

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ  
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ОТДЕЛЕНИЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК РАН  
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ИНСТИТУТ ФИТОПАТОЛОГИИ  
МЕЖРЕГИОНАЛЬНАЯ ОБЩЕСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ  
«ОБЩЕСТВО ФИТОПАТОЛОГОВ»

**СОВРЕМЕННЫЕ СИСТЕМЫ И МЕТОДЫ  
ФИТОСАНИТАРНОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ И УПРАВЛЕНИЯ  
ЗАЩИТОЙ РАСТЕНИЙ**

Материалы Международной конференции с элементами научной школы  
для молодых ученых, аспирантов и студентов  
Большие Вяземы, Московской области  
24-27 ноября 2015г.

**PHYTOSANITARY EXPERTISE AND PLANT PROTECTION  
MANAGEMENT: MODERN SYSTEMS AND METHODS**

Proceedings of the International conference with the elements of school  
for young scientists and students  
Bolshie Vyazemy, Moscow region, Russia  
November 24-27, 2015



**Большие Вяземы  
2015**

2. Brian PW, Elson GW, Heming HG and Radley M, An inhibitor of plant growth produced by *Aspergillus wentii* Wehm. *Nature* 207:998–999 (1965).
3. Broadbent D and Radley ME, Some effects of 1-amino-2-nitrocyclopentane-1-carboxylic acid on flowering plants. *Ann Bot* 30:763–777 (1966).
4. Duke, Stephen O.; Dayan, Franck E. (2011). «Modes of Action of Microbially-Produced Phytoalexins». *Toxins (Base)* 3: 1038.
5. Kefford N. P. Some Growth Regulators of Tobacco in Relation to the Symptoms of the Physiological Disease 'Frenching'. *J. Exp. Bot.* (1959) 10 (3): 462–467.
6. McPhail KL, Armstrong DJ, Azevedo MD, Vanowetz GM, Mills DI. 4-Formylaminoxyvinylglycine, an herbicidal germination-arrest factor from *Pseudomonas* rhizosphere bacteria. *J Nat Prod.* 2010 Nov 29;73(11):1853-7.
7. Murakami, Takeshi; Anzai, Hiroyuki; Imai, Satoshi; Satoh, Atsuyuki; Nagaoka, Kozo; Thompson, Charles J. (1986). «The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular cloning and characterization of the gene cluster». *MGG Molecular & General Genetics* 205: 42.
8. Patrick J. Tranel, David R. Gealy and Ann C. Kennedy Inhibition of Downy Brome (*Bromus tectorum*) Root Growth by a Phytotoxin from *Pseudomonas fluorescens* Strain D7 *Weed Technology* Vol. 7, No. 1 (Jan. - Mar., 1993), pp. 134-139
9. Steinberg RA, A 'frenching' response of tobacco seedlings to isoleucine. *Science* 103:329–330 (1946).
10. Steinberg RA, Accumulation of free amino acids as a chemical basis for morphological symptoms in tobacco manifesting frenching and mineral deficiency symptoms. *Plant Physiol* 25:279–288 (1950).
11. Weissmann R, Claes Uggla, Berndt Gerhardson. Field performance of a weed-suppressing *Serratia plymuthica* strain applied with conventional spraying equipment. *BioControl* 2003, Volume 48, Issue 6, pp 725-742
12. Woltz SS and Littrell RH, Production of yellow strapleaf of *Chrysanthemum* and similar diseases with an antimetabolite produced by *Aspergillus wentii* *Phytopathology* 58:1476 (1968).

## КРИТЕРИИ ДОСТОВЕРНОСТИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ФИТОСАНИТАРНОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ.

### ВАЛИДАЦИОННЫЕ ИСПЫТАНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ КОЛЬЦЕВОЙ И БУРОЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ГНИЛЕЙ КАРТОФЕЛЯ

Л.И. Алексеев<sup>1,3</sup>, Е.С. Мазурин<sup>1</sup>, М.Б. Копина<sup>2</sup>, Н.Ю. Минакова<sup>1,3</sup>,  
К.П. Корнев<sup>2</sup>, К.А. Благодатских<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт  
сельскохозяйственной биотехнологии»,

e-mail: iab@iab.ac.ru;

<sup>2</sup>ФГБУ «Всероссийский центр карантин растений»,

e-mail: vniikr@mail.ru;

<sup>3</sup>Закрытое акционерное общество «Синтол»

e-mail: syntol@syntol.ru

## VALIDATION CRITERIA OF MOLECULAR METHODS IN THE PHYTOSANITARY EXAMINATION. VALIDATION STUDIES OF DIAGNOSTIC TEST SYSTEMS FOR IDENTIFICATION OF BACTERIAL RING ROT AND BACTERIAL BROWN ROT OF POTATO

L.I. Alexeev<sup>1,3</sup>, E.S. Mazurin<sup>1</sup>, M.B. Kopina<sup>2</sup>, N.U. Minakova<sup>1,3</sup>,  
K.P. Kornev<sup>2</sup>, K. A. Blagodatskikh<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>FGFNU All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural  
Biotechnology;

<sup>2</sup>FGBU All-Russian Plant Quarantine Center;

<sup>3</sup>ZAO "Syntol"

### Summary

Test systems for identification the most important bacterial diseases of potato (bacterial ring rot of potato and ring rot of potato) were developed. Validation of diagnostic kits was carried out using a representative collection of strains of the target and closely related phytopathogenic bacterial species. The performance parameters determined in this study demonstrated high levels results.

Существующие методы оздоровления картофеля не гарантируют избавления от патогена. Поскольку меристемное оздоровление сосуществует с традиционными технологиями, при размножении оздоровленных растений, ввиду высокого инфекционного фона, не исключено их повторное заражение.

Совершенно очевидно, что для отбора здоровых растений, контроля оздоровления, сертификации посадочного материала и постоянного мониторинга заражения с целью своевременного выявления и ликвидации очагов инфекции, ограничения распространения болезней картофеля и предупреждения эпифитотий необходимо располагать чувствительными методами массовой диагностики [1].

Большой спрос на элитный картофель из зарубежья вызван исключительно высоким качеством закупаемого материала в фитосанитарном отношении, который, однако, не всегда соответствует требованиям РФ и высокими технологическими свойствами.

На официальном сайте Россельхознадзора представлена статистика обнаружения карантинных для РФ вредных организмов, т.к. завозимый картофель постоянно проходит карантинную фитосанитарную экспертизу. Достоверной статистики по отечественному посадочному материалу нет, но это не значит, что наш материал повсеместно здоров. Так, по данным ФГБУ «Россельхозцентр», при проведении клубневого анализа в разные годы зараженность исследуемых образцов отечественного картофеля варьировала в пределах 1,5-2,5%. Однако, результаты совместного исследования РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева и ФГБУ «ВНИИКР» показали совершенно другую картину [2]. Всего было исследовано 832 партии картофеля различного происхождения. Из них:

- 203 партии картофеля зарубежного происхождения (Нидерланды, Германия, Египет, Франция и т.д.), в которых оказалось, что заражена 1 партия семенного картофеля из Германии, что составляет 0,49%.

- 629 партий картофеля отечественного происхождения, в которых возбудитель кольцевой гнили был выявлен в 120 партиях, что составляет 23,8%. Вместе с тем, согласно действующему ГОСТ Р 53136-2008 [3], наличие кольцевой гнили не допускается в оригинальном и элитном семенном картофеле и допускается в очень незначительном количестве (не более 0,5%) в репродукционном семенном картофеле.

Целью нашей работы была разработка и валидация отечественных тест-систем (наборов) для диагностики возбудителей кольцевой гнили картофеля и бурой бактериальной гнили картофеля.

Тест системы были разработаны ФГБНУ «ВНИИСБ» и валидированы на базе ФГБУ «ВНИИКР».

#### Методы и материалы

Для подбора праймеров и зондов использовали программу Primer3 [4]. Для оценки специфичности подобранных праймеров и зондов в программе NCBI BLAST [5] было проведено выравнивание амплифицируемых последовательностей на геномы близкородственных и схожих по патологическим

проявлениям организмов. При проведении лабораторных валидационных испытаний использовано 26 штаммов бактерий – возбудителей различных болезней растений из коллекции ФГБУ «ВНИИКР». ДНК выделяли сорбентным методом с использованием набора M-Sorb (ЗАО «Синтол», Россия). Концентрацию и чистоту выделенной из растительного материала ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 при длине волны 260 нм.

Для испытания аналитической чувствительности в растительном экстракте петлю суточной культуры возбудителя суспензировали в 1000 мкл 0,01 М стерильного PBS-буфера и готовили серию десятикратных разведений, последовательно перенося 100 мкл предыдущего разведения к 900 мкл последующего. Далее в трехкратной повторности проводили посев 100 мкл суспензии из каждого разведения на среду YDC [6] в чашки Петри для подсчета числа колонииобразующих единиц (КОЕ). Из этих же пробирок переносили 100 мкл бактериальной суспензии к 900 мкл экстракта клубней картофеля. В результате получали растительный экстракт с различным содержанием КОЕ патогена.

Стандартная реакционная смесь содержала: 20 мкл реакционной смеси набора «РС Sms-ВПК», 0,5 мкл Taq ДНК-полимеразы, входящей в набор и 5 мкл целевой ДНК возбудителя (20-30 нг/мкл). Окончательный объем смеси составлял 25,5 мкл. ПЦР «в реальном времени» (ПЦР-РВ) проводили на следующих термодилерах: Rotor-Gene (CorbettResearch, Австралия), АНК-32 (Синтол, Россия), iCycler iQ5 (BioRad, США).

#### Критерии достоверности молекулярных методов

Для установления критериев эффективности используемых методов как доказательство их применимости для выявления и идентификации вредных организмов руководствовались Региональным стандартом по фитосанитарным нормам. Стандарт ЕОКЗР РМ 7/98 (1) [7] и ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009 [8].

Валидация (оценка пригодности) - подтверждение посредством представления объективных свидетельств того, что требования, предназначенные для конкретного использования или применения, выполнены.

Критерии эффективности метода определяли как выражаемые в количественном виде значения, показывающие применимость метода для получения надежного результата. Определяли следующие эффективности метода:

1. Аналитическая специфичность – критерий, показывающий способность метода достоверно различать целевой вредный организм от нецелевых вредных организмов.
2. Аналитическая чувствительность – критерий, показывающий минимальное содержание целевого организма в образце (пробе, субстрате) выявляемое методом.
3. Повторяемость – критерий, показывающий стабильность результатов метода при его многократном применении одним лицом, на одном оборудовании и в максимально ограниченное время.

4. Воспроизводимость – критерий, показывающий стабильность результатов метода при его многократном применении различными лицами, на разном оборудовании и в различное время.

#### Результаты и обсуждение

В результате проведенных работ были разработаны несколько вариантов праймерных пар и модифицированных олигонуклеотидов для постановки ПЦР «в реальном времени». При первичном тестировании авторы остановились на двух тест-системах (наборах), показавших наилучшие результаты, которые были названы «Clavibacter michiganensis-PB» и «RALSTONIA SOLANACEARUM-PB». С использованием этих наборов в последующем была проведена процедура валидации.

**Валидация «Clavibacter michiganensis-PB».** Для испытания аналитической специфичности тест-системы использовалась ДНК возбудителей, встречающихся на картофеле – 3 штамма вида *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms 204, MCMS1, CMS6889); 5 штаммов вида *Ralstonia solanacearum* раса 3 биовар 2 (FRs1, MRs1, FRs12, FRs23, FRs24); 5 штаммов *Dickeya* sp. (*Dickeya dianthicola* - 3B1, 3B2, D17; *Dickeya dadanthii* - DFILL, *Dickeya* sp. - D33), а также ДНК нецелевых микроорганизмов – 4 штамма подвида *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (CMM1, CMM2, S 20, S 21), и 6 штаммов возбудителей бактериальных болезней других родов (*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*- Pss1, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*- Xoo1, *Pantoea dispersa*-PD1, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*- Ps.SS1, Ps.SS2; *Xanthomonas fragariae*- XFEN1469). При испытании аналитической специфичности были получены положительные результаты с образцами, где присутствовала ДНК возбудителя кольцевой гнили картофеля. Внесение в реакционную смесь образцов ДНК близкородственного вида *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, а также ДНК возбудителей других родов не дало положительных результатов. Аналитическая чувствительность испытываемых наборов представлена в таблице 1.

Таблица 1.  
Результаты проверки аналитической чувствительности набора «Clavibacter michiganensis-PB»

| Название штамма | Порядок разведения | Концентрация, КОЕ/мл | Ct Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus | Ct внутренний контроль |
|-----------------|--------------------|----------------------|---|------------------------|
| CMS6889         | исходное           | 3×109                | 20,3  | 31,25                  |
| CMS6889         | исходное           | 3×109                | 20,72   | 31,63                  |

| CMS6889              | исходное | 3×109 | 20,19 | 31,31 |
|----------------------|----------|-------|-------|-------|
| CMS6889              | 1        | 3×108 | 23,55 | 31,21 |
| CMS6889              | 1        | 3×108 | 23,7  | 31,69 |
| CMS6889              | 1        | 3×108 | 23,68 | 31,44 |
| CMS6889              | 2        | 3×107 | 27,07 | 32,16 |
| CMS6889              | 2        | 3×107 | 26,88 | 31,6  |
| CMS6889              | 2        | 3×107 | 26,67 | 31,04 |
| CMS6889              | 3        | 3×106 | 30,37 | 31,81 |
| CMS6889              | 3        | 3×106 | 29,86 | 30,24 |
| CMS6889              | 3        | 3×106 | 30,73 | 32,01 |
| CMS6889              | 4        | 3×105 | 33,29 | 32,16 |
| CMS6889              | 4        | 3×105 | 33,63 | 32,15 |
| CMS6889              | 4        | 3×105 | 33,11 | 31,96 |
| CMS6889              | 5        | 3×104 | 35,6  | 32,12 |
| CMS6889              | 5        | 3×104 | 35,13 | 32    |
| CMS6889              | 5        | 3×104 | 35,26 | 32,61 |
| CMS6889              | 6        | 3×103 | 37,87 | 32,25 |
| CMS6889              | 6        | 3×103 | 38,5  | 31,79 |
| CMS6889              | 6        | 3×103 | N/A   | 32,39 |
| CMS6889              | 7        | 3×102 | N/A   | 32,41 |
| CMS6889              | 7        | 3×102 | N/A   | 32,19 |
| CMS6889              | 7        | 3×102 | N/A   | 31,89 |
| CMS6889              | 8        | 3×101 | N/A   | 32,49 |
| CMS6889              | 8        | 3×101 | N/A   | 32,29 |
| CMS6889              | 8        | 3×101 | N/A   | 32,4  |
| Стандартный контроль | -        | -     | N/A   | 31,53 |
| Стандартный контроль | -        | -     | N/A   | 30,73 |
| Стандартный контроль | -        | -     | N/A   | 31,36 |

Нюдами из полученных результатов, можно сделать вывод, что аналитическая чувствительность испытываемого набора реагентов составила не менее 10<sup>9</sup> КОЕ/мл.

Повторяемость тест-системы была протестирована с ДНК, выделенной из суспензий, содержащих растительный экстракт картофеля и три типовых штамма *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* SMS, со средней зараженностью  $3 \times 10^4 - 3 \times 10^5$  КОЕ/мл, в 10-ти кратной повторяемости.

Повторяемость результатов исследований, полученных с помощью набора реагентов «*Clavibacter michiganensis*-PB» составила 100%.

Для испытания воспроизводимости работа проводилась аналогично повторяемости, только разными специалистами в разные дни, на разном оборудовании. Аналитическая воспроизводимость результатов исследования полученных с помощью набора реагентов «*Clavibacter michiganensis*-PB» составила 100%.

**Валидация «RALSTONIA SOLANACEARUM-PB».** Для испытания аналитической специфичности использовалась ДНК возбудителей, встречающихся на картофеле – 7 штаммов вида *Ralstonia solanacearum* раса 3 биовар 2 (FRs5, FRs 12, FRs21, FRs 22, FRs 23, FRs24, FRs34); 2 штамма вида *Ralstonia solanacearum* 1 филотип, раса 1 (FRs1-1, FRs1-2); 5 штаммов *Dickeya* sp. (*Dickeya dianthicola*- 3B1, 3B2, D17; *Dickeya dadanithii* - DFILL, *Dickeya* sp.- D33); 3 штамма подвида *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms 204, MCMS1, CMS6889), а также ДНК нецелевых микроорганизмов – 2 штамма подвида *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (CMM1, CMM2) и 6 штаммов возбудителей бактериальных болезней других родов (*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*- Pss1, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*- Xoo1, *Pantoea dispersa* - PD1, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*- Ps.SS1, Ps.SS2; *Xanthomonas fragariae*- XFN 1469). При испытании аналитической специфичности были получены положительные результаты с образцами, где присутствовал ДНК возбудителя бурой гнили картофеля. Внесение в реакционную смесь образцов ДНК других бактериальных патогенов картофеля, а также ДНК представителей других родов не дало положительного результата.

Аналитическая чувствительность испытуемых наборов представлена в таблице 2.

Таблица 2.

Результаты проверки аналитической чувствительности набора «RALSTONIA SOLANACEARUM-PB»

| Название штамма | Порядок разведения | Концентрация, КОЕ/мл | Сt <i>Ralstonia solanacearum</i> | Сt внутренний контроль |
|-----------------|--------------------|----------------------|----------------------------------|------------------------|
| FRs11           | Исходное           | 5×108                | 17.76                            | 32.53                  |
| FRs11           | Исходное           | 5×108                | 17.51                            | 32.59                  |
| FRs11           | Исходное           | 5×108                | 17.67                            | 32.77                  |
| FRs11           | 1                  | 5×107                | 20.76                            | 32.34                  |

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что аналитическая чувствительность испытуемого набора реагентов составила не менее  $3 \times 10^5$  КОЕ/мл.

Повторяемость наборов реагентов была протестирована с ДНК, выделенной из суспензий, содержащих растительный экстракт картофеля и три типо-

|                       |   |       |        |        |
|-----------------------|---|-------|--------|--------|
| FRs11                 | 1 | 5×107 | 21.18  | 32.36  |
| FRs11                 | 1 | 5×107 | 21.34  | 31.90  |
| FRs11                 | 2 | 5×106 | 24.78  | 32.46  |
| FRs11                 | 2 | 5×106 | 24.36  | 32.37  |
| FRs11                 | 2 | 5×106 | 24.16  | 32.25  |
| FRs11                 | 3 | 5×105 | 27.21  | 32.12  |
| FRs11                 | 3 | 5×105 | 27.29  | 32.01  |
| FRs11                 | 3 | 5×105 | 27.62  | 32.35  |
| FRs11                 | 4 | 5×104 | 31-Oct | 32.46  |
| FRs11                 | 4 | 5×104 | 31.28  | 32.77  |
| FRs11                 | 4 | 5×104 | 30.35  | 32.43  |
| FRs11                 | 5 | 5×103 | 33.76  | 32.37  |
| FRs11                 | 5 | 5×103 | 34.58  | 32.78  |
| FRs11                 | 5 | 5×103 | 34.98  | 32.45  |
| FRs11                 | 6 | 5×102 | N/A    | 32.89  |
| FRs11                 | 6 | 5×102 | N/A    | 31.99  |
| FRs11                 | 6 | 5×102 | 38.25  | 32.67  |
| FRs11                 | 7 | 5×101 | N/A    | 32.45  |
| FRs11                 | 7 | 5×101 | N/A    | 32.26  |
| FRs11                 | 7 | 5×101 | N/A    | 29-Mar |
| FRs11                 | 8 | 5×100 | N/A    | 32.17  |
| FRs11                 | 8 | 5×100 | N/A    | 32.91  |
| FRs11                 | 8 | 5×100 | N/A    | 32.34  |
| Оригинальный контроль | - | -     | N/A    | 31.68  |
| Оригинальный контроль | - | -     | N/A    | 31.68  |
| Оригинальный контроль | - | -     | N/A    | 31.88  |

вых штамма *Ralstonia solanacearum* FRs12, FRs23, FRs24 соответственно, со средней зараженностью  $5 \times 10^4 - 5 \times 10^5$  КОЕ/мл, в 10-ти кратной повторности.

Повторяемость результатов исследований, полученных с помощью набора реагентов «RALSTONIA SOLANACEARUM-PB» составляла 100%.

Для испытания воспроизводимости тест-системы были протестированы с 3-мя типовыми штаммами *Ralstonia solanacearum* (FRs12, FRs23, FRs24), средней зараженности, в 10-ти кратной повторности. Работа проводилась разными специалистами в разные дни, на разном оборудовании.

Аналитическая воспроизводимость результатов исследования полученных с помощью набора реагентов «RALSTONIA SOLANACEARUM-PB» составила 100%.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В серии проведенных экспериментов были испытаны две тест-системы для диагностики возбудителей бактериозов картофеля. По всем показателям валидации наборы показали лучшие характеристики и могут быть использованы при проведении фитосанитарной экспертизы.

Считаем, что все коммерческие тест-системы фитопатогенов растений, и том числе зарубежные, должны сопровождаться проведением процедуры валидации с предоставлением отчета потенциальным пользователям.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение №14.579.21.0012 от 05 июня 2014 года) с использованием научного оборудования Центра коллективного пользования ВНИИСБ «Биотехнология».

## ЛИТЕРАТУРА

- 1 ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»; введен впервые 2011-04-04. – Минск: Стандартинформ, 2010. – 70 с.
- 2 ГОСТ Р 53136-2008 «Картофель семенной. Технические условия», введен впервые 2008-07-13. – М.: Стандартинформ, 2010. – 13с.
- 3 Кольцевая гниль – угроза картофелеводству России [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://vniikr.ru/main/news,свободный>.
- 4 Чирков С.Н. Иммунохимическая и молекулярная диагностика вирусных инфекций растений: диссертация доктора биологических наук /С.Н. Чирков. – Автореферат диссертации на соискание ученой степени, М., 1985. – 2009. – 51с.
- 5 European and Mediterranean Plant Protection Organization. PM 7/98 (2) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity, 2014. – 31 P.

6 Elliott R.A. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants / R.A. Elliott, D.E. Stead. – Oxford etc.: Blackweel sci. publ., 1987. – 216 P.

7 National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov,свободный>.

8 Untergrasser A. Primer3 - new capabilities and interfaces / Untergrasser A., Antonache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. // Nucleic Acids Research. – 2002. – V.40/ - №15. – e115P.