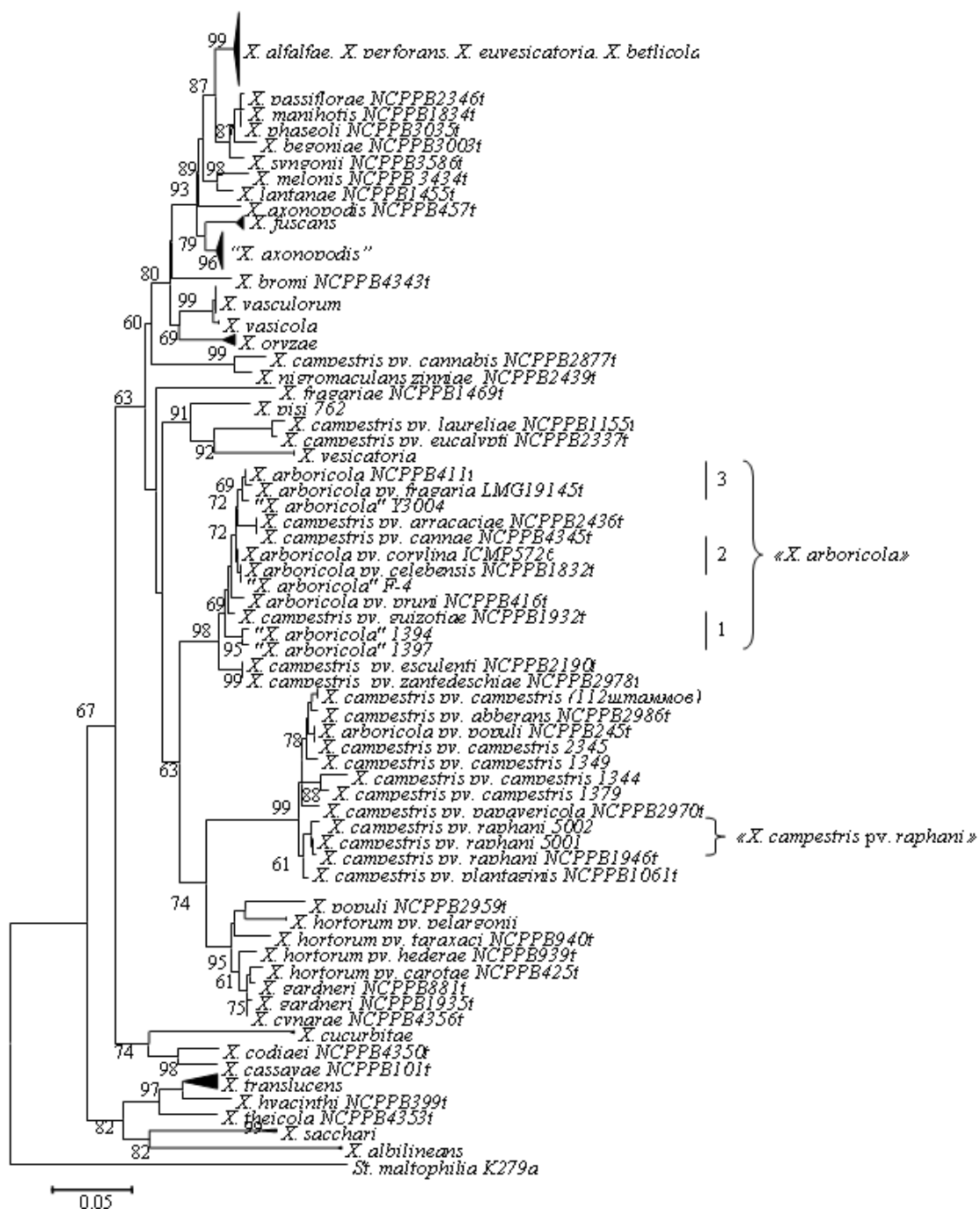


Рис. 7. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей 3'-конца гена *gyrB* бактерий рода *Xanthomonas* с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 5 заменам на 100 пар оснований.

Все штаммы *X. arboricola* достоверно были сгруппированы вместе со штаммами *X. arboricola*. Внутри данной группы выделялось 3 кластера. Первый состоял из штаммов *X. arboricola* 1392-1397, патогенных для капусты. Второй включал штаммы *X. arboricola* C-3, 5-4, 3, 26, F-4, патогенные для подсолнечника и капусты, и третий – штамм *X. arboricola* Y3004 являлся патогеном ячменя.

Появление *X. arboricola* в России, как патогена новых видов растений, одновременно с усилением вредоносности этого вида в зонах традиционного

распространения патогена (Закавказских и Балканских странах, Средней Азии, Китае, США, Австралии и Африке) позволяет предсказать расширение ареала патогена на север Европейской части РФ, а также дальнейшее увеличение числа поражаемых видов растений. Появление нового слабо специализированного фитопатогена, вероятно, переходящего с культуры на культуру, затрудняет борьбу с ним агротехническими методами и снижает эффективность контроля чистоты семенного материала.

Нами была проанализирована зависимость таксономического разрешения филогенетического дерева, построенного по последовательности гена *gyrB* штаммов *Xanthomonas* spp. от длины и локализации фрагмента гена. Было проведено сравнение разрешающей способности фрагментов гена *gyrB* различной длины, применяемых в работах Паркинсона (2008) (~530 п.о. - обозн. фрагмент А) и Янга с коллегами (2008) (~850 п.о. – фрагмент Б) и почти полного гена, секвенированного в данной работе (фрагмент В). Исследование полиморфизма (энтропии) нуклеотидной последовательности гена *gyrB* для 113 штаммов, используемых в данной работе, было выполнено в программе BioEdit и представлено на Рис. 8.

По результатам проведенного анализа было установлено, что фрагмент А обладал более высоким средним уровнем энтропии по сравнению с двумя другими. Доля вариаций, рассчитанная в программе DNAsp v.5 (Rozas et al, 2009) для данного фрагмента, составила 62.4%, для фрагментов Б и В она была равна 52.1% и 40.6%, соответственно. В то время как для полной нуклеотидной последовательности гена, без учета делеций, было выявлено 794 (35.8%) полиморфных сайтов, для фрагмента с 3'- конца гена - 340 сайтов с заменами (63.3%). Уровень гомологии между отдельными видами по полной последовательности и для фрагмента гена был практически одинаковым и варьировал от 74.1 до 100.0 %, среднее значение - 87.0%.

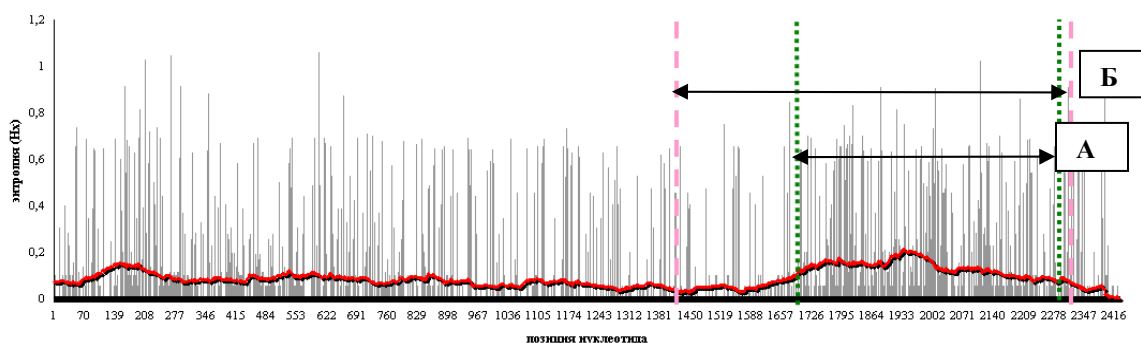


Рис. 8. Распределение уровня полиморфизма (энтропии) по нуклеотидной последовательности гена *gyrB* (фрагменту В) для 113 штаммов. Серой тонкой линией отмечено распределение уровня энтропии на одной нуклеотидной позиции. Черной жирной линией представлено распределение среднего уровня полиморфизма по длине фрагмента для 100 п.о.. Вертикальными пунктирными линиями обозначены границы фрагментов А и Б.

По результатам анализа последовательностей гена *gyrB*, секвенированных нами, и фрагментов гена, помещенных ранее в базу данных (Young et al, 2008), были найдены характерные нуклеотидные замены для *X. arboricola*. На основании этого была разработана система олигонуклеотидных праймеров (*XarF-XarR*), прошедшая проверку на специфичность для представителей вида *X. arboricola* (Рис. 9).

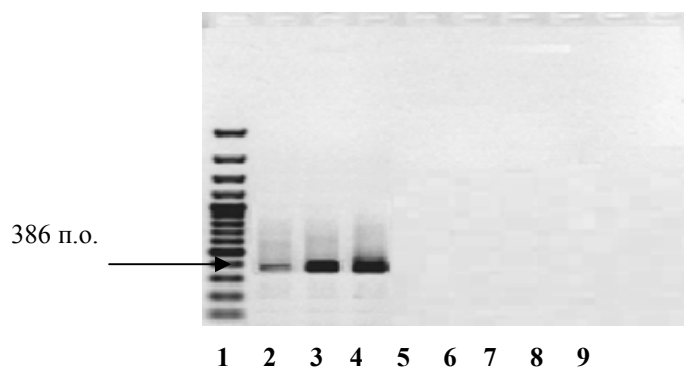


Рис. 9. Электрофоретический анализ амплификации фрагмента гена *gyrB* с праймерами *XarF* и *XarR*. Стрелкой указан целевой фрагмент. М – маркер молекулярной массы ДНК (1kb). Цифрами обозначены: 1-маркер молекулярной массы ДНК (1 kb); 2-ДНК *X. arboricola* Y3004; 3-ДНК *X. arboricola* F-4; 4-ДНК *X. arboricola* 1397; 5-ДНК *X. campestris* pv. *campesris* 528^T; 6-ДНК *X. oryzae* pv. *oryzicola* NCPPB1585^T; 7-ДНК *X. vesicatoria* pv. *vesicatoria* NCPPB422^T; 8-ДНК *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* PS32; 9-ДНК *Erwinia carotovora* ER1;

Генетическое разнообразие нуклеотидной последовательности оперона Xcc0006-0007. Для дальнейшего исследования была выбрана специфичная для рода *Xanthomonas* нуклеотидная последовательность оперона *Xcc0006-0007*, коррелирующая со специализацией бактерий на растении-хозяине по результатам ранее проведенных исследований (Игнатов и др., 2004). Последовательность оперона включает 2 функционально важных гена и варибельный межгенный регион, вероятно включающий промотор кластера генов *tonB-exbD*, жизненно важных для работы мембранных белков. Для 113 штаммов были получены полные нуклеотидные последовательности оперона *Xcc0006-0007* длиной 1971 п.о.. Филогенетический анализ показал четкие межвидовые и внутривидовые различия среди штаммов *X. campestris*, *X. vesicatoria*, *X. oryzae*, *X. malvacearum*, *X. fuscans* (Рис. 10). Разделение по группам шло в зависимости от наличия/отсутствия вставки в межгенном регионе *Xcc0006-0007*, а также от специфических нуклеотидных замен в самом опероне. Регион с 3'-конца от 25 до 49 от 500 до 570 и от 1255 до 1290 нуклеотида оперона *Xcc0006-0007* у большинства штаммов отличался высокой степенью полиморфизма. Полиморфные участки и нуклеотидные замены наблюдались как у разных видов *Xanthomonas*, так и внутри вида *X.*

campestris. При этом значительная доля изменений была связана с транзициями (замены G или A на C или T) и трансверсиями (замены C на T).

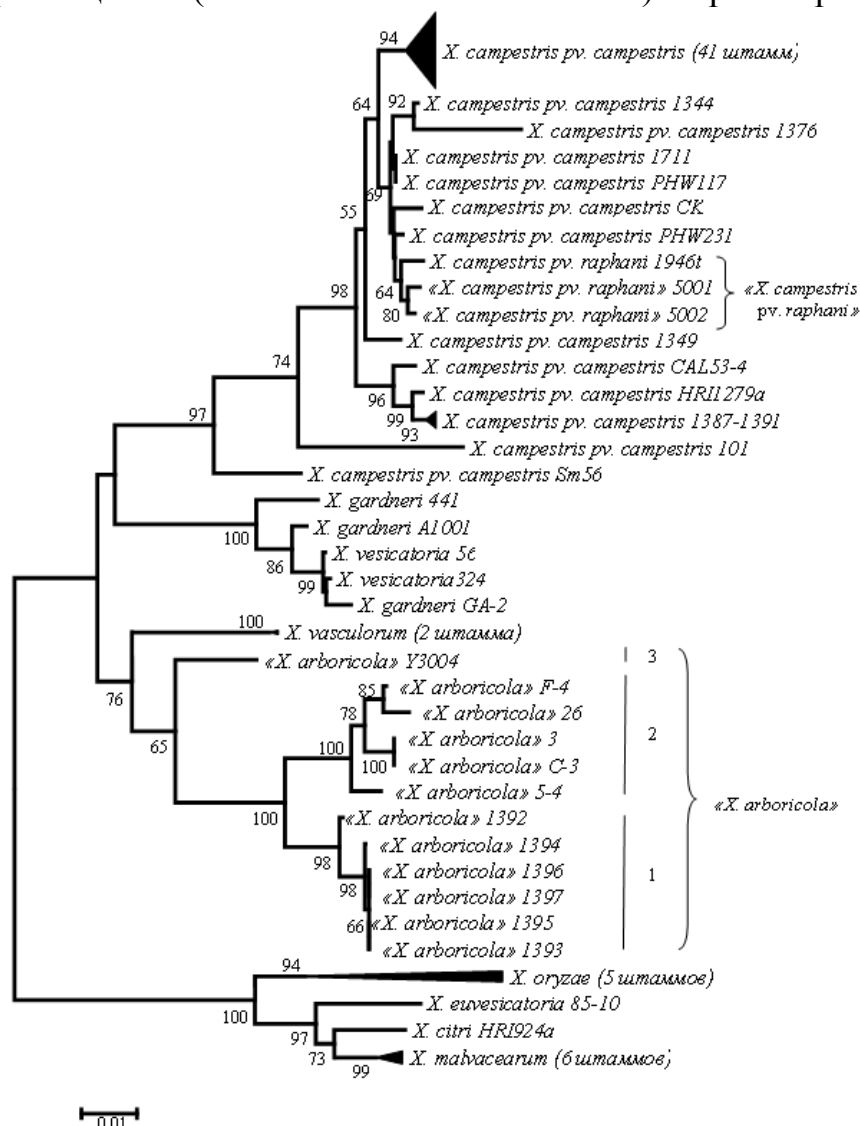


Рис. 10. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей региона Xcc0006-0007 для бактерий рода *Xanthomonas* с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 1 замене на 100 пар оснований.

Генетическое разнообразие нуклеотидной последовательности гена *cyt-P450*. Нами были исследованы геномы *Xanthomonas* spp. на наличие генов NADPH (альфа, бета форм) и цитохромов P-450 – акцепторных частей, необходимых для успешной работы фермента монооксигеназы (Таблица 2). Ген цитохрома P-450 семейства CYP133B3/B4 (*cytP-450*, BioI, cytochrome P450 hydroxylase) был консервативен и найден у всех видов *Xanthomonas*, кроме *X. oryzae*, что, вероятно, связано с субстратоспецифичностью фермента, кодируемого данным геном (Gross, 1989, Otomo et al, 2004, Reuben J.P., 2006). На консервативные регионы гена *cyt-P450* сем. CYP133B3/B4 были созданы 2 праймерные системы: первая – специфическая для рода *Xanthomonas* (CYP133 F1+R1), вторая – специфическая для вида *X. campestris* (CYP133 F2+R2), которые прошли свою проверку на специфичность на 113

штаммах *Xanthomonas* и других близкородственных гаммапротеобактериях (данные не представлены). Для 43 штаммов *X. campestris*, 4 штаммов *X. arboricola* C-3, 5-4, 3, 26 и штамма *X. gardneri* GA2 были определены нуклеотидные последовательности гена *cut-P450* сем. СУР133В3/В4, длиной 655 п.о. (50% всей нуклеотидной последовательности), полученные с помощью праймеров СУР133 F2+R2. С помощью алгоритма ближнего соседа (NJ) было построено филогенетическое дерево, показанное на Рис. 11.

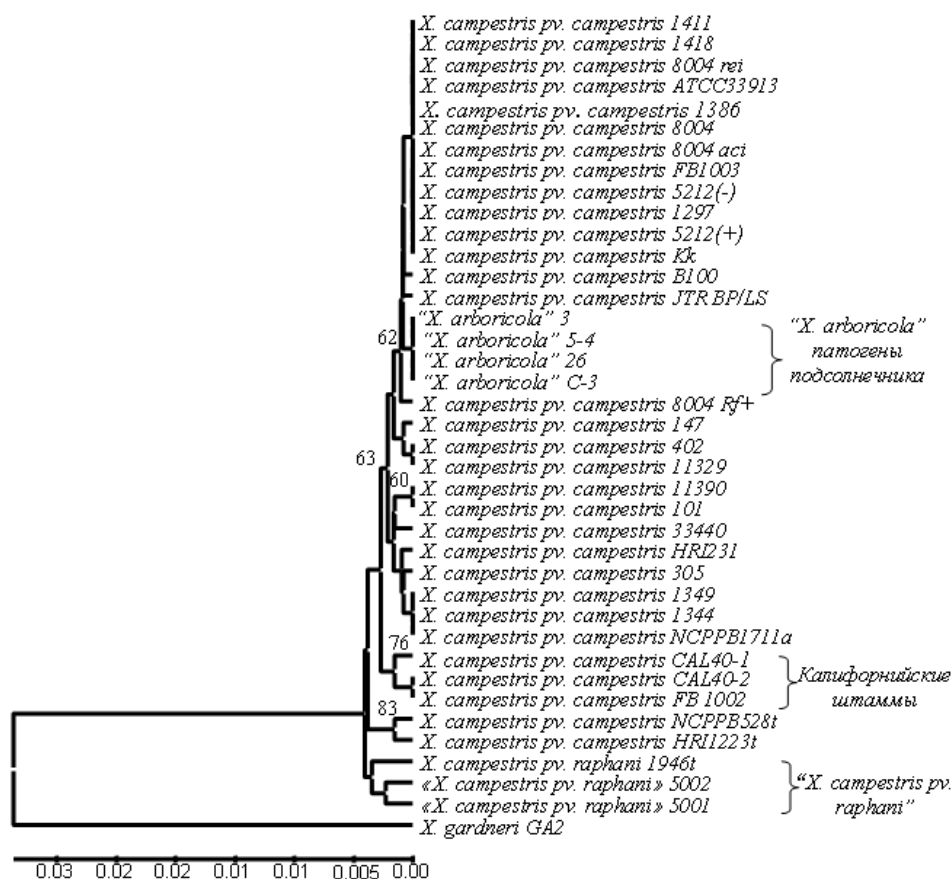


Рис. 11. Филогенетическое дерево, построенное на основании сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей гена *cutP-450* сем. СУР133В3/В4 для бактерий рода *Xanthomonas* с использованием алгоритма NJ. Масштаб соответствует 0.5 заменам на 100 пар оснований.

Филогенетический анализ показал четкие межвидовые различия штаммов *X. campestris* и *X. gardneri* GA2. Разделение по видам шло в зависимости от наличия специфических нуклеотидных замен в нуклеотидной последовательности. Внутри вида *X. campestris* с уровнем бутстрепа 62-83% выявлялись группы *X. campestris* pv. *raphani*, *X. campestris*, выделенные из дикорастущих крестоцветных растений в Калифорнии, и типовые штаммы *X. campestris* pv. *campestris* NCPPB528^T=ICPPB1223^T. Неожиданно, с существенной степенью достоверности с последовательностями вида *X. campestris* были сгруппированы штаммы *X. arboricola*, патогенные для подсолнечника и капусты.

Изучение изменения бактериального фенотипа. Делеция гена авирулентности *avrXccC*. Вероятные механизмы инсерции и делеции данного гена.

А. Кастанеда с коллегами (Castaneda et al, 2006) обнаружили ген авирулентности *avrXccC*, отвечающий за авирулентную реакцию с геном устойчивости *Rxcc1*, типичным для дикорастущих крестоцветных растений. Данный ген выявлен у *X. campestris* pv. *campestris* рас 1, 3 и 4 (Игнатов, 2006), принадлежит к семейству *avrB* генов и имеет уровень сходства более 79% по всей аминокислотной последовательности с геном-эффектором *avrBPph3221* из *P. syringae* (*avrPphC* gbAAV68743.1; Linderberg et al, 2008; Yucel et al, 1994). Ген необходим для экспрессии 48кДа белка-эффектора специфического узнавания растения-хозяина фитопатогенной бактерией (Wang et al, 2007).

Игнатовым и др (2002) было обнаружено изменение расы *X. campestris* при заражении устойчивого генотипа растения *Brassica composita* (*Rxcc1+*, геном ABC). В данной работе было доказано, что изменение расы происходит в результате индуцированной делеции гена *avrXccC* в геномах *X. campestris* pv. *campestris* рас 1, 3 и 4. Удаление гена было связано с нахождением во фланкирующих межгенных участках коротких инвертированных и палиндромных повторов (Рис. 12).

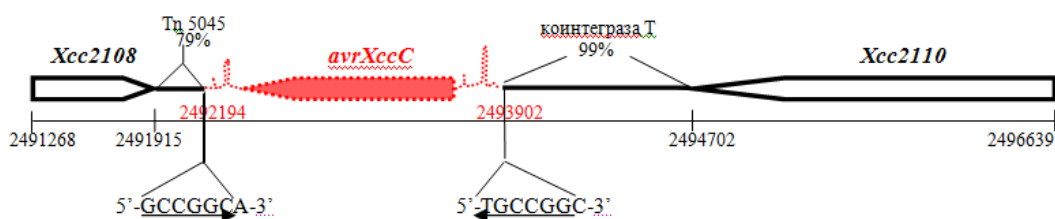


Рис. 12. Вероятная схема индуцированной делеции гена. Делетируемые участки обозначены красной пунктирной линией. Красными буквами выделены координаты точек делеции.

Наличие GC – богатого палиндромного повтора (GCCGGCA) длиной 7 п.о. является необходимым и достаточным условием для образования шпильчатой структуры (стема) (Nag and Petes, 1991). Зеркальный повтор GCCGGC необходим для узнавания сайт-специфичной эндонуклеазой типа II патогена или растения, что необходимо для индуцированной делеции гена (Rocha et al, 2001; Fuglsang, 2003).

На Рис. 13 предложены вероятные точки встраивания гена *avrXccC* в геном *X. campestris* pv. *campestris* с помощью коинтеграз и транспозаз. Сайт встраивания (инсерции) - позиции 2491916 п.о. и 2493750 п.о.

Учитывая, что данный ген присутствует в геноме фитопатогенных бактерий рода *Pseudomonas* с высоким уровнем сходства, созданные для него праймерные системы могут быть использованы для диагностики только совместно с родо- или видоспецифичными молекулярными маркерами.

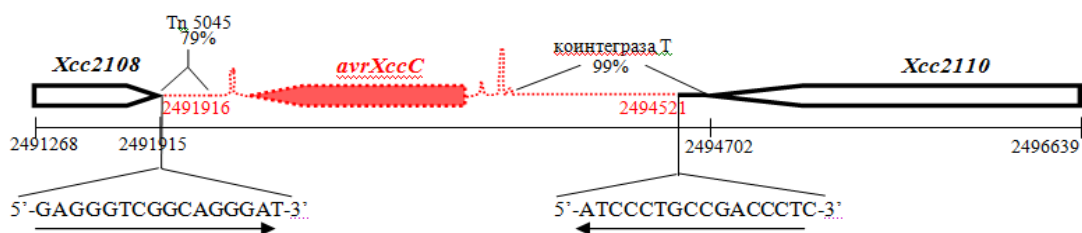


Рис. 13. Вероятные точки встраивания гена *avrXccC* в геном *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* рас 1, 3, 4. Встроенный регион обозначен красной пунктирной линией. Красными буквами выделены координаты точек встраивания.

Создание молекулярных маркеров для диагностики бактерий рода *Xanthomonas* на различных таксономических уровнях. Проведенные исследования полиморфизма и сравнение филогенетических отношений по нуклеотидным последовательностям изученных молекулярно генетических маркеров (*gyrB*, *Xcc0006-0007*, *cyt-P450* сем. СУР133В3/В4) с существующей в настоящий момент филогенией, полученной по последовательностям *16S* рРНК и *16S-23S* рРНК ITS, выявили диапазон применимости их для диагностики *Xanthomonas* spp. на различных таксономических уровнях. По результатам проведенных исследований все созданные нами праймерные системы прошли проверку на специфичность. Данные представлены на Рис 14.

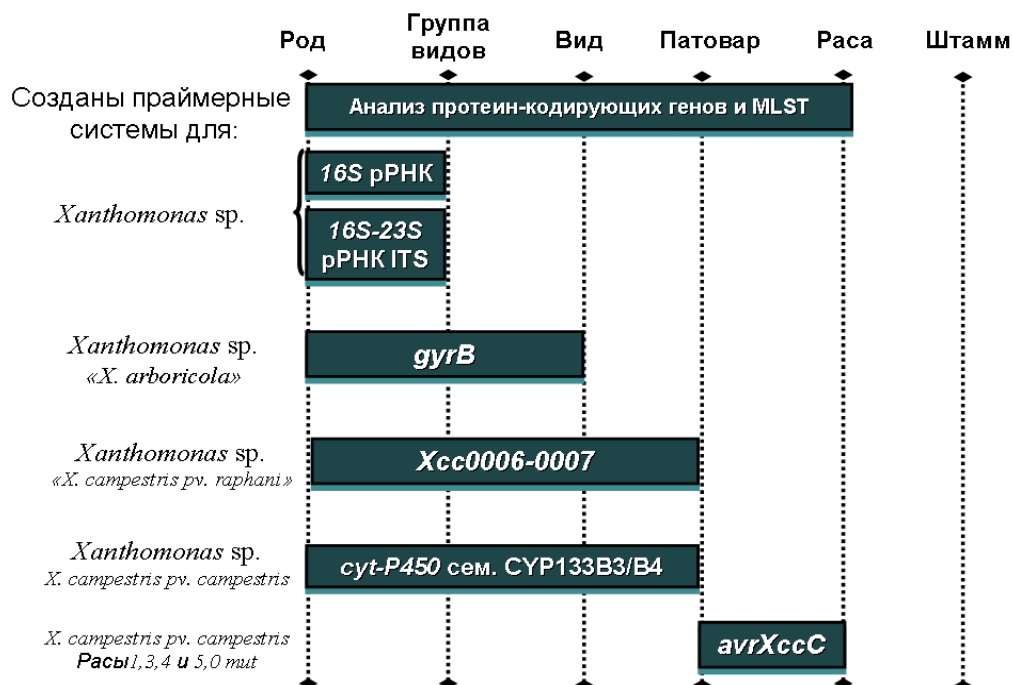


Рис. 14. Диапазон применимости последовательностей исследованных регионов для диагностики бактерий рода *Xanthomonas* на различных таксономических уровнях. Слева даны те таксоны, для диагностики которых в данной работе созданы праймерные системы.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведен анализ генетического разнообразия последовательностей генов *gyrB*, *cyt-P450* сем. СУР133В3/В4 и региона *Xcc0006-0007* для 113 штаммов *X. campestris* pv. *campestris* и родственных видов *Xanthomonas*, представляющих популяции патогенных бактерий в РФ. Установлены нуклеотидные замены, характерные для видов *X. arboricola*, *X. campestris*, *X. vesicatoria* и внутривидовых групп *X. campestris*, пригодные для создания специфичных ПЦР маркеров.
2. Впервые обнаружены штаммы вида *X. arboricola*, поражающие сельскохозяйственные злаки, крестоцветные растения и подсолнечник. Создана система ПЦР праймеров для их диагностики.
3. Впервые в России обнаружены штаммы *X. campestris* pv. *raphani*, поражающие пасленовые растения, и проведен комплексный анализ их физиологических и генетических свойств.
4. Впервые установлен факт делеции гена авирулентности *avrXccC* у *X. campestris* pv. *campestris*, индуцированной заражением растений с комплементарным геном устойчивости *Rxcc1*.

Список опубликованных работ:

1. Игнатов А.Н., Пунина Н.В., Цыганкова С.В., Николаева Е.Т, Матвеева Е.В, Булыгина Е.С, Кузнецов Б.Б., Шаад Н.В.. Изменчивость регуляторного региона на 5'- конце гена *tonB* у *Xanthomonas* связана со спектром растений-хозяев. // В книге: Открытие, развитие и применение в фитопатологии. по материалам 7-й конференции Европейского фонда фитопатологии и Британского общества фитопатологии. Ред. Уель С. -2004. -С. 49-50. (на английском языке).
2. Пунина Н.В., Зотов В.С., Кузнецов Б.Б., Игнатов А.Н.. Оценка генетического разнообразия межгенного транскрибируемого региона 16S-23S рРНК, гена *gyrB* и разработка ПЦР диагностики фитопатогенных ксантомонад. // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки», -2008. -№2. – С. 3-17.
3. Матвеева Е.В., Пунина Н. В., Игнатов А.Н. Пехтерева Э.Ш., Политыко В.А., Шаад Н.В.. Оценка генетического разнообразия генов 16s рРНК, *gyrB* и межгенных транскрибируемых регионов 16s-23s рРНК и Xcc0006-0007 бактерий рода *Xanthomonas*. // 50 лет на страже продовольственной безопасности страны. Юбилейный сборник трудов ВНИИ фитопатологии. Ред. С.С. Санин и др. -2008. ISBN 978-5-9901423-1-2, -С. 329-346.
4. Punina N.V., Ignatov A.N., Pekhtereva E.Sh., Kornev K.P., Matveeva E.V., Polityko V.A., Budenkov N.I., and Schaad N.W. Occurrence of *Xanthomonas campestris* pv. *raphani* on tomato plants in Russian Federation. // ISHS-808 Acta Horticulturae. Proceedings of the IInd International Symposium on tomato disease. Ed.: H. Saygili, F. Sahin, Y. Aysan. -2009. ISBN 978-90-66057-11-1. -P. 287-290.
5. Kornev K.P., Matveeva E.V., Pekhtereva E.Sh., Polityko V.A., Ignatov A.N., Punina N.V., Schaad N.W.. *Xanthomonas* species causing bacterial spot on tomato in Russian Federation. // ISHS-808 Acta Horticulturae. Proceedings of the IInd International Symposium on tomato disease. Ed.: H. Saygili, F. Sahin, Y. Aysan. -2009. ISBN 978-90-66057-11-1. -P. 243-245.
6. Zotov V.S., Punina N.V., Dorokhov D.B., Schaad N.W., Ignatov A.N.. Phylogenetic changes in chloroplast genomes. // 4nd conference on Bioinformatics of genome regulation and structure (BGRS-2006). Новосибирск, Россия. Материалы конференции, -С. 249-252.
7. Punina N.V., Ignatov A.N., Matveeva E.V., Schaad N.W. Genetic variability among bacteria of genus *Xanthomonas* and development of multiplex molecular diagnostic methods. Международная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов по молекулярной биологии и генетике, посвященная 120-летию со дня рождения М.И. Вавилова. Киев, Украина, 20-22 сентября 2007 г. Материалы конференции, -С. 37.
8. Пунина Н.В., Зотов В.С, Игнатов А.Н., Матвеева Е.В., Шаад Н.В. Применение ассиметричных олигонуклеотидов для геномного сравнения у фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas*. Международная конференция к 50-летию становления отечественной филогенетики и систематики

«Вычислительная филогенетика и геносистематика» «ВФГС 2007». 16-19 ноября, 2007, МГУ, Москва, Россия. Материалы конференции, -С. 93-98.

9. Пунина Н.В., Игнатов А.Н., Зотов В.С, Матвеева Е.В., Шаад Н.В. Генетическое разнообразие фитопатогенных бактерий *Xanthomonas campestris*. Международная конференция к 50-летию становления отечественной филогенетики и систематики «Вычислительная филогенетика и геносистематика» «ВФГС 2007». 16-19 ноября, 2007, МГУ, Москва, Россия. Материалы конференции, -С. 260-266.

10. Зотов В.С., Корнев К.П., Пунина Н.В., Мазурин Е.С., Джалилов Ф.С., Матвеева Е.В., Игнатов А.Н.. Сравнение методов PFGE и sAFLP для видовой диагностики фитопатогенных и промышленных штаммов ксантомонад. VIII молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». 4 апреля, 2008, Москва, Россия. Материалы конференции, -С. 31-32.

11. Punina N.V., Ignatov A.N., Matveeva E.V., and Schaad N.W.. The distribution of *avrXccC* (*Xcc2109*) gene among native strains of *Xanthomonas* sp. and the gene loss in spontaneous mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. NOVA PhD course "Understanding plant-pathogen interactions in the post genomics era". 4-11 May, 2008, Hyytiälä, Finland. Материалы конференции, С. 49.