



СИСТЕМЫ РЕСТРИКЦИИ-МОДИФИКАЦИИ И ПРОФИЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* 2A

Ю. В. ДЮБО¹⁾, А. Э. ОХРЕМЧУК²⁾,
Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ^{1), 2)}, Е. А. НИКОЛАЙЧИК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет,
пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Институт микробиологии НАН Беларуси,
ул. Академика В. Ф. Купревича, 2, 220141, г. Минск, Беларусь

С помощью технологии секвенирования Oxford Nanopore исследован профиль метилирования генома *Pectobacterium carotovorum* 2A. Определена специфичность метилазных субъединиц трех систем рестрикции-модификации данного штамма. Анализ гомологичных систем показал уникальность системы рестрикции-модификации I типа и специфичной к метилированной ДНК системы рестрикции IV типа этого штамма. Работа подтверждает применимость технологии Oxford Nanopore для анализа модификаций ДНК бактерий, а также является первым примером такого анализа для *Pectobacterium* spp.

Ключевые слова: Oxford Nanopore; метилирование; система рестрикции-модификации; N6-метиладенозин; 5-метилцитозин.

Образец цитирования:

Дюбо ЮВ, Охремчук АЭ, Валентович ЛН, Николайчик ЕА. Системы рестрикции-модификации и профиль метилирования ДНК *Pectobacterium carotovorum* 2A. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021; 3:71–77.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-3-71-77>

For citation:

Diubo YV, Akhremchuk AE, Valentovich LN, Nikolaichik YA. Restriction-modification systems and DNA methylation profile of *Pectobacterium carotovorum* 2A. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2021;3:71–77. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-3-71-77>

Авторы:

Юлия Владимировна Дюбо – ассистент кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Артур Эдуардович Охремчук – научный сотрудник лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований».

Леонид Николаевич Валентович – кандидат биологических наук; доцент кафедры молекулярной биологии биологического факультета¹⁾, заведующий лабораторией «Центр аналитических и генно-инженерных исследований»²⁾.

Евгений Артурович Николайчик – кандидат биологических наук; доцент кафедры молекулярной биологии биологического факультета.

Authors:

Yulia V. Diubo, assistant at the department of molecular biology, faculty of biology.

yuliyadiubo@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-3161-1560>

Artur E. Akhremchuk, researcher at the laboratory «Center of analytical and genetic engineering research».

akhremchuk@bio.bsu.by

<https://orcid.org/0000-0001-8602-4887>

Leonid N. Valentovich, PhD (biology); associate professor at the department of molecular biology, faculty of biology^a, and head of the laboratory «Center of analytical and genetic engineering research»^b.

valentovich@bio.bsu.by

<https://orcid.org/0000-0001-7329-743X>

Yevgeny A. Nikolaichik, PhD (biology); associate professor at the department of molecular biology, faculty of biology.

nikolaichik@bsu.by

<https://orcid.org/0000-0002-6718-9309>





RESTRICTION-MODIFICATION SYSTEMS AND DNA METHYLATION PROFILE OF *PECTOBACTERIUM CAROTOVORUM* 2A

Y. V. DIUBO^a, A. E. AKHREMCHUK^b,
L. N. VALENTOVICH^{a, b}, Y. A. NIKOLAICHIK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bInstitute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus,
2 Academician V. F. Kupreviča Street, Minsk 220141, Belarus

Corresponding author: Y. A. Nikolaichik (nikolaichik@bsu.by)

The methylation profile of *Pectobacterium carotovorum* 2A genome was studied using the Oxford Nanopore sequencing technology. The specificity of the methylase subunits of the three restriction-modification systems of this strain was determined. Analysis of homologous systems showed the uniqueness of the type I restriction-modification system and the type IV restriction system specific to methylated DNA of this strain. The work confirms the applicability of Oxford Nanopore technology to the analysis of bacterial DNA modifications and is also the first example of such an analysis for *Pectobacterium* spp.

Keywords: Oxford Nanopore sequencing; methylation; restriction-modification system; N6-methyladenosine; 5-methylcytosine.

Введение

Системы рестрикции-модификации контролируют горизонтальный перенос ДНК у бактерий и могут создавать серьезные препятствия при конструировании бактериальных штаммов с заданными свойствами. Как и во многих других таксономических группах, большинство штаммов *Pectobacterium* spp. с трудом трансформируются чужеродной ДНК, что может быть связано с работой именно систем рестрикции.

Системы рестрикции-модификации подразделяются на четыре типа в соответствии с их генетическими и биохимическими характеристиками. У систем I типа рестрикционная и метилирующая активности разделены между разными полипептидами, а специфичность мишени в ДНК как при метилировании, так и при рестрикции контролируется третьей субъединицей. Рестрикция происходит на произвольном расстоянии от сайта узнавания [1]. Системы рестрикции-модификации II типа расщепляют ДНК непосредственно в сайте узнавания или на небольшом и строго определенном расстоянии от него. Рестриктазы и метилазы этих систем, как правило, работают независимо друг от друга и представлены разными полипептидами [2]. Системы рестрикции-модификации III типа распознают асимметричные сайты и расщепляют ДНК на некотором расстоянии от них. Для проявления рестрикционной активности требуют двух неметилированных сайтов узнавания, расположенных в специфической ориентации «голова к голове» [3]. Системы рестрикции IV типа отличаются от всех вышеописанных в первую очередь тем, что распознают и расщепляют только модифицированную ДНК [4].

Анализ геномов пектобактерий показывает, что даже штаммы одного вида, как правило, имеют разные наборы рестриктаз, это может объяснять наблюдаемые различия в эффективности их трансформации. Предварительный анализ корреляций между эффективностью трансформации штамма и набором имеющихся у него рестриктаз показал, что у наиболее устойчивых к внедрению чужеродной ДНК штаммов обязательно присутствуют система рестрикции IV типа и не менее двух других систем рестрикции-модификации. А поскольку системы IV типа распознают только модифицированную ДНК, дополнительные системы рестрикции-модификации того же штамма не могут осуществлять метилирование позиций, распознаваемых системой рестрикции IV типа.

Исследование специфичности систем рестрикции-модификации в целом, а в особенности систем IV типа, связано со многими трудностями, и в первую очередь с летальностью генов этих систем при попытках их клонирования. Дополнительными сложностями для систем IV типа являются малая специфичность распознаваемых последовательностей и отсутствие для большинства из них четкой связи между сайтом связывания и сайтом рестрикции. Неудивительно, что специфичность и другие особенности функционирования охарактеризованы только для очень небольшого числа систем IV типа. Так, у *E. coli* хорошо описаны системы *mcrA*, *mcrBC* и *mrr*. Первые две системы распознают модифицированный цитозин, последняя – аденозин в малоконсервативных коротких последовательностях, а саму



рестриктию осуществляют на варьирующем расстоянии от этих последовательностей [4]. Известно, что системы IV типа, расщепляющие ДНК с 5-гидроксиметилцитозином, расщепляют и ДНК с 5-метилцитозином. Исключением из этого наблюдения, судя по всему, является Mgt-система *E. coli* K, которая не расщепляет ДНК Т-четных бактериофагов, содержащую 5-гидроксиметилцитозин [4]. Системы, распознающие N6-метиладенин, не распознают ДНК с 5-метилцитозином и (или) 5-гидроксиметилцитозином. Верно и обратное [4]. Достаточно часто рядом с генами гомологов MsrBC обнаруживают гены метилтрансфераз. Чаще всего это ДНК-метилтрансферазы из систем рестрикции-модификации I типа или II G типа. Естественно, модификации, вносимые этими метилтрансферазами, не могут быть мишенями для нуклеазы соседней системы IV типа [5].

В то же время обнаружены необычные системы рестрикции IV типа, имеющие метилазы в своем составе, как, например, BspLU11III из *Bacillus* sp. Их строение отличается от типичного для систем IV типа. Система BspLU11III состоит из двух ДНК-метилтрансфераз (А и В) и одной эндонуклеазы, которая тоже обладает метилазной активностью (модифицирует аденозин). Гены *bsplu11IIIMa*, *bsplu11IIIMb* и *bsplu11IIIR* расположены рядом друг с другом. Метилазы распознают сайт 5'-GGGAC-3'/5'-GTCCC-3'. Метилаза А модифицирует аденозин, а метилаза В – цитозин (метилируемые нуклеотиды подчеркнуты в последовательности сайта узнавания). Образующий метилазой N6-метиладенозин защищает ДНК от гидролиза этой же нуклеазой [6].

Некоторые современные технологии высокопроизводительного секвенирования способны отличать модифицированные нуклеотиды от немодифицированных [7], что при достаточном количестве данных позволяет выявить большинство модифицированных позиций в геноме, а во многих случаях и установить последовательность нуклеотидов, распознаваемых метилазой. Сопоставление распознаваемых последовательностей с предсказанными *in silico* свойствами аннотированных в геномной последовательности метилаз (при малом их количестве) позволяет определить специфичность каждой из них. Такой анализ не может непосредственно решить вопрос о специфичности конкретной системы IV типа, но способен исключить последовательности, которые она не должна распознавать. Также можно рассчитывать, что изучение профилей метилирования многих родственных штаммов упростит и определение специфичности систем IV типа.

Поскольку к настоящему времени информация о профилях метилирования геномов пектобактерий в опубликованной литературе отсутствует, в качестве первого шага к пониманию этих очень вариабельных систем пектобактерий в данной работе проанализированы системы рестрикции-модификации одного из штаммов этого фитопатогена с использованием возможностей технологии Oxford Nanopore. В качестве непосредственного объекта изучения был выбран штамм со сложным набором систем, включая систему IV типа.

Материалы и методы исследования

В работе использован штамм *Pectobacterium carotovorum* 2A из коллекции кафедры молекулярной биологии БГУ.

Секвенирование генома выполнено с применением двух комплементарных технологий. Тотальную ДНК выделяли с помощью набора реактивов Bacteria DNA Preparation – Solution Kit (*Jena Bioscience*, Германия). Для приготовления библиотек ДНК использовали набор реактивов NEBNext (*New England Biolabs*, США) или Ligation Sequencing Kit (*Oxford Nanopore Technologies*, Великобритания) для последующего секвенирования с помощью технологии Illumina или Oxford Nanopore. Определение нуклеотидных последовательностей проводили с применением геномных секвенаторов MiSeq (комплект реактивов MiSeq Reagent Kit v3, MS-102-3003) (*Illumina*, США), а также MinION Mk1B (*Oxford Nanopore Technologies*) с проточной ячейкой R9.4.1. Демультиплексирование и фильтрацию данных технологии Oxford Nanopore выполняли в программе *Barapost v. 2020-11-16* [8]. Гибридную сборку геномной последовательности с применением длинных и коротких прочтений осуществляли с помощью ассемблеров *SPAdes v. 3.14.1* [9] и *Flye v. 2.8.2* [10] (последний использовал только данные технологии Oxford Nanopore). Проверку и коррекцию сборки проводили в программе *Pilon v. 1.23* [11].

Аннотация геномной последовательности выполнялась с помощью конвейера *NCBI PGAP v. 5.0* [12]. Анализ набора систем метилирования штаммов *P. versatile*, *P. carotovorum* и *P. atrosepticum* проводился с использованием данных *REBASE* [13]. Поиск сходных систем метилирования осуществлялся с помощью алгоритма *BLAST* [14] в базе данных *GenBank* [15].

Для анализа профилей метилирования с использованием данных нанопорового секвенирования применялся программный пакет *Tombo* [16]. Для построения профилей метилирования использовались алгоритм *de novo* и алгоритмы, детектирующие N6-метиладенозин и 5-метилцитозин. Полученные последовательности вокруг сайтов метилирования извлекались в виде файла в формате *fasta*. Соответствующие



мотивы идентифицировались в этих последовательностях с помощью программы *MEME* [17] и представлялись в форме лого. Извлеченные программой *MEME* мотивы анализировались в пакете *Tombo* для выяснения позиции метилирования и статистической проверки. Сходные результаты, полученные при использовании разных моделей, расценивались как наиболее вероятные.

Результаты и их обсуждение

Анализ геномов пектобактерий показывает, что гены систем рестрикции-модификации относятся к числу наиболее вариабельных в геноме. Например, секвенированные нами ранее геномы изолированных в Беларуси штаммов *P. atrorepticum* 21A [18] и 36A (коды доступа в базе данных *GenBank* – CP009125 и CP024956), а также *P. versatile* 3-2 и 14A (CP024842 и CP034276) имеют практически полную геновую синтению и среднюю нуклеотидную идентичность (ANI) порядка 99 %, однако очень разные наборы генов рестрикции-модификации. Интересно, что только штамм *P. versatile* 3-2, наиболее устойчивый из этих четырех штаммов к введению чужеродной ДНК, обладал зависящей от метилирования системой рестрикции IV типа. Для оценки вклада такой системы рестрикции в устойчивость к чужеродной ДНК из коллекции штаммов пектобактерий кафедры для анализа генома был отобран еще один локальный изолят 2А, близкий по многим свойствам к штамму *P. versatile* 3-2.

Расшифровка геномной последовательности штамма 2А (депонирована в базе данных *GenBank* с кодом доступа CP066552) выявила одну кольцевую хромосому с длиной, чуть меньшей типичных для пектобактерий 5 млн пар нуклеотидов (п. н.) (табл. 1). Следует отметить высокое качество геномной последовательности, достигнутое благодаря использованию двух технологий секвенирования и большой глубине прочтения ($\times 450$).

Таблица 1

Общая статистика генома *P. carotovorum* 2А

Table 1

General statistics of the *P. carotovorum* 2A genome

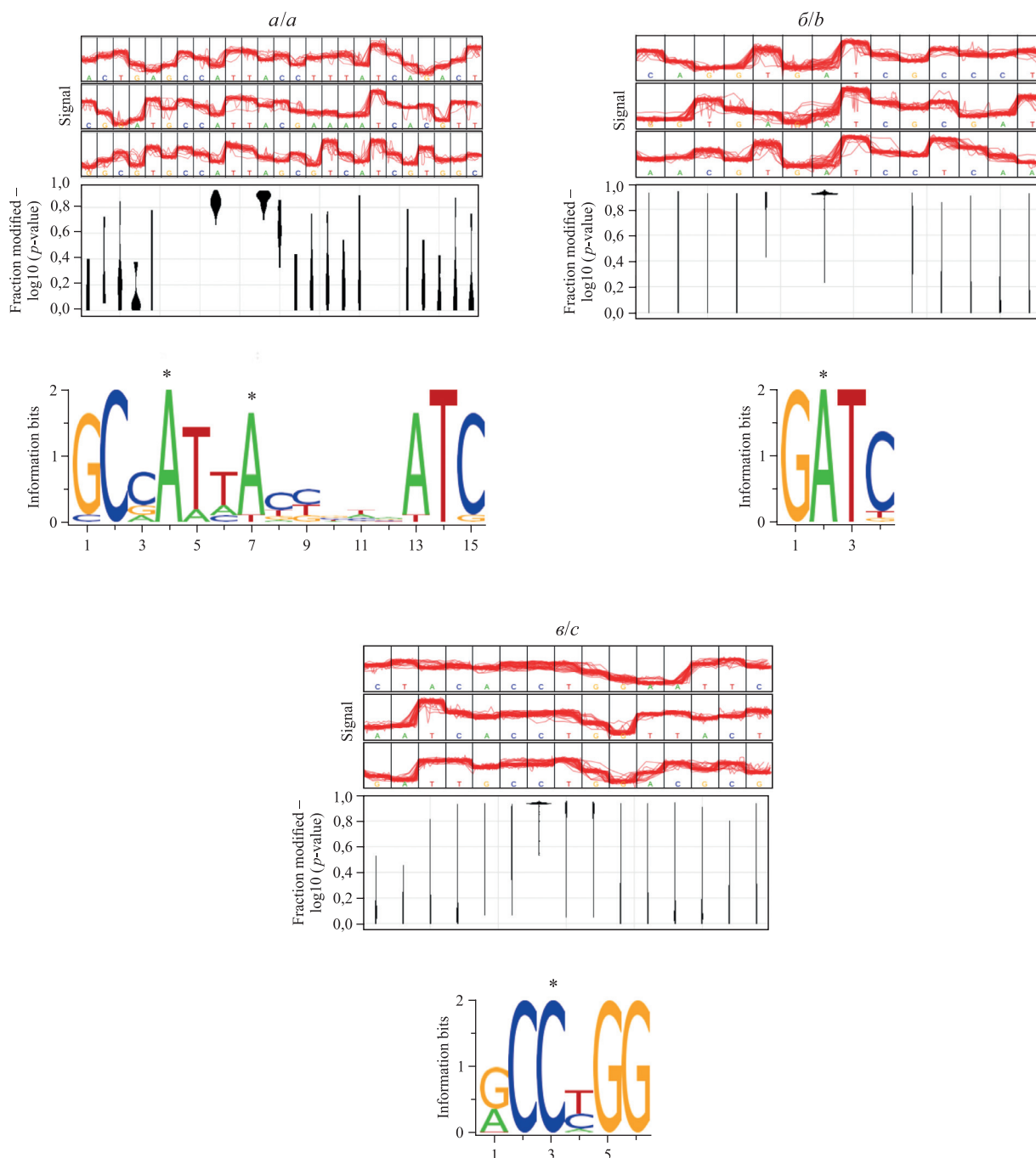
Элемент	Количество в геноме, шт.	Общая длина в геноме, п. н.	Процент от длины генома
Хромосома	1	4 743 928	100,0
Ген	4125	3 995 994	84,23
Открытая рамка считывания	4019	3 956 448	83,40
тРНК	76	5960	0,13
рРНК	22	32 083	0,68
Рибопереключател	7	1018	0,02
Некодирующая РНК	7	1150	0,02
Область повторов	5	6514	0,14
Аттенуатор	5	595	0,01
тмРНК	1	363	0,01

Вопреки ожиданиям, по показателю ANI 95 % штамм 2А оказался достаточно далек от изолятов *P. versatile*. Ближайшим из типовых штаммов является *P. carotovorum* DSM 30168 с ANI 95,6 %, что сегодня тоже считается недостаточным для надежной классификации. Таким образом, несмотря на формальное отнесение классификатором NCBI к виду *P. carotovorum*, штамм 2А занимает обособленное положение среди пектобактерий с секвенированными геномами. Тем не менее в геномной последовательности штамма 2А присутствует полный набор генов системы рестрикции IV типа, гомологичный таковому штамму *P. versatile* 3-2, а также гены еще четырех (полных или частичных) систем рестрикции-модификации (табл. 2).

Довольно большое число прочтений, полученных с помощью технологии Oxford Nanopore, позволило оценить потенциальную возможность использования этих данных для исследования профиля метилирования генома. Выполненный с применением пакета *Tombo* анализ (см. рисунок; табл. 2) выявил для штамма 2А три метилированные последовательности: G(m6A)TC (Dam-метилирование, стандартное для всех бактерий), C(m5C)rGGy (вариант широко распространенного Dcm-метилирования) и GCc(m6A)Tt(m6A)yyNNATC. Последний мотив является уникальным для этого штамма и, скорее



всего, используется полной системой рестрикции I типа (JFY74_02635 – JFY74_02645). Типичный для систем I типа «разделенный» мотив в соответствии с анализом пакета *Tombo* имеет нетипичный характер метилирования: оба метилируемых остатка аденозина расположены в одной половине сайта узнавания. Поиск в базах данных NCBI гомологичных субъединиц специфичности выявил всего восемь частичных гомологов (только одного из двух субстратраспознающих доменов), что подчеркивает уникальность системы рестрикции I типа штамма 2A.



Консенсусные последовательности мишеней метилаз *P. carotovorum* 2A:

a – JFY74_02635 (система типа I); *b* – метилаза Dam (JFY74_19045);

v – JFY74_00755 (система типа II, но с генами системы рестрикции типа IV в опероне).

Метилированные нуклеотиды отмечены звездочками

Consensus sequences of methylase targets of *P. carotovorum* 2A:

a – JFY74_02635 (type I system); *b* – Dam methylase (JFY74_19045);

c – JFY74_00755 (type II system, but in the operon with genes of the type IV restriction system).

Methylated nucleotides are marked with asterisks



Таблица 2

Метилазы систем рестрикции-модификации штамма *P. carotovorum* 2A

Table 2

Methylases of *P. carotovorum* 2A restriction-modification systems

Тип	Идентификатор локуса	Профиль метилирования	Состав оперона
I	JFY74_02635	GCc(m6A)Tt(m6A)yyNNNATC	<i>JFY74_02635, JFY74_02640, JFY74_02645</i>
	JFY74_12810	–	<i>JFY74_12810</i>
II	JFY74_19045	G(m6A)TC	<i>dam</i>
	JFY74_02700	–	<i>JFY74_02700</i>
IV	JFY74_00755	C(m5C)rGGy	<i>JFY74_00750, JFY74_00755, JFY74_00760, JFY74_00765</i>

Еще одна рамка считывания (JFY74_12810) с выраженной гомологией с ДНК-метилазами, скорее всего, неактивна, так как содержит протяженную делецию в центральной части рамки, затрагивающую важные для метилазы функциональные участки.

Интересной является метилаза Dcm-типа, ген которой расположен в одном опероне с генами системы рестрикции, наиболее близкой к IV типу. Поскольку такие рестриктазы распознают метилированную ДНК, наличие в одном опероне с этой рестриктазой метилазы ставит вопрос о ее роли (или роли сцепленной рестриктазы). Сравнение с геномами других пектобактерий выявило четыре штамма с системами данного типа, имеющими существенное сходство на протяжении всего оперона из четырех генов (табл. 3). В целом сходная система штамма *P. versatile* 3-2 имеет радикальные отличия второго гена оперона (метилазы Dcm-типа).

Таблица 3

Процент идентичности нуклеотидной последовательности систем рестрикции IV типа

Table 3

Percentage of the nucleotide sequence identity between type IV restriction systems

Штамм	Штамм				
	<i>P. carotovorum</i> 2A	<i>P. odoriferum</i> JK2.1	<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i> BC1	<i>P. versatile</i> DSM 30169	<i>P. versatile</i> F131
<i>P. carotovorum</i> 2A	100,0	91,65	90,23	89,36	89,35
<i>P. odoriferum</i> JK2.1	91,58	100,0	87,46	92,99	92,98
<i>P. carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i> BC1	90,19	87,44	100,0	88,35	88,33
<i>P. versatile</i> DSM 30169	89,35	92,88	88,73	100,0	99,98
<i>P. versatile</i> F131	89,58	92,97	88,36	99,98	100,0

Примечание. Сравнивались системы IV типа с гомологией по отношению к таковой штамма *P. carotovorum* 2A на протяжении не менее 95 % длины всего оперона.

Заключение

Анализ систем рестрикции-модификации штамма *P. carotovorum* 2A выявил уникальную систему рестрикции-модификации I типа с необычным характером метилирования и без известных близких гомологов, а также редкую комбинацию в одном опероне генов системы рестрикции IV типа с метилазой Dcm-типа. С помощью технологии Oxford Nanopore установлены последовательности, распознаваемые тремя метилазами этого штамма.



В настоящее время стандартом при анализе профилей метилирования является технология Pacific Biosciences (PacBio). В частности, геномный раздел *REBASE* использует только данные этой технологии для определения специфичности метилирования. Однако из 64 штаммов пектобактерий, представленных в *REBASE*, данные PacBio имеются только для одного. Проведенный анализ показывает, что значительно более доступная технология Oxford Nanopore позволяет охарактеризовать профили метилирования бактериального штамма со сложным характером модификации ДНК, а также спланировать эксперименты по преодолению рестрикции для конкретного штамма.

Библиографические ссылки / References

1. Kennaway CK, Taylor JE, Chun Feng Song, Potrzebowski W, Nicholson W, White JH, et al. Structure and operation of the DNA-translocating type I DNA restriction enzymes. *Genes & Development*. 2012;26(1):92–104. DOI: 10.1101/gad.179085.111.
2. Pingoud A, Wilson GG, Wende W. Type II restriction endonucleases – a historical perspective and more. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(12):7489–7527. DOI: 10.1093/nar/gku447.
3. Loenen WAM, Dryden DTF, Raleigh EA, Wilson GG, Murray NE. Highlights of the DNA cutters: a short history of the restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(1):3–19. DOI: 10.1093/nar/gkt990.
4. Loenen WAM, Raleigh EA. The other face of restriction: modification-dependent enzymes. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(1):56–69. DOI: 10.1093/nar/gkt747.
5. Ishikawa K, Fukuda E, Kobayashi I. Conflicts targeting epigenetic systems and their resolution by cell death: novel concepts for methyl-specific and other restriction systems. *DNA Research*. 2010;17(6):325–342. DOI: 10.1093/dnares/dsq027.
6. Lepikhov K, Tchernov A, Zheleznaia L, Matvienko N, Walter J, Trautner TA. Characterization of the type IV restriction modification system BspLU11III from *Bacillus* sp. LU11. *Nucleic Acids Research*. 2001;29(22):4691–4698. DOI: 10.1093/nar/29.22.4691.
7. Gouil Q, Keniry A. Latest techniques to study DNA methylation. *Essays in Biochemistry*. 2019;63(6):639–648. DOI: 10.1042/EBC20190027.
8. Sikolenko M, Valentovich L. Barapost: binning of nucleotide sequences according to taxonomic annotation. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics*. 2020;1–1. DOI: 10.1109/TCBB.2020.3009780.
9. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*. 2012;19(5):455–477. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
10. Kolmogorov M, Yuan J, Yu Lin, Pevzner PA. Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology*. 2019;37(5):540–546. DOI: 10.1038/s41587-019-0072-8.
11. Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One*. 2014;9(11):e112963. DOI: 10.1371/journal.pone.0112963.
12. Tatusova T, DiCuccio M, Badretdin A, Chetvernin V, Nawrocki EP, Zaslavsky L, et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*. 2016;44(14):6614–6624. DOI: 10.1093/nar/gkw569.
13. Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D. REBASE – a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(D1):D298–D299. DOI: 10.1093/nar/gku1046.
14. Boratyn G, Camacho C, Federhen S, Merezhuk Yu, Madden T, Schoch C, et al. MOLE-BLAST a new tool to search and classify multiple sequences [Internet; cited 2021 June 15]. Available from: http://mirror.ufs.ac.za/bblast/documents/moleblast_poster2014.pdf.
15. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(D1):D36–D42. DOI: 10.1093/nar/gks1195.
16. Stoiber M, Quick J, Egan R, Ji Eun Lee, Celniker S, Neely RK, et al. *De novo* identification of DNA modifications enabled by genome-guided nanopore signal processing. *BioRxiv* 094672 [Preprint]. 2016 [cited 2021 June 15]. Available from: <https://doi.org/10.1101/094672>.
17. Bailey TL, Johnson J, Grant CE, Noble WS. The MEME suite. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(Web Server issue):W39–W49. DOI: 10.1093/nar/gkv416.
18. Nikolaichik Ye, Gorshkov V, Gogolev Yu, Valentovich L, Evtushenkov A. Genome sequence of *Pectobacterium atrosepticum* strain 21A. *Genome Announcements*. 2014;2(5):e00935-14. DOI: 10.1128/genomeA.00935-14.

Получена 18.09.2021 / принята 18.10.2021.
Received 18.09.2021 / accepted 18.10.2021.