

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ – МСХА
ИМЕНИ К. А. ТИМИРЯЗЕВА»

На правах рукописи

Тараканов Рашит Ислямович

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОГО
ОЖОГА И РЖАВО-БУРОЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЯТНИСТОСТИ СОИ И
МЕРЫ ЗАЩИТЫ**

Шифр и наименование научной специальности: 4.1.3. Агрехимия,
агрочвоведение, защита и карантин растений

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Джалилов Февзи Сеид-Умерович

Москва – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Комплекс бактериальных патогенов, поражающих сою	14
1.2. Вредоносность и распространённость бактериального ожога сои	14
1.3. Систематическое положение и биологические особенности возбудителя бактериального ожога сои	17
1.4. Симптомы и особенности патогенеза бактериального ожога сои	19
1.5. Расовый состав популяции бактериального ожога сои и селекция на устойчивость	21
1.6. Диагностика бактериального ожога сои	23
1.7. Вредоносность и распространённость ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания сои	25
1.8. Систематическое положение и биологические особенности ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания сои	27
1.9. Симптоматика и особенности патогенеза ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания	30
1.10. Диагностика ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания сои	33
1.11. Методы защиты сои от бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости	36
1.12. Альтернативные способы борьбы с бактериальными болезнями сои	41
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	47
2.1. Оценка разнообразия штаммов <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	47
2.2. Оценка разнообразия штаммов <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	50
2.3. Оценка вредоносности бактериальных болезней сои при искусственном заражении в условиях Московской области	55
2.4. Оптимизация этапов лабораторного анализа семян сои на выявление фитопатогенных бактерий (на примере возбудителя бактериального ожога сои)	56
2.5. Разработка мультиплексной ПЦР в реальном времени для диагностики возбудителей бактериозов в семенах сои	58
2.6. Оценка устойчивости сортов сои к бактериальным болезням	63
2.7. Использование бактериофагов в защите сои от бактериального ожога сои	65
2.8. Использование фагов в защите сои от ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания	70

2.9. Использование веществ растительного происхождения в защите сои от бактериальных болезней	73
2.10. Использование обогащенных медью наночастиц хитозана для борьбы с бактериальными болезнями сои	80
2.11. Скрининг фунгицидов для борьбы с бактериальными болезнями на сое	85
2.12. Статистический анализ и визуализация данных	86
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	87
3.1. Разнообразие штаммов <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	87
3.2. Разнообразие штаммов <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	94
3.3. Оценка вредоносности бактериальных болезней сои при искусственном заражении в условиях Московской области	104
3.4. Оптимизация этапов лабораторного анализа семян сои на выявление фитопатогенных бактерий (на примере возбудителя бактериального ожога сои)	106
3.5. Разработка мультиплексной ПЦР в реальном времени для диагностики возбудителей бактериозов в семенах сои	110
3.6. Оценка устойчивости сортов сои к бактериальным болезням	120
3.7. Использование фагов в защите сои от бактериального ожога сои	127
3.8. Использование фагов в защиты сои от ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания	133
3.9. Использование веществ растительного происхождения в защите сои от бактериальных болезней	140
3.10. Использование обогащенных медью наночастиц хитозана для борьбы с бактериальными болезнями сои	152
3.11. Скрининг фунгицидов для борьбы с бактериальными болезнями на сое	164
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	171
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	174
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	176
ПРИЛОЖЕНИЯ	212
Приложение А	212
Приложение Б	212
Приложение В	214
Приложение Г	215
Приложение Д	217

Приложение Е	219
Приложение Ж	221
Приложение З	224
Приложение И	226
Приложение К	228
Приложение Л	230
Приложение М	231

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. С увеличением производства богатых углеводами культур (зерновых, крупяных, сахарной свёклы), в мире стал острее ощущаться дефицит белка, для преодоления которого необходимо наращивать производство высокобелковых культур, к которым относятся бобовые культуры. Среди них выгодно отличается соя культурная (*Glycine max* (L.) Merr.), благодаря возможности использования ее, как источника дешевого растительного белка и масла, сбалансированному аминокислотному составу, высокой биодоступности и низкой стоимости (Prado et al., 2022). Культура является первым по величине источником растительного белка в мире и вторым - масла (Zhang et al., 2021). Производство сои, как важнейшего источника растительного белка для питания человека и сельскохозяйственных животных решает глобальную задачу продовольственной безопасности.

В 2020 году в мире было собрано 353,5 млн тонн семян сои с 126,9 млн га при средней урожайности культуры 27,8 ц/га (FAO, 2021). В мировом производстве 1-е место принадлежит Бразилии – 36,9 млн га (30 % площади в мире), второе – США – 30,4 млн га (25 %), третье – Аргентине – 17,5 млн га (14 %) (Sinegovskaya et al., 2021). В России ежегодно площади, занятые культурой, увеличиваются в среднем на 8-12%. В 2022 году в стране сою выращивали на площади 3,5 млн га (рост площади составил 13% по сравнению с 2021 годом) и собрали 5,4 млн тонн при средней урожайности 15,4 ц/га (ЕМИСС, 2022). Урожайность культуры в нашей стране сильно отстает от среднемировых показателей. Связано это со многими факторами, в первую очередь конкуренцией культуры с сорной растительностью и неблагоприятным действием вредителей и болезней. Экономически значимые заболевания сои вызывают более 45 видов грибов и оомицетов, 15 видов вирусов и 6 видов фитопатогенных бактерий (<https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Soybean.aspx>, дата обращения 21 февраля 2024 года).

Из болезней бактериальной этиологии сои наиболее вредоносными являются бактериальный ожог (возбудитель – *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Coerper,

1919) Gardan et al., 1992 (далее по тексту – Psg)) и ржаво-бурая бактериальная пятнистость (возбудитель – *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (H.) Collins & Jones, 1922, далее по тексту - Cff). Бактериальный ожог распространен во всех зонах возделывания сои, в том числе в РФ, и способен снижать качество и урожайность её зерна до 40% (Jagtap et al., 2012). Возбудитель ржаво-бурой бактериальной пятнистости, помимо листьев, способен поражать и сосудистую систему и может встречаться на ряде других видов растений семейства Бобовые (Soares et al., 2013). Основным источником инфекции при вышеназванных бактериальных болезнях сои являются семена, в связи с чем актуальна разработка систем ранней диагностики патогенов.

Существующие системы фитосанитарной оценки семян сои основаны на фенотипических (инкубация во влажной камере и визуальная оценка зараженности), микробиологических (культивирование на селективных питательных средах), серологических (иммуноферментная диагностика) и молекулярно-генетических (классическая ПЦР) методах (Hosseini et al., 2023). Однако, использование первых трёх методов может приводить к ошибкам диагностики, в т.ч. из-за низкой чувствительности и фитопатологической конвергенции разных болезней сои) (Ahangaran et al., 2006). Существующие протоколы ПЦР не отвечают современным требованиям диагностики, так как были разработаны достаточно давно, и не учитывают филогенетических реклассификаций бактерий, произошедших за это время (Gardan et al., 1999). Таким образом, требуется создание тест-системы на основе ПЦР в реальном времени, отвечающей современным требованиям фитосанитарной экспертизы и позволяющей сэкономить ресурсы за счет одновременной диагностики двух патогенов.

Помимо этого, не выяснены ряд биологических особенностей патогенов. К примеру, нет информации о штаммовом составе патогенов, их вирулентности и расовой дифференциации (в случае с Psg) в России. В случае с Cff также неясным остаётся штаммовое разнообразие патогена и его агрессивность на сое и фасоли,

нет информации о и возможной устойчивости штаммов к применяемым фунгицидам.

К мерам борьбы с данными патогенами относят тщательную обработку почвы с заделкой растительных остатков (Araele et al., 1990), использование устойчивых или малопоражаемых сортов, обработку семян и вегетирующих растений фунгицидами (Курилова, 2021). Наиболее выгодным является использование устойчивых к бактериозам сортов сои, однако практически метод пока неприменим в нашей стране, так как мало информации об уровне устойчивости сортов. В России разрешено применение фунгицидов на основе тирама для обработки семян и биопрепаратов на основе *Bacillus subtilis* – для обработки растений в период вегетации (Государственный каталог, 2023). Однако, тирам высокотоксичен для млекопитающих и человека (Cui et al., 2019), а эффективность обработки бактериями-антагонистами нестабильна и подвержена сильному влиянию климатических условий и других факторов. Список разрешённых пестицидов для борьбы с бактериозами сои крайне скуден, и требуется проведение исследований для выявления антибактериального действия других фунгицидов.

В связи с необходимостью поиска мер по снижению пестицидного стресса в растениеводстве и с принятием Федерального закона "Об органической продукции и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации" от 03.08.2018 N 280-ФЗ, необходима разработка альтернативных малоопасных экологичных средств защиты сои от бактериальных болезней (Долженко, 2018). В данном контексте биологическое обоснование использования бактериофагов, веществ растительного происхождения и наночастиц хитозана в комплексах с медью в борьбе с бактериозами является актуальной задачей.

Степень разработанности темы. К настоящему времени исследователями накоплены знания по некоторым биологическим свойствам бактериальных патогенов сои и мерам борьбы с бактериозами (Лазарев и др. 2017; Osdaghi et al., 2020; Tegli et al., 2002; Abo-Moch et al., 1995; Alvarez et al., 1995; Gardan et al., 1992; Guimaraes et al., 2003; Harveson et al., 2007; Maringoni et al., 2006 и др.). В частности,

изучены распространённость, вредоносность, биохимические свойства возбудителей, круг растений-хозяев, расовый состав (в ряде стран), генетические свойства, разработаны методы диагностики, и дана оценка некоторым мерам и средствам борьбы с этими болезнями.

Рядом исследователей показано, что использование бактериофагов, веществ растительного происхождения и наночастиц хитозана в комплексах с медью и некоторых фунгицидов, является перспективным в борьбе с бактериальными болезнями растений (Buttimer et al., 2017; Svircev et al., 2018; Jagtap et al., 2012). Однако полномасштабных исследований по характеристике, оценке антибактериального действия данных средств и тестирования эффективности их применения в отношении бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости сои не проводилось.

Цель и задачи.

Целью исследований является уточнение биологических свойств возбудителей бактериального ожога, ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания и усовершенствование приёмов защиты сои от них.

Для достижения этой цели решали следующие **задачи**:

1. Охарактеризовать штаммы возбудителей бактериозов и оценить устойчивость сортов сои к ним.
2. Разработать мультиплексную систему диагностики возбудителей бактериальных болезней сои методом ПЦР-РВ.
3. Оценить антибактериальное действие и биологическую эффективность применения бактериофагов, антимикробных веществ растительного происхождения, наночастиц хитозана в комплексах с медью, и химических фунгицидов в отношении бактериозов сои.

Научная новизна. Впервые проведена характеристика биологических свойств штаммов возбудителей бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания сои, выделенных на территории России. Для штаммов Psg показана низкая степень генетического полиморфизма, для Cff – высокая. Показано, что все штаммы Psg относились к расе 4, доминирующей во

всём мире. Анализ восприимчивости штаммов Cff показал, что штаммы, выделенные с сои, были генетически близки к штаммам из сорных растений, что может указывать на их возможную роль как дополнительного источника инфекции.

Впервые разработана мультиплексная система на основе метода ПЦР-РВ для одновременной диагностики Psg и Cff в семенах сои.

Впервые выявлено антибактериальное действие и оценена эффективность применения на искусственном инфекционном фоне бактериофагов Psg и Cff.

Впервые проведено тестирование антибактериальной активности веществ растительного происхождения (19 эфирных масел и 19 растительных экстрактов) в отношении Psg и Cff и показана эффективность их применения на искусственном инфекционном фоне болезней.

Проведено тестирование реакции сортов сои на заражение штаммами Psg и Cff и показана их сильная дифференциация по восприимчивости.

Показана высокая антибактериальная активность нового класса действующих веществ фунгицидов (четвертичные аммониевые соединения) в отношении возбудителей бактериозов сои.

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведена характеристика штаммов Psg и Cff, выделенных на территории РФ по ряду биологических признаков. Протестированы методы инокуляции и выявлены сорта сои, проявляющие устойчивость или реакцию сверхчувствительности при искусственном заражении возбудителями бактериозов. Разработан метод диагностики семян сои на основе мультиплексной ПЦР-РВ и показана его высокая эффективность при фитосанитарном анализе. Показана перспективность применения бактериофагов, растительных экстрактов и эфирных масел, комплекса наночастиц хитозана и меди и некоторых фунгицидов в защите сои от Psg и Cff.

Методология и методы диссертационного исследования. Диссертационная работа выполнена с использованием современного оборудования и методик, разработанных ведущими учеными в этой области исследований: А. М. Лазаревым, Е. Osdaghi, S. Tegli, L. Gardan, P.M. Guimaraes, A.C. Maringoni, E.B.

Матвеевой, А.Н. Игнатовым, Ф.С.-У. Джалиловым и другими. Более подробное описание представлено в разделе «Материалы и методы исследований».

Положения, выносимые на защиту:

1. Разнообразие штаммов-возбудителей бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания сои, выделенных на территории РФ.
2. Система мультиплексной диагностики методом ПЦР-РВ, рекомендуемая для анализа образцов семян сои на зараженность Psg и Cff.
3. Устойчивость некоторых сортов сои к бактериальным болезням.
4. Бактериофаги, растительные экстракты и эфирные масла, комплекс наночастиц хитозана и меди и некоторые фунгициды снижают заражённость сои бактериальным ожогом и ржаво-бурой бактериальной пятнистостью и увяданием.

Степень достоверности и апробация результатов. Работа выполнена с использованием современного оборудования и методик. Результаты всех экспериментов подвергнуты статистической обработке методом дисперсионного анализа. Результаты исследования были представлены на Международной научной конференции «Агробиотехнология-2021» (24–25 ноября 2021 г., Москва), Международной научно-практической конференции «Innovative technologies in agriculture» (23–24 марта 2022 г., Орёл) и Международной научно-практической конференции «Аграрная наука – 2023» (AgriScience2023) (25-26 апреля 2023 г. Москва) и на заключительном (федеральном) этапе Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых учёных вузов Министерства сельского хозяйства РФ (18 –19 мая 2023 г., Краснодар).

Работа стала призёром в номинации «Аспиранты и молодые ученые» заключительного (федерального) этапа Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых учёных вузов Министерства сельского хозяйства РФ (Краснодар, 18 –19 мая 2023 г.) и награждена золотой медалью в конкурсе «За достижения в области инноваций в АПК» в номинации «За достижения в области сельскохозяйственной науки» в рамках мероприятий деловой программы 32-ой международной агропромышленной

выставки-ярмарки «АГРОРУСЬ – 2023» (Санкт-Петербург, 30 августа – 1 сентября 2023 г.).

Результаты исследования используются при фитосанитарной диагностике семян и производстве зерна сои в ООО «Нива Черноземья», ООО «Сингента» и в учебном процессе при подготовке студентов направления «Агрономия» в ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева».

По материалам диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 2 – в изданиях, включенных в перечень журналов, рекомендованных ВАК РФ, 9 – в изданиях входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования (из них 7 – в журналах Q1-Q2 Scopus и Web of Science) и 2 - свидетельства о государственной регистрации баз данных.

Структура и объем работы. Диссертация включает введение, 3 главы, заключение, список литературы из 327 наименований и приложения на 19 страницах. Объем диссертации - 231 страница, содержит 19 таблиц и 53 рисунка.

Личный вклад соискателя. Диссертационное исследование выполнено автором в процессе обучения в аспирантуре и работы на кафедре защиты растений в ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева». Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении лабораторных, вегетационных и полевых экспериментов, анализе и обобщении результатов исследований, представленных в диссертации. Часть исследований выполнена совместно с сотрудниками ФГБУН «Институт биоорганической химии» им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, «Институт микробиологии» им. С.Н. Виноградского РАН, ГК «Союзснаб» и ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность и глубокую признательность за неоценимую помощь, оказанное содействие, координацию исследований и всестороннюю поддержку при выполнении работы своему научному руководителю – д.б.н., профессору Ф.С.-У. Джалилову; д.б.н., профессору

РУДН им. П. Лумумбы А.Н. Игнатову за методическую помощь и поддержку при проведении исследований, ценные замечания и критический анализ полученных данных. Автор благодарит сотрудников ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН д.х.н., член-корр. РАН Мирошникова К. А., к.б.н. Евсеева П. В., к.б.н. Лукьянову А. А. и Токмакову А. Д. за всестороннюю помощь и поддержку в освоении методик работы с фагами и биоинформатического анализа генетических данных. Отдельная благодарность и признательность автора адресована руководителю лабораторий технической поддержки и развития продуктов ООО «Сингента» к.б.н. Мазурину Е.С.; сотрудникам ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН д.х.н., профессору Варламову В. П., к.б.н. Шагдаровой Б. Ц., к.б.н. Лялиной Т. С. за помощь в освоении методик работы с наночастицами хитозана и всестороннюю поддержку; специалистам ГК «Союзснаб» Вьюшинскому П. А. и Токмачевой М. А. за содействие в идентификации компонентного состава растительных экстрактов и эфирных масел; агроному ботанического сада «ФГАОУ ВО Первый МГМУ» имени И.М. Сеченова к.с.-х.н. Рогачеву Б.Ю. за помощь в идентификации и предоставление образцов лекарственных растений; эксперту АО «ФМРус» к.с.-х.н. Борисову С. Ю. за консультативную поддержку и помощь в получении образцов пораженных растений сои; сотруднику Всероссийской коллекции микроорганизмов (ФГБНУ ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН») к.б.н., Дорофеевой Л.В. за помощь в идентификации бактерий; сотрудникам ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (ВИР), а именно к.б.н., Сеферовой И. В. и д.б.н., профессору Вишняковой М. А. за предоставление образцов сои для расовой дифференциации *P. savastanoi* pv. *glycinea*.

Автор благодарен сотрудникам и студентам кафедры защиты растений и лаборатории защиты растений за помощь и всестороннюю поддержку в проведении исследований, а также своей семье и друзьям за моральную поддержку при выполнении диссертационной работы.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке проектов НЦМУ «Агротехнологии будущего» (в рамках соглашения № 075–15–2022–317 от 20 апреля 2022 г.), Программы развития РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева в рамках Программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030» (приказ №458 от 24.06.2022) и гранта РФФ № 21-16-00047.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Комплекс бактериальных патогенов, поражающих сою

Соя во время вегетации подвержена влиянию множества факторов, способных снизить урожайность. Одним из таких факторов является поражение болезнями.

Среди бактериальных патогенов сои известны бациллёзная гниль семян – возб. *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn., пустульный бактериоз – *Xanthomonas citri* (syn. *axonopodis*) pv. *glycines* (Nakano) Vauterin et al., бактериальная рябуха табака – *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Wolf & Forster) Young et al., бактериальный вилт – *Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith) Yabuuchi et al., ржаво-бурая пятнистость и увядание (вилт) – *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins & Jones и бактериальный ожог – *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Coerper) Gardan et al. (<https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Soybean.aspx>).

Помимо этого, к неосновным возбудителям бактериальных болезней сои относят *Robbsia* (syn. *Burkholderia*) *andropogonis* (E. F. Smith) Gillis et al., *Curtobacterium plantarum* Dunleavy, *Pectobacterium atrosepticum* (van Hall) Dye, *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (Burkholder) Gardan et al., *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall, *Xanthomonas campestris* pv. *cannabis* Severin, и некоторые другие. Данные патогены могут присутствовать как участники патоконплекса и часто выделяются вместе с основными возбудителями при фитопатологической экспертизе (Hartman, 2014; Park et al., 1997). Однако, показано, что наиболее вредоносными и экономически значимыми являются 2 патогена – возбудители бактериального ожога (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*) и ржаво-бурой бактериальной пятнистости (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) (Dunleavy, 1984; Williams et al., 1980).

1.2. Вредоносность и распространённость бактериального ожога сои

Бактериальный ожог сои вызывается видом грамотрицательных бактерий *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (далее по тексту – Psg), относящейся к группе

флуоресцирующих псевдомонад, которые вызывают заболевания у широкого спектра растений-хозяев (Arnold et al., 2011). Патоген впервые был описан Соергер в 1919 году (Соергер 1919).

С того времени возбудитель распространился во всех основных зонах возделывания сои, включая США (Расумбаба, 1987), Россию (Подкина и др., 1980) и еще 37 стран мира (ЕОКЗР; Jagtap et al., 2012; рис. 1).

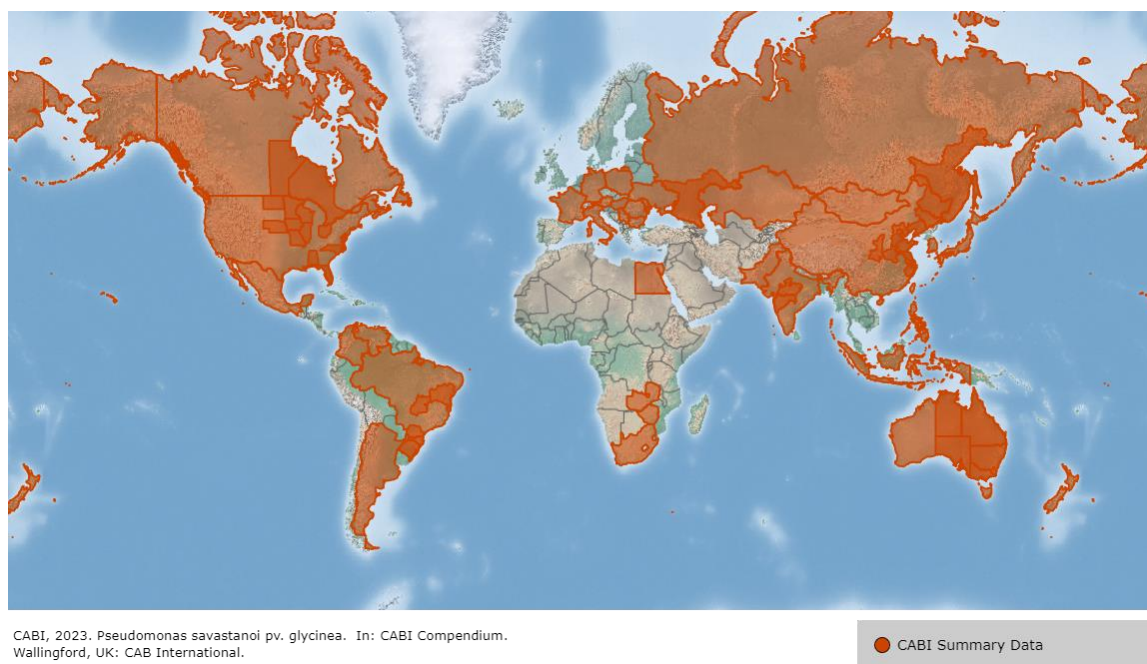


Рисунок 1. Зоны распространения (отмечены красным цветом) бактериального ожога сои *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* в мире (<https://plantwiseplusknowledgebank.org>)

Болезнь, хотя и не привела к тяжелым экономическим потерям в большинстве районов мира из-за устойчивости многих сортов (идентифицировано четыре гена устойчивости), однако часто наблюдаются эпифитотии, наносящие серьезный ущерб. Потери от болезни варьируют от минимальных до 40% и более. Так, Suru Nean Yoo (1977) сообщал о потерях 10% урожая сои при поражении Psg на территории Кореи; Y (1986) показал, что снижение урожайности сои при поражении болезнью в Японии составляли в среднем 4-13% в зависимости от условий года. Частые вспышки болезни наблюдаются в Республике Сербия (Ignjatov et al., 2007). В США Williams and Nyvall, (1980) показали, что заражение сои Psg приводит к снижению площади листьев на 46-62% и снижению

урожайности на 17,9%. При этом интересно, что совместное заражение Psg и возбудителем септориоза (*Septoria glycines*) не приводило к синергизму патогенов. Kennedy и Alcorn (1980) сообщили о том, что потери от болезни составляли 54,5 миллионов долларов США за каждый из 1975, 1976 и 1977 годов в штате Айова, США. В штате Иллинойс, США показано снижение урожайности и массы 300 семян от 5 до 15% и 5,4-7,6 % соответственно, в зависимости от года (Park and Lim, 1986). В Индии болезнь поражает обширные площади сои, при этом самая высокая распространенность на посевах, к примеру, в 2009-2010 гг. варьировала от 7 до 23% в зависимости от региона страны (Jagtap et.al., 2012). Терещенко с соавторами (1977) показали, что бактериальный ожог сои широко распространён в Кировоградской области Украинской ССР, вызывая снижение урожайности до 28 процентов, а в Мексике с 2018 года патоген является объектом внутреннего карантина (EPPO, 2023). Показано, что помимо урожайности заражение семян Psg иногда влияет на содержание белка, масла и жирных кислот и снижает всхожесть семян (Nicholson, Sinclair, 1971), создавая таким образом проблемы для семеноводства.

В России традиционно болезнь обнаруживается повсеместно, где возделывается соя, однако основные очаги проявления болезни сконцентрированы на Дальнем Востоке, в Поволжье и южных регионах. В частности, известны случаи сильной вредоносности болезни в Приморском, Краснодарском, Ставропольском краях с поражением более 40% растений (в отдельные годы 70-100%) и снижением урожая более 25%) (Никитина и др., 1962; Матвеева и др., 1966; Солотчина и др., 1966; Лазарев и др. 2017).

По данным Саенко (2019) распространенность бактериоза сои достигала 21% в период с 2011 по 2018 гг. При этом было отмечено, что массовое проявление симптомов происходило в годы с высокой температурой и малым количеством осадков. В Сибири распространенность бактериальных болезней достигает до 66 % в зависимости от сорта (Заостровных и др., 2018). Согласно исследованиям Саенко и Мустафиной (2021) распространенность бактериального ожога на сое достигала 50% на сортах отечественной селекции в Воронежской области, 10% в

Белгородской, 3-10% в Курской, и 20% в Тамбовской области в период с 2018 по 2020 гг. В Хабаровском крае в период с 2012 по 2014 гг. средневзвешенный процент заражения растений составлял 9,2%, а в некоторые годы и на отдельных полях – до 31% (Тишкова и др., 2017).

1.3. Систематическое положение и биологические особенности возбудителя бактериального ожога сои

Царство: Бактерии; тип: *Pseudomonadota*; класс: *Gamma proteobacteria*; порядок: *Pseudomonadales*; семейство: *Pseudomonadaceae*; род: *Pseudomonas*; вид: *savastanoi*; патовар: *glycinea*. Типовым является штамм NCPPB 2411 = CFBR 2214 = ICMP 2189 = LMG 5066.

Синонимы: *Pseudomonas glycinea* (Coerper 1919); *Pseudomonas glycinea* var. *japonica* (Takimoto) Magrou 1937; *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* ((Coerper, 1919) Young et al., 1978).

Первые исследования патогена были проведены А. G. Johnson и F.M. Coerper, которые наблюдали в 1917 году бактериальную болезнь сои в Мэдисоне, (штат Висконсин, США), и выяснили, что возбудитель относился к роду *Pseudomonas* (Johnson, et al., 1917). Патоген впервые был детально описан F.M. Coerper в 1919 году, который назвал возбудителя *Bacterium glycinea* (*Pseudomonas glycinea*) (Coerper, 1919). Takimoto, фитопатолог, обнаруживший этот вид на посевах сои в Японии в 1937, дал название возбудителю *Pseudomonas glycinea* var. *japonica*. Затем в результате систематизации и реклассификации рода *Pseudomonas*, название было пересмотрено как *Pseudomonas syringae* патовариант (далее – pv.) *glycinea* (Young et al., 1978). Совсем недавно *P. syringae* был перегруппирован в девять отдельных геномных подвидов с *P. savastanoi*, включая патовары *phaseolicola*, *savastanoi*, *glycinea* и *tabaci* (Gardan et al., 1992). В 1999 году Gardan et al., использовали ДНК-ДНК гибридизацию и филогенетический анализ на основе рРНК для определения девяти отдельных геномовидов в комплексе *P. syringae*, в результате чего Psg был помещен в геномогруппу 2, наряду с номенклатурным *P. savastanoi* (Gardan et al., 1999). *P. savastanoi*, включающий патовары *phaseolicola*, *savastanoi*, *glycinea* и

tabaci (Gardan et al., 1992), иногда по-прежнему обозначается как *P. syringae* pv. *glycinea*.

Клетки *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* – подвижные палочки с одним полярным жгутиком, размером 1,2-1,5×2,3-3,0 мкм, образуют капсулы и не образуют спор, грамтрицательные, не кислотоустойчивые, аэробы, колонии белые, гладкие, блестящие с флуоресцирующим пигментом, впоследствии темного цвета, слегка створаживают молоко, лакмусовое молоко синее, казеин не пептонизируют, нитраты не редуцируют, желатин не разжижают. На картофеле образуют плоский, слизистый, более или менее тягучий налет, желтого или серебряного цвета. Индол образуют слабо или не образуют вовсе, аммиак выделяют. Хорошо растут на средах Ферми и Ушинского, с флуоресценцией; на растворе Кона рост слабый, без флуоресценции, диастатической активностью не обладают (Mcclung et al., 1985).

Колонии белые, слегка кремоватого цвета, круглые, блестящие, образуют сидерофор пиовердин. Бактерия выделяет леван на леван-индуцирующих средах, не обладает оксидазной, пектолитической и аргининдигидролазной активностью, и приводит к реакции сверхчувствительности на листьях табака.

Особенностью биологии *P. savastanoi* pv. *glycinea* является синтез ею сидерофора пиовердина для извлечения из среды железа. Индукция его образования происходит на средах бедных железом, например, Кинга Б или среды с добавлением azurolo S (CAS) (Payne et al., 1994) в виде диффундирующего в среду и окрашивающего ее при УФ-излучении в синий цвет ореола вокруг бактериальных колоний. Специфический химический состав сидерофоров предложен в качестве диагностического инструмента для дифференциации различных видов и патоваров *Pseudomonas* (Vultreys et al., 2008).

Важным фактором вирулентности патогена является фитотоксин коронатин (coronatine) (Mitchell et al., 1982). Он играет важную роль в индуцировании хлороза и способствует росту численности бактерий и образованию очагов поражения на растении. Помимо коронатина, система секреции третьего типа (T3SS) также играет большую роль в вирулентности Psg. T3SS кодируется кластером генов *hrp* (гиперчувствительного ответа и патогенности) и переносит эффекторы третьего

типа (ТЗЕs) в растительные клетки для подавления иммунитета, участия в патогенезе, усиления симптомов заболевания синтеза веществ, обеспечивающих размножение (Brooks et al., 2005). Psg также продуцирует пектолитические ферменты, которые позволяют патогену проникать и размножаться в живых и мертвых тканях хозяина. Данная физиологическая особенность позволяет Psg использовать гибкую стратегию патогенеза.

Генетические свойства Psg изучены разными методами. Большое число штаммов было охарактеризовано методами ДНК:ДНК-гибридизации (Qi et al., 2011), анализа тандемных повторов с переменным числом множественных локусов (MLVA) (Rahi et al., 2020), ВОХ-ПЦР фингерпринтинга (Marques et al., 2000) и макрорестриктоного анализа (Grothues et al., 1991). По мнению большинства исследователей популяции Psg обладают слабым генетическим полиморфизмом.

1.4. Симптомы и особенности патогенеза бактериального ожога сои

Возбудитель вызывает болезнь «бактериальный ожог» (англ. bacterial blight). Psg поражает все надземные части сои, но характерные симптомы обычно наблюдаются на листьях среднего и верхнего ярусов и на бобах. Растения поражаются бактериями с момента прорастания семян; в первую очередь поражаются края семядолей. Через 5–15 дней после заражения на листьях появляются некротические маслянистые пятна, окруженные хлоротичным ореолом. Обычно эти пятна увеличиваются и сливаются, образуя обширные зоны некроза на листьях (Ignjatov et al., 2007). Пятна бывают разбросаны по листовой пластинке или сгруппированы, что приводит к неправильной форме или большим некротическим поражениям участков листа. При дальнейшем развитии болезни пятна высыхают и выпадают, придавая листу неровный вид, благодаря чему болезнь еще называют «угловатой пятнистостью». Патоген распространяется не только на листья, поражения часто обнаруживаются на стеблях, черешках и бобах. Если заражение прошло на раннем этапе, то болезнь проявляется в виде карликовости и быстрой гибели растений (McGee et al., 1992).

Возбудитель по известным данным поражает только сою культурную (*Glycine max.*), однако известен единственный прецедент заражения олеандра

обыкновенного (*Nerium oleander*) (Kúdela et al., 2005). Патоген также может быть выделен из фасоли луновидной (*Phaseolus lunatus*), обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*), остролистной (*Phaseolus acutifolius*), коровьего гороха (*Vigna unguiculata*), фасоли адзуки (*Vigna angularis*) и пуэрарии дольчатой (*Pueraria lobata*) (Weingart и Völksch, 1997) после искусственной инокуляции. Psg может эпифитно выживать в течение всего вегетационного периода после искусственной инокуляции на сорняках: амаранте запрокинутом (*Amaranthus retroflexus*) и паслене черном (*Solanum nigrum*) (Bogatsevskaja et al., 1990).

Основным источником первичной инфекции возбудителя болезни являются зараженные семена, реже – растительные остатки. Такимото (1921) установил, что Psg способна перезимовывать помимо семян и на больных листьях, оставшихся после уборки. На полях, свободных от выживших бактерий и зараженных растительных остатков, инфицированные семена рассматриваются как основной источник инфекции. Популяция патогена на проростках, происходящая из инфицированных семян, вероятно, увеличивается из-за повреждения семядолей абразивными частицами почвы при прорастании семени. Затем эти популяции становятся важным источником инокулята для заражения листьев, которые развиваются позже. Бактерии выживают в зараженных остатках растений сои на поверхности почвы или в остатках, которые выносятся на поверхность при вспашке (Basu, 1986). Патоген лучше выживает в сухих холодных условиях, чем во влажных и теплых. Известно, что в сухом месте возбудитель может сохраняться до 7 месяцев (Такимото, 1921). В лабораторных условиях по данным Lehman (1929) возбудитель на листьях сохраняется в течение 9 месяцев, но при высокой влажности субстрата погибает через 3 месяца. Распространение в течение сезона происходит с каплями воды во время дождя (McGee et al., 1992). Аэрозоли инокулята могут развиваться в полевых условиях и создавать эпифитные популяции на листьях.

Оптимальное, максимальное и минимальное значение температуры составляет, соответственно, 24 - 26, 35 и 2°C. Термальная точка гибели 48-49°C. Бактерии очень устойчивы к высыханию только внутри растения.

Известно, что кроме моноинфекции, бактерия способна паразитировать на растении одновременно с другими бактериями, давая поражения смешанного типа. В частности, Матвеевой и Острогской (1966) удалось доказать с помощью серологических реакций совместное заражение сои Psg и *Xanthomonas phaseoli* v. *sojense*. Помимо этого, известен прецедент совместного заражения Psg и другого патогена сои *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* в Германии (Sammer et al., 2012). На Филиппинах заселение растений красным паутинным клещом (*Tetranychus telarius*), по-видимому, придавало устойчивость или иммунитет к Psg (Lapis et al., 1972).

1.5. Расовый состав популяции бактериального ожога сои и селекция на устойчивость

Селекция сои на устойчивость к бактериальному ожогу является сложной задачей, поскольку патогену присуща высокая степень изменчивости (Sinclair et al., 1982; Prom et al., 1997). Эта стратегия может быть успешной только тогда, когда известен расовый состав патогена. Расовая дифференциация Psg основывается на реакции растений-дифференциаторов, которыми являются сорта Acme, Chippewa, Flambeau, Harosoy, Lindarin, Merit, Norchief, Hardee, Peking, Centennial (Abo-Moch et al., 1995). На основе изучения взаимодействия штаммов возбудителя бактериального ожога сои с сортами-дифференциаторами Cross с соавторами (1966) описали первые 8 рас патогена. О появлении расы 9 впервые сообщили Fett et al. (1981). К примеру, в Канаде данная раса по распространенности была второй после расы 4 (Gnanamanickam et al., 1982). Штаммы, отличающиеся от расы 5 способностью инфицировать сорт Lindarin, были рекомендованы к классификации как новая раса 10 (Abo-Moch et al., 1995). При этом в мире наиболее распространенной и агрессивной является раса 4, поражающая все сорта из набора дифференциаторов (Fett et al., 1981; Cross et al., 1966; Gnanamanickam et al., 1982; Abo-Moch et al., 1995; Ignjatov et al., 2008). Данная раса является доминирующей в популяции патогена во всех странах, следовательно, усилия по выведению устойчивых к болезни сортов должны быть основаны на устойчивости к расе 4 (Abo-Moch et al., 1995; Kucharek et al., 1985; Thomas et al., 1980). Кроме реакции

растений-дифференциаторов, дополнительным критерием расовой принадлежности является продуцирование коричневого пигмента штаммами, относящимися, к примеру, к расе 2 (Fett et al., 1981).

McGee et al. было продемонстрировано наличие у патогена системы «ген на ген» (McGee, 1992). Различия между штаммами Psg были приписаны предполагаемым генам авирулентности, выявляемым в реакции взаимоотношений «ген-на-ген» между дифференциаторами и изолятами патогена (Keen et al., 1990). Интересно, что штаммы, принадлежащие к расам 0, 1, 2, 3, 5, 7 и 8, не были обнаружены в Европе, возможно, эти расы, не играют роли в заражении сои на этой территории (Abo-Moch et al., 1995). Аналогичные результаты были получены на североамериканском континенте (Gnanamanickam et al., 1982; Fett et al., 1981; Basu, 1984)). Генетический анализ редких рас не привел к пониманию вирулентности наиболее важной и агрессивной расы 4 (Tamaki et al., 1988). Дифференциация популяции патогена на расы привела к трудностям при выведении устойчивых сортов. Случаев выведения сортов с высоким уровнем устойчивости к одной и более расам не описано (McGee, 1992).

Long et al. (1985) выяснили, что реакция сверхчувствительности (СВЧ) и устойчивость сорта к Psg коррелируют с концентрацией глицеоллина, что может указывать на возможность использования его как маркерного признака в селекции на устойчивость.

Первым продуктом гена авирулентности, который был идентифицирован, был фермент, участвующий в синтезе сиринголидов, вызывавший СВЧ у сортов сои с геном устойчивости D, комплементарным гену авирулентности бактерии. Согласно Huynh et al., (1989), штаммы Psg, несущие ген *avrB*, вызывают СВЧ у сортов сои, несущих ген устойчивости *Rpg*.

Область внутри кластера генов Psg *hrp* длиной около 20 kb необходима для проявления патогенности и контролирует экспрессию гена *avrB* (Huynh et al., 1989).

Всего Psg содержит в своем геноме 301 предполагаемый фактор транскрипции, приблизительно 50 из которых отвечают за регуляцию вирулентности (Huang et al., 2022). По данным Ashfield et al., 2003, гены *Rpg1-b* и *Rpg1r* придают

специфическую устойчивость к патогену, экспрессирующему гены *avrB* и *avrRpm1*, соответственно. Farhatullah et al. (2011) по результатам исследований 10 рас и сортов-дифференциаторов, предположили, что существует как минимум 7 *avr*-генов, однако многие из них еще не описаны.

1.6. Диагностика бактериального ожога сои

Диагностика зараженности посевного материала патогеном является наиболее эффективным методом, позволяющим снизить возможный ущерб от болезни. Этот метод позволяет без серьезных издержек предупредить занос инфекции в поле или очагово применить средства защиты растений (СЗР) и тем самым экономить средства на защитных мероприятиях. В полевых условиях для бактериального ожога сои показано, что учет процента зараженных листьев является наиболее благоприятным методом оценки и мониторинга заболевания (Basu, 1986).

Семена являются одним из основных источников инокулюма Psg. При сильном поражении бактерии при помощи воздушных потоков во время дождя могут попадать на формирующиеся бобы и далее в посевной материал (McGee, 1992). Для цели диагностики семенной инфекции Psg используется несколько инструментальных методов, включающих микробиологический анализ, серологический и молекулярно-генетический методы.

В случае микробиологического метода, проводится культивирование экстрактов или гомогенатов пораженных частей на селективных питательных средах, выделение чистой культуры патогена и проверка патогенности на растениях. Данная схема является базовым стандартом при подтверждении наличия патогенных бактерий (Borkar et al., 2018).

В рамках этого метода Nicholson и Sinclair (1971) с коллегами предложили помещать стерилизованные семена на агаровую среду и в дальнейшем выделять чистую культуру. Cross и Kennedy (1964) предложили обнаруживать патоген путем инокуляции проростков суспензией, приготовленной из зараженных измельченных семян. Alvarez с соавторами (1995) измельчали семена, суспендировали в физиологическом растворе и высевали на среду Кинга Б с добавлением 10 мкг/мл

цефалексина (КВС), а патогенность предполагаемых колоний подтверждали по заражению проростков сои и по реакции агглютинации с антисывороткой. Овчинникова с соавторами (1980) предложили различать зараженные и незараженные проростки по водянистым точкам на нижней стороне семядолей при прорастании во влажных условиях. Однако, предложенные методы не позволяли селективно отбирать культуру возбудителя из-за бурного размножения эпифитной микробиоты на семенах.

Mohan с сотрудниками (1987) разработали полуселективную среду КВС (модификация среды Кинга Б) с добавлением борной кислоты, цефалексина, и циклогексимида, которая может быть использована для выделения и других патогенов *Pseudomonas syringae/savastanoi*. Однако, метод рекомендуется применять только при вторичных тестах, когда другим методом уже доказано присутствие бактерий и требуется подтверждение (Geng et al., 1983). Поэтому методы, связанные с выделением чистой культуры патогена и названные выше не пригодны для первичной высокочувствительной и быстрой диагностики патогенов в семенах.

Известен ряд биохимических тестов, способных в совокупности определить патоген до вида. К ним относятся реакция по Граму, образование оксидазы и каталазы, образование аргининдигидролазы, пектолитическая активность на картофеле, окислительно-ферментативный (О/Ф) тест, анализ на продуцирование левана, образование кислот из углеводов, разжижение желатина, гидролиз эскулина и крахмала и редукция нитратов (Lelliott et al., 1966). Среди наиболее известных биохимических критериев часто выделяют профиль по LOPAT (где LOPAT - серия определяющих тестов: L - выработка левана; O - выработка оксидазы; P - пектинолитическая активность; A - выработка аргининдигидролазы; и T - сверхчувствительность на растениях табака) (Sato et al., 1997; Lelliott et al., 1966). В этой связи патоген часто идентифицировали путем посева стерилизованных поверхностно частей растений на среду Кинга Б с последующей идентификацией колоний по флуоресценции в ультрафиолете и тестам LOPAT (+, -, -, +) (Lelliott et al., 1966).

Другой группой инструментальных методов являются серологические. Для диагностики Psg в работе (Suryadi et al., 2006) описана система на основе метода NCM-ELISA (иммуноферментный тест с использованием нитроцеллюлозных мембран), позволяющая диагностировать патоген в пробе растений при его концентрации свыше 10^4 КОЕ/мл. Calzolari с соавторами (1990) предложили использовать реакцию агглютинации для подтверждения присутствия патогена. На основе этой реакции компания NEOGEN Europe Ltd., Scotland, UK выпускает экспресс-тест на агглютинацию с коммерческими антителами к Psg. По мнению Ignjatov с сотрудниками (2007), система, хоть и обладает низкой разрешающей способностью, однако является простой и быстрой, что важно для экспресс-диагностики патогена в полевых условиях.

И наконец, существуют системы анализа с использованием метода ПЦР. Тест-система, предложенная S. Bereswill (Bereswill et al., 1994) для амплификации, использует участок гена коронафакат-лигазы *cfl*, кодирующий биосинтез коронатина. Ввиду того, что данный фитотоксин является одним из факторов вирулентности видов *Pseudomonas syringae/savastanoi*, то использование кодирующего его синтез гена непригодно для дифференциации разных патоваров видов *Pseudomonas syringae/savastanoi*. Sato с соавторами (1997) предложили использовать в качестве таргетного ген, кодирующий синтез этилена (*efe*). Помимо Psg, данная система положительно реагирует с *Pseudomonas cannabina pv. cannabina*, *P. savastanoi pv. phaseolicola*, *P. syringae pv. sesame* и рядом других близких патоваров (Palacio-Bielsa et al., 2009). Космид pSAY1 был предложен как эффективный зонд для выявления генов синтеза коронатина, для штаммов патогена, продуцирующих его (Ullrich et al., 1993). Однако, как оказалось в популяции патогена, могут циркулировать и штаммы, которые не продуцируют коронатин (Moriwaki et al., 1996).

1.7. Вредоносность и распространенность ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания сои

Ржаво-бурая бактериальная пятнистость и увядание сои вызывается видом грамположительных бактерий *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (далее по тексту – Cff), поражающей широкий круг растений (Osdaghi et al., 2015b).

Патоген впервые был описан Hedges в 1922 году в США на фасоли обыкновенной (Hedges, 1922). С тех пор патоген распространился в Канаде, (Patrick et al., 1954), Иране (Osdaghi et al., 2015a) и ряде других стран. Cff включен ЕОКЗР в список карантинных патогенов А2 (высокого риска), следовательно, он находится под строгим карантинным контролем при производстве зернобобовых в ряде стран (EPPO, 2011; рис. 2).

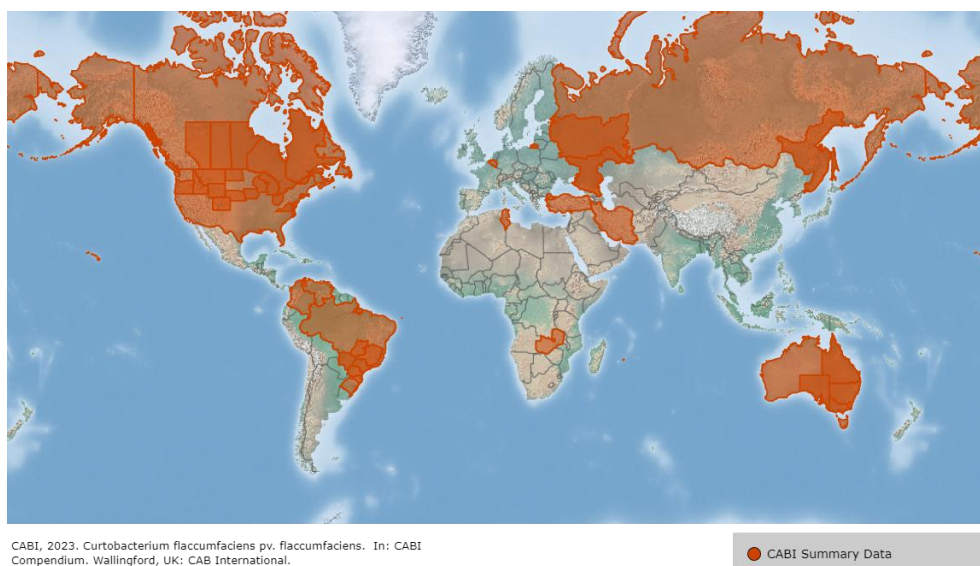


Рисунок 2. Зоны распространения (отмечены красным цветом) возбудителя ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания сои *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* в мире (<https://www.cabidigitallibrary.org/>)

После первого сообщения об обнаружении бактериальное увядание стало одним из наиболее важных бактериальных заболеваний фасоли в США, в течение нескольких лет приводя к существенным потерям, но в последующие годы болезнь постепенно пошла на спад. В начале 2000-х годов бактериальное увядание появилось вновь и стало экономически значимым заболеванием в США, а также в Канаде, где в 2002 году были обнаружены штаммы с желтой и оранжевой окраской, затем в 2006 году – штамм с фиолетовой окраской (Harveson et al., 2015; Huang et

al., 2009). За последние пятнадцать лет сообщалось о вспышках болезни с экономически значимыми потерями урожая в Австралии, Бразилии, Канаде, Иране и на центральных высокогорных равнинах в США (Osdaghi et al., 2020; Puia et al., 2021a). В большинстве этих стран заболевание носило спорадический характер, и его распространенность сильно варьировала. В эндемичных районах Cff в США и Австралии (на маше) заболеваемость в прошлом достигала более 90% (Harveson et al., 2015).

Основным хозяином патогена считается фасоль обыкновенная, хотя соя также способна поражаться им. Экономические потери из-за ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания сои являются результатом снижения урожайности культуры, а также снижения посевных качеств в результате потери качества из-за обесцвеченных и сморщенных семян (Huang et al., 2009).

О заболевании сои и его возбудителе впервые сообщили в США в штате Айова в 1975 году, заболевание получило название «bacterial tan spot» (или ржаво-бурая бактериальная пятнистость (Dunleavy, 1983). Эксперименты показали, что максимальные потери урожая составили 18,8% у сортов сои восприимчивых к болезни (Dunleavy et al., 1984). В 2013 году появилось сообщение о сое в качестве хозяина Cff в Бразилии (Soares et al., 2013). О заражении сои Cff сообщалось и в Германии (Sammer et al., 2021).

Согласно отчету ЕРРО (2011) на основании сообщения о заражении фасоли обыкновенной в двух регионах России (Северный Кавказ и Дальний Восток), сделанных без надлежащей идентификации патогена, Cff присутствует в России (Никитина и др., 1978). Pilik et. al. (2023) сообщали о поражении патогеном подсолнечника в стране. О фактах заражения Cff растений сои в России ранее не сообщалось.

1.8. Систематическое положение и биологические особенности ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания сои

Царство: Бактерии; тип: *Actinobacteria*; класс: *Actinobacteria*; порядок: *Actinomycetales*; семейство: *Microbacteriaceae*; род: *Curtobacterium*; вид: *flaccumfaciens*; патовар: *flaccumfaciens*.

Типовым является штамм CFBR 3418 = CFBR 3456 = ICMP 2584 = LMG 3645 = NCPPB 1446 (Osdaghi et al., 2022).

Синонимы: *Bacterium flaccumfaciens* Hedges, *Corynebacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Dowson, *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dowson, *Phytomonas flaccumfaciens* (Hedges) Bergey et al., *Pseudomonas flaccumfaciens* (Hedges) Stevens.

Клетки Cff представляет собой аэробные подвижные грамположительные неспорообразующие палочки, встречающиеся поодиночке или парами, размером 0,3-0,5 x 0,6-3,0 мкм с одним-тремя боковыми или полярными жгутиками.

Бактериальное увядание фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) впервые наблюдалось в Южной Дакоте (США) в 1920 году; грамположительная фитопатогенная бактерия, вызывающая её, была описана как *Bacterium flaccumfaciens* Hedges в 1922 году (Hedges, 1922). Bergey (1939) отнес все фитопатогенные бактерии к роду *Phytomonas*, а возбудителя бактериального увядания бобовых – к *Phytomonas flaccumfaciens* (Bergey, 1939). Dowson (1942) поместил все грамположительные фитопатогенные бактерии булабовидной формы в род *Corynebacterium*, включая возбудителя бактериального увядания фасоли - *Corynebacterium flaccumfaciens*.

По окраске штаммов на среде на данный момент известно о пяти различных вариантах окраски колоний: желтый, оранжевый, розовый, красный и фиолетовый (колония желтого цвета, но с фиолетовым диффундирующим пигментом). Штаммы Cff, обладающие различной пигментацией, продуцируют бактериоцины против штаммов другой окраски на питательных средах (Osdaghi et al., 2018a). На неселективных средах, таких как YPGA или NBY, после 48-72 ч роста при 25-27 °C колонии Cff круглые, 2-4 мм в диаметре, гладкие и с цельными краями, чаще выпуклые и полупрозрачные, но иногда также плоские и полупрозрачные, их пигментация различна.

Разновидность с оранжевыми колониями, вызывающая обесцвечивание семенной оболочки, наблюдалась в Небраске, США с 1950 года и получила название *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *aurantiacum* (Schuster, Christiansen,

1957). Другой вариант с желтой окраской колонии и продуцированием растворимого пигмента от синего до фиолетового в культуральных средах, вызывающий обесцвечивание семенной оболочки, также наблюдался в Небраске в 1960-х годах и был назван как *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *violaceum* (Schuster et al., 1968). Этим двум вариантам, однако, не был присвоен таксономический/номенклатурный статус в последующие годы, хотя пурпурный вариант был намного позже также обнаружен в Канаде (Huang et al., 2006). После дальнейших таксономических исследований фитопатогенных представителей рода *Corynebacterium* с использованием гомологии гибридизации ДНК, состава клеточной стенки и биохимических характеристик, был выделен ряд подвидов *C. flaccumfaciens*, включая *Corynebacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens*, *C. flaccumfaciens* subsp. *betae*, *C.f.* subsp. *oortii* и *C.f.* subsp. *poinsettiae* (Carlson and Vidaver, 1982). Впоследствии это привело к их размещению в качестве патогенных разновидностей внутри вида *flaccumfaciens* в новом роде (*Curtobacterium*). Затем возбудитель бактериального увядания был переименован в *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, а остальные патоварианты – в *C.f.* pv. *betae*, *C.f.* pv. *poinsettiae* и *C.f.* pv. *oortii* (Collins and Jones, 1983).

Помимо этого, были описаны патовары: *basellae* - поражающий шпинат, *beticola* - поражающий сахарную свеклу, *ilicis* - вызывающий бактериальное увядание падуба американского (*Ilex opaca*). Однако эти новые таксономические группы штаммов патогенные микроорганизмы не приняты Комитетом ISPP по таксономии фитопатогенных бактерий, поскольку патовариант не входит в рамки современной номенклатуры названий бактерий.

Штаммы *Cff* с розовопигментированными колониями, вызывающими окрашивание семян в оранжевый цвет, были описаны в Небраске в 2007 году (Harveson et al., 2015). Краснопигментированный вариант, вызывающий смену цвета оболочек семян в темно-оранжевый, был выделен в 2014 году в центральном Иране (провинция Маркази) из фасоли обыкновенной (Osdaghi et al., 2016). Недавнее исследование, включавшее тесты на патогенность, MLSA и BOX-

ПЦР анализы, показало, что внутри штаммов *Cff* есть две линии: одна с колониями с желтой пигментацией, а другая с колониями с красной/оранжевой пигментацией. Кроме того, было обнаружено, что непатогенные штаммы *Cff* также могут быть выделены от растений, не являющихся хозяевами (Osdaghi et al., 2018).

Информация о расовых различиях штаммов на данный момент отсутствует. Однако известно, что желтые варианты колоний более вирулентны, чем красные/оранжевые для ряда растений-хозяев, включая коровий горох, лимскую фасоль, бобы садовые (*Vicia faba*) и горох, и только желтые изоляты вызывают заболевание горошка мохнатого (*Vicia villosa*) - основного сорняка в засушливых районах выращивания бобовых в Иране (Osdaghi et al., 2015b).

В сравнительном геномном исследовании *Cff* с патогенами растений - актинобактериями в геноме *Cff* был обнаружен набор уникальных геномных островков с низким содержанием G+C состава. Гомологичные последовательности локусов, определяющих патогенность, обнаруженные на этих островках, были ответственны за выработку 1,4-бета-ксилазазы (*XylA*), пектатлиазы (*pelA1* и *pelA2*), сериновой протеазы (*chpC*, *chpG* и *pat-1*) и сортазы (*srtA*) (Chen et al., 2020).

1.9. Симптоматика и особенности патогенеза ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания

Наиболее серьезные симптомы проявляются на молодых растениях сразу после прорастания семян. При заражении они обычно погибают. Если растения подвергаются раннему заражению или поражаются на более поздней стадии роста, они могут выживать в течение всего сезона и давать зараженные семена. Восприимчивы все стадии развития растения. Заболевание характеризуется начальным межжилковым хлорозом, который позже становится некротическим из-за системной сосудистой инфекции, приводящей к увяданию листьев или их частей в дневную жару и неполному восстановлению тургора при понижении температуры вечером. Закупорка бактериями сосудов осложняет поступление воды, листья становятся коричневыми и преждевременно опадают (Allen et al., 1995). Увядание может в конечном итоге привести к гибели растения. Во время ливней с градом или при сильном ветре некротические ткани

могут легко разрываться; поражённые листья имеют рваный вид и опадают (Chavarro et al., 1985). Иногда типичные симптомы увядания могут отсутствовать, но вместо них наблюдаются золотисто-желтые некротические поражения листьев. *Cff* поражает сосудистую систему растения, вызывает пятнистость листьев, ожог, увядание и гибель всходов и взрослых растений. Инфицированные всходы растут медленно, у них опадают листья, отмирают побеги и ломается главный стебель. При заражении старых растений цветки также могут быть поражены, а завязываемость семян сильно снижена. На семенах сортов фасоли с белыми семенами при системном заражении может наблюдаться их обесцвечивание и окрашивание в желтый, оранжевый, розовый или фиолетовый оттенки; у сортов с окрашенной оболочкой семян обесцвечивание менее заметно. На поверхности может присутствовать немного бактериального экссудата, а семена могут быть сморщенными. У коровьего гороха на инфицированных листьях появляются хлоротичные и некротические участки по краям, что реже встречается и у других хозяев. На маше и сое редко происходит сильное увядание зараженных растений, а межжилковый некроз имеет бледно-ржаво-коричневый цвет, что привело к названию болезни «ржаво-бурая бактериальная пятнистость» у этих двух культур (Puia et al., 2021b).

Cff передается семенами, причем имеет место как поверхностное, так и внутреннее их заражение. Патоген очень устойчив к высыханию и сохраняет жизнеспособность до 24 лет в семенах, хранящихся в лабораторных условиях (Burkholder, 1945). В почве выживаемость намного короче, и в случае посева бобовых культур, чередующихся с пшеницей, выживаемость патогена не превышает двух вегетационных сезонов. Бактерия способна дольше выживать на растительных остатках небобовых культур и в сорняках. Практика минимальной обработки почвы (strip-till) или ее отсутствия (no-till) для сохранения влажности почвы повышает выживаемость *Cff* и способствует развитию болезни на бобовых культурах (Gonçalves et al., 2017).

Бактерия может проникать в корни и наземные части растений через раны, обычно при ветреной погоде с градом. Проникновение через устьица встречается

редко, в отличие от других бактериальных патогенов бобовых. Сообщений о переносчиках нет, однако, известно, что южная галловая нематода (*Meloidogyne incognita*) может способствовать проникновению, повреждая корни (Schuster, 1959). Внутри растения бактерия распространяется главным образом по ксилеме, где она часто присутствует в биопленках.

Развитие и экспрессия заболевания стимулируются температурой выше 30°C. Возможна скрытая инфекция и колонизация семян и растений, особенно при более низких температурах. Cff может поражать растения при отсутствии дождя; однако прогрессирование заболевания связано с теплыми влажными условиями, а распространению бактерии способствует полив дождеванием. Более поздние вспышки Cff в Северной Америке, наблюдаемые после примерно 20 лет отсутствия болезни, могут быть результатом изменения технологии выращивания в частности, распространение орошения дождеванием, изменения климата (более теплое и влажное лето), распространения от альтернативных хозяев, и отсутствия опыта борьбы с болезнью из-за длительного периода её отсутствия на полях (Harveson et al., 2006). Следовательно, восприимчивость к видам/сортам-хозяевам, погодные условия и приемы культивирования являются важными факторами вспышек заболевания и их выраженности (Harveson et al., 2015).

Основными хозяевами бактерии являются растения семейства *Fabaceae*, включая: *Phaseolus* spp., особенно обыкновенная фасоль (*P. vulgaris*), стручковая фасоль (*P. coccineus*) и луновидная фасоль (*P. lunatus*); адзуки или красная фасоль мунг (*Vigna angularis*), маш (*V. radiata*) и черная фасоль (*V. mungo*). Cff также может поражать сою, горох (*Pisum sativum*), коровий горох (*Vigna unguiculata*) и гиацинтовые бобы (*Lablab purpureus*).

Эпифитная и эндофитная колонизация может происходить и на других небобовых культурах. В полевых условиях в Бразилии было обнаружено, что Cff колонизирует, не вызывая симптомов, растения ячменя (*Hordeum vulgare*), черного овса (*Avena strigosa*), рапса (*Brassica napus*), обыкновенного или белого овса (*A. sativa*), райграса (*Lolium* spp.) и пшеницы (*Triticum* spp.), когда их выращивали в севообороте с фасолью обыкновенной. Все штаммы Cff, выделенные из этих

растений, были патогенны для фасоли обыкновенной (Gonçalves et al., 2017). В США Harveson et al. (2015) выделили штаммы *Cff* оранжевого и желтого цвета, патогенные для фасоли обыкновенной из растений пшеницы зараженных *Xanthomonas translucens* с симптомами черной пятнистости и из листьев кукурузы зараженных *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*. В Иране, патогенные для фасоли обыкновенной штаммы *Cff* были выделены из бессимптомных растений баклажана (*Solanum melongena*), перца (*Capsicum* spp.) и томата (*Solanum lycopersicum*) (Osdaghi et al., 2018).

Cff был обнаружен на таких сорняках, как *Lupinus polyphyllus* (Schuster and Sayre, 1967), *Amaranthus retroflexus*, *Chenopodium album*, *Vicia villosa* (Schuster, 1959) и других. Nascimento et al. (2020) сообщили, что эксперименты с искусственной инокуляцией в полевых условиях показали, что потенциальными бессимптомными хозяевами для *Cff* являлись следующие сорняки: *Amaranthus viridis*, *Conyza bonariensis*, *Commelina benghalensis*, *Cyperus rotundus*, *Digitaria insularis*, *Emilia fosbergii*, *Galinsoga parviflora*, *Gnaphalium purpureum*, *Ipomoea triloba*, *Lepidium virginicum*, *Nicandra physalodes*, *Raphanus sativus*, *Senna obtusifolia* и *Solanum americanum*. Поэтому в системе защитных мероприятий в отношении этого возбудителя бактериоза сои большое значение имеет борьба с сорняками.

1.10. Диагностика ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания сои

Возбудитель может быть выделен из всех надземных частей пораженных растений, но наиболее подходящими органами являются листья, стебли и семена. Выделяют *Cff* либо из партий семян, либо из тканей растений с симптомами на средах NBY или YPGA (Osdaghi et al., 2020; EPPO, 2011). Бактерия также растет на широком спектре питательных сред, включая среду Кельмана и среду Кинга Б (Tegli et al., 2017). Методы изоляции в чистую культуру включают в себя повреждение края пораженного листа и перенос экссудата на среду (Harveson et al., 2006), выдавливание сока из тканей с симптомами, и нанесение его на питательную среду (Harveson et al., 2013), а для сухих частей растений – инкубация во влажной камере

и перенос на среду выделившегося экссудата (Harveson et al., 2015). Для выделения патогена из семян используют элюент, образовавшийся после инкубации семян в дистиллированной воде, и его также переносят на среду (Harveson and Schwartz, 2007). Этот метод совместно с иммунологическим тестом и визуальной оценкой до конца 20 века были единственными методами диагностики патогена до разработки селективных сред и методов на основе ПЦР (Osdaghi et al., 2020). Однако иногда эти подходы часто давали ложноотрицательные результаты.

Для усовершенствования диагностики был предложен ряд полуселективных питательных сред для выделения *Cff*. Например, Mizuno и Kawai рекомендовали полуселективную питательную среду SSFM для выделения *Cff* из семян фасоли, которая включала специфические источники углерода и антимикробные вещества с последующей проверкой при помощи иммунологического теста для повышения селективности и чувствительности метода (Mizuno and Kawai, 1998). Maringoni с соавторами (2006) разработали полуселективную питательную среду MSCFF, которая включала базовую часть (пептон, мясной экстракт, сахарозу, агар-агар, воду) и ряд селективных агентов (сухое обезжиренное молоко, конго красный, хлорталонил, тиофанат метил, налидиксовую кислоту, нитрофурантоин, оксациллин и азид натрия). Среда MSCFF способна подавлять рост многих сапротрофных бактерий, не действуя на штаммы *Cff* (Maringoni et al., 2006a), и была успешно использована для выявления патогена в естественно инфицированных семенах фасоли обыкновенной (Maringoni, 2006b).

Надежная дифференциация патоваров у вида *C. flaccumfaciens* может быть достигнута с помощью тестов на патогенность на растениях-хозяевах, включая фасоль и сою (Guimaraes et al., 2003; Chen et al., 2007).

Для точной и быстрой дифференциации патоваров был разработан ряд методик на основе ПЦР (Guimaraes et al., 2001; Tegli et al., 2002). В частности, пара праймеров CF4 (5-CACAGCCACCTACATGC-3) и CF5 (5-GATCGGGAGTCCGAG-3) способна специфически амплифицировать фрагмент ДНК длиной 198 п.н. у штаммов *Cff*, но не у других патоваров этого вида (Guimaraes et al., 2001). Однако, способность пары праймеров CF4/CF5 непосредственно обнаруживать патоген в

естественно инфицированных семенах фасоли не оценивалась. Тест-система с использованием праймеров CffFOR2/CffREV4 достаточно чувствительна, чтобы обнаружить присутствие Cff в семенах фасоли при концентрации патогена всего 100 КОЕ/мл (Tegli et al., 2002). Использование этих праймеров в сочетании с БИО-ПЦР и сконцентрированным в центрифуге экстрактом семян позволяло обнаруживать одно искусственно контаминированное Cff семя фасоли среди 999 здоровых семян (Deuner et al., 2012). Однако, в исследованиях Osdaghi с соавторами (2018) пара праймеров CffFOR2/CffREV4 не амплифицировала ожидаемого фрагмента длиной 306 п.н. у различных непатогенных штаммов *C. flaccumfaciens*, выделенных из растений томата и баклажана. Недавно был представлен подробный пошаговый протокол для обнаружения Cff в семенах фасоли с использованием как обычных, так и полуселективных питательных сред, а также классической ПЦР (Tegli et al., 2017).

Хотя для выявления Cff был разработан ряд серологических методов, они не способны дифференцировать непатогенные штаммы *C. flaccumfaciens* от патогенных (Calzolari et al., 1987; McDonald and Wong, 2000). Иммунофлуоресцентное окрашивание было успешным при обнаружении Cff до концентрации $1,82 \times 10^4$ флуоресцентных клеток на миллилитр фильтрата семян (Calzolari et al., 1987). Иммунофлуоресцентные тесты с использованием поликлональной антисыворотки, полученной против штамма Cff NCPPB 559, не обладали достаточной чувствительностью и не реагировали со всеми протестированными штаммами Cff (Calzolari et al., 1987; McDonald and Wong, 2000), в то время как полученные моноклональные антитела были способны обнаруживать патоген в бессимптомных растениях маша. Чувствительность и специфичность серологических методов обнаружения Cff была низка по сравнению с ПЦР, специфичной к патоварам (Guimaraes et al., 2001; Tegli et al., 2002).

Что касается биохимических свойств бактерий, то во многих работах оценивалась пригодность системы микропланшетов с разными источниками углерода, разработанной компанией Biolog Inc. Она оказалась полезным инструментом для достоверной идентификации всех изолятов *Curtobacterium* spp.

на уровне рода. Harris-Baldwin and Gudmestad (1996) дополнили базу данных Biolog для улучшения обнаружения патогенных для растений коринеформных бактерий. Впоследствии биологическая система была способна дифференцировать Cff, *C. flaccumfaciens* pv. *betae* и *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* до уровня патоваров с относительно высокой надежностью, в то время как *C. flaccumfaciens* pv. *oortii* удалось идентифицировать только до уровня вида (Harris-Baldwin and Gudmestad, 1996). Кроме того, был разработан микрочип-гибридизационный зонд, меченный СуЗ, на основе последовательностей гена *GroEL* (белок теплового шока) для идентификации и специфического обнаружения Cff (Pelludat et al., 2009). Однако ни один из этих методов не был оценен по эффективности при обнаружении патогена в партиях семян, инфицированных естественным путем.

1.11. Методы защиты сои от бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости

При разработке мероприятий по борьбе с бактериальными болезнями методы борьбы необходимо учитывать биологические особенности патогена, профилактику, диагностику и контроль его в семенах и растениях с использованием экологически малоопасных средств защиты (Aysan and Horuz, 2015).

Из агротехнических мер борьбы с Psg сообщается об эффективности измельчения растительных остатков сои и глубокой обработки почвы с оборотом пласта. По данным Anaele et al. изменения в показателях заболеваемости и зараженности наблюдались при посеве без обработки почвы и при обычной системе обработки почвы, при которых было заражено 83,3% и 70,3% растений, соответственно (Anaele et al., 1990) Также рекомендуется соблюдать севооборот с ротацией сои в 2-3 года.

Основной сложностью защиты сои от ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания является способность Cff к передаче семенами. Согласно рекомендациям ЕРРО следует проводить инспекцию семян при транспортировке бобовых, чтобы избежать распространения патогена в новые регионы, где ранее не было случаев заболевания (ЕРРО, 2011). Если болезнь уже присутствует, рекомендуется двухлетняя ротация с культурами, не являющимися хозяевами,

такими как злаки. Жизнеспособные клетки Cff были обнаружены в системах орошения, следовательно, следует избегать повторного использования оросительной воды из дренажной системы (Schuster, 1959). Ryley с соавторами (2010) предположили, что использование здоровых семян и устойчивых сортов одинаково важно для борьбы с Cff на маше в Австралии, в то время как севооборот играет второстепенную роль. Практика сбалансированного минерального питания сои также способствует борьбе с болезнями бактериальной этиологии. Принятие этих методов управления патогеном оказалось эффективным для искоренения или поддержания популяции Cff на низком уровне в районах, где выращивается фасоль обыкновенная (Harveson et al., 2015).

Выведение устойчивых сортов является наиболее практичным методом борьбы с Cff с точки зрения экономической эффективности (Osdaghi et al., 2020). Устойчивые к Psg сорта были зарегистрированы в различных странах (Nickell et al., 1994). Однако большинство сортов обладают умеренным уровнем устойчивости (Sharma et al., 1988). Dunleavy и др. (1960) сообщили о высокой степени полевой устойчивости сорта PI 68708 из Маньчжурии, Китай (провинции Хэйлуцзян, Цзилинь и Ляонин). Однако Cross с соавторами (1966) инокулировали этот сорт пятью встречающимися в природе расами в Миннесоте, США, и обнаружили, что он восприимчив к четырем из пяти рас. Коробейников А.С. сообщил о слабой восприимчивости сорта Горинская к заражению Psg на естественном фоне (Коробейников и др., 2021). Краснова М.В. сообщила об иммунности некоторых сортообразцов при искусственном заражении Psg в условиях Краснодарского края (Краснова, 1963). По мнению Бутовец Е.С., наиболее перспективными источниками устойчивости к бактериозу являются сорта приморского происхождения (Бутовец и Лукьянчук, 2017).

Серьезные исследования по изучению устойчивости к Cff проводились на его основном хозяине – фасоли обыкновенной. К примеру, выяснено, что существуют различия в вирулентности между штаммами разной окраски, или наоборот, показано, что по уровню устойчивости к патогену сорта с белыми и

красноокрашенными семенами отличаются; отобраны формы, устойчивые ко всем патотипам и идентифицированы гены устойчивости (Urrea and Harveson, 2014).

На сое было выполнено мало работ, оценивающих устойчивость сортов к патогену. На данный момент известно, что на культуре в качестве метода инокуляции рекомендуется использовать метод повреждения поверхности листьев зубочисткой, смоченной в инокулюме или опрыскивания листьев бактериальной суспензией (Maringoni et al., 2002; Maringoni et al., 2006). Помимо этого, хорошую эффективность показывает метод надрезания листьев ножницами (Rava et al., 1984), предварительно погруженными в бактериальную суспензию. Исследования показали, что сорта сои могут существенно различаться по уровню устойчивости к Cff. Bracale и Soares (2014) отметили, что через 15 дней после инокуляции десять сортов сои показали умеренную устойчивость, но через 32 дня только три сорта сохранили эту характеристику, и к концу времени учета около 83% протестированных сортов из 19 были признаны восприимчивыми, три сортообразца (BRS 257, BRS 359RR и NA 5909 RG) были слабопоражаемыми. Согласно исследованию проведенному Maringoni и Souza (2003) с двадцатью сортами сои с использованием изолята, полученного из фасоли, наблюдалось слабое проявление симптомов заболевания из-за возможных механизмов устойчивости, препятствующих колонизации данного штамма. Однако, инокуляция реизолированным с сои штаммом, привела к сильному проявлению симптомов болезни на сое.

Из биологических методов борьбы с Psg, описаны ряд штаммов бактерий, проявляющих антагонистическую активность в отношении Psg. В частности, В. Völksch с соавторами показали, что ряд штаммов *Pseudomonas syringae* проявляли антагонистическую активность *in vitro* (метод диффузии в агаре) и *in planta* (анализ в теплице) в отношении Psg. Обработка растений суспензией штаммов-антагонистов приводила к значительному снижению площади поражения Psg (Völksch et al., 2001). Показана перспективность применения суспензии бактерии *Bdellovibrio bacteriovorus* в соотношении с Psg 9:1 и 99:1 при совместной инокуляции и уменьшение симптомов примерно на 50%. Применение

филлосферных бактерий привело к значительному уменьшению концентрации клеток Psg на листьях и увеличению биомассы растений, массы и количества клубеньков, интенсивности газообмена и содержания хлорофилла листьев (Agbavor et al., 2022).

Биологические методы защиты от Cff на сое не применялось, а на фасоли обыкновенной показана перспективность их применения. Corrêa с сотрудниками (2014) показали значительное снижение симптомов заболевания при использовании комбинации штаммов *Bacillus cereus* и *Pseudomonas fluorescens* для уменьшения развития бактериального увядания. При обработке семян ризобактериями, способствующими росту растений (PGPR), уменьшение бактериального увядания варьировало от 42% до 76% (Martins et al., 2013). Замачивание семян фасоли обыкновенной в суспензии (3×10^8 КОЕ/мл) *Pantoea agglomerans* приводило к полной эндофитной колонизации всего проростка от корня до верхушечного стебля через 7 дней после инокуляции и снижало выраженность симптомов бактериального увядания в условиях эксперимента в теплице (Hsieh et al., 2005).

Химические меры защиты от Psg включают в себя обработку препаратами меди, антибиотиками и фунгицидами с бактерицидным действием. Nakata (1934) предложил обрабатывать растения, зараженные Psg, бордоской жидкостью. Был предложен метод обработки озонем растений сои, зараженных Psg; период защитного действия достигал 8 дней при концентрации 0,25 ppm (Laurence, 1978). Сообщалось о том, что ультразвуковое излучение снижало заражение семядолей патогеном (Krasnova, 1963). Jagtap и др. (2012) сообщили, что применение стрептоциклина в виде аэрозоля (100 мкг/мл) + оксихлорид меди (0,25%) обеспечивали самые низкие показатели заболеваемости (12,74%) наряду с самой высокой урожайностью семян (2605 кг/га). Leben (1975) сообщил о применении окситетрациклина гидрохлорида (Тетраамицина) для оздоровления и получения семян, свободных от патогена, однако вещество обладало фитотоксичностью в отношении проростков.

Использование химических соединений для борьбы с *Cff* более эффективно в сочетании с агротехническими приемами, но эффективность их непостоянна (Lamichhane et al., 2018). Об использовании фунгицидов в защите от *Cff* на сое нет данных, однако на фасоли в нескольких исследованиях показано отсутствие эффективности применения ХСЗР на основе меди (оксихлорида меди, гидроксида меди и сульфата меди). Помимо этого, выявлен прецедент появления устойчивых к меди штаммов *Cff* (Harding et al. 2019). Данные факты подчеркивают необходимость поиска альтернативных, надежных стратегий защиты от этих болезней (Martins et al. 2015). Harveson et al. (2019) сообщили о результатах 7-летнего (2010-2016 гг.) полевого исследования, в ходе которого изучалась эффективность новых бактерицидных веществ для борьбы с патогеном на фасоли. Эти новые продукты были сравнены с двумя продуктами на основе меди – Косайд (гидроксид меди) и MasterCop (сульфат меди) в Небраске, США. Обработка препаратами SaniDate (перекись водорода 18,5% + пероксиуксусная кислота 12%) и есоАгра 300 (растительные жирные кислоты) неизменно приводила к более высокому урожаю семян, чем другие обработки по сравнению с контролем, но не снижала заболеваемость. Эти продукты, по-видимому, не являются лечебными, но действуют как защитные средства, замедляя или предотвращая прогрессирование болезни. Лучшие результаты во все года были достигнуты на сильно пораженных полях по сравнению с полями с низким уровнем заболеваемости (Harveson et al., 2019). Обработка семян антибиотиками может уменьшить поверхностную контаминацию семян. Например, было показано, что обработка семян препаратом Agri-Strep 500 (50 000 ppm стрептомицина) эффективна для борьбы с *Cff* на семенах фасоли обыкновенной (Schwartz, 2007). Замачивание семян в растворе Agrimaicin 500 (500 г/л медного купороса и 30 г/л окситетрациклина) в концентрации 10 г/л воды в течение 30-60 мин, уничтожало возбудителя на естественно инфицированных семенах; но оно не было эффективным при искусственном заражении семян патогеном с титром суспензии 10^8 КОЕ/мл (Estefani et al., 2007).

Ряд российских исследователей сообщили о хорошем действии отечественных фунгицидов и биопрепаратов в качестве меры защиты от

бактериозов сои, однако видовая принадлежность данных бактерий не была определена. Так, фунгициды Виталон (тебуконазол + тирам), ТМТД (тирам) и Дэлит Про (пираклостробин) при протравливании семян показали высокую эффективность (51-57%) (Курилова, 2021). Обработка препаратом «БСКА-3» (*Trichoderma viride*, *Pseudomonas koreensis*, *Bacillus subtilis*, *Bradyrhizobium japonicum*) снижала пораженность семян и проростков бактериальной инфекцией на 65% (Биотехагро). Санаров с соавторами сообщили о высокой эффективности (39-87%) протравителей ТМТД, Дэлит Про. По данным Санарова А.Г. эффективность обработки семян в отношении бактериозов сои препаратами Зеребра (коллоидное серебро) и Бенефис (имазалил + металаксил + тебуконазол) была самой низкой, препарат Скарлет (имазалил + тебуконазол) обеспечивал эффективность 50%, Зебра Агро (коллоидное серебро + полигексаметиленбигуанид гидрохлорида) – 60% (Санаров и др., 2021).

В настоящее время в России для защиты от бактериальных болезней сои зарегистрировано и представлено в «Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации» только 5 фунгицидов: для обработки семян соединения на основе тирама (Тирада, ТМТД, Гераклион), Витаплан (*Bacillus subtilis*) и для защиты сои в период вегетации Бенорад (беномил) – (Государственный каталог, 2023).

1.12. Альтернативные способы борьбы с бактериальными болезнями сои

Во всем мире в последнее время прослеживается тренд на исследования по поиску новых альтернативных мер борьбы с болезнями растений и снижению пестицидной нагрузки на агроценозы (Лаптиев и Мальцев, 2023). К ним относятся использование веществ растительного происхождения, бактериофагов и наночастиц.

К веществам растительного происхождения относят эфирные масла и растительные экстракты. Эфирные масла (далее по тексту – ЭМ) являются вторичными метаболитами, получаемыми из различных частей растений. Механизм действия ЭМ, например, тимола (компонент ЭМ тимьяна

обыкновенного) на бактерии в основном связан со структурными и функциональными изменениями в цитоплазматической мембране, что приводит к повреждению внешней и внутренней мембран; он также может взаимодействовать с мембранными белками и внутриклеточными мишенями, влиять на проницаемость мембран и приводить к высвобождению ионов K^+ и АТФ (Xu et al., 2008). Растительные экстракты (РЭ) также состоят из вторичных метаболитов растительных клеток, но более сложны по химическому составу. Механизм действия РЭ в основном связан с воздействием на клеточную мембрану бактерий путём изменения внутреннего рН и ее гиперполяризации (Gonelimali et al., 2018).

В последние годы появилось много исследований, описывающих сильную антибактериальную активность веществ растительного происхождения в отношении возбудителей болезней растений (Satish et al., 1999; Simonetti et al., 2020). Эти вещества безопасны для окружающей среды, биоразлагаемы в полевых условиях при попадании в почву и обладают низкой токсичностью для млекопитающих. Они являются потенциальной альтернативой синтетическим веществам, в частности, из-за развивающейся устойчивости патогенных микроорганизмов даже к мультисайтовым биоцидам (Cazorla et al., 2002). Во многих странах используются коммерческие фунгициды на основе ЭМ и РЭ. Например, Koppert BioSystems (Вейлингвег, Нидерланды) поставляет фунгицид Noras (д.в.-ва: ЭМ тимьяна и мяты перечной) для защиты томатов от корневой гнили; в США выпускаются фунгициды VertigoTM (д.в. – очищенный циннамальдегид из Коричника цейлонского (*Cinnamomum verum*) (Copping et al., 2007) и Qwel (Ngegba et al., 2022), которые используются для защиты сельскохозяйственных культур от широкого спектра патогенов.

Имеется несколько сообщений об определении антибактериальной активности ЭМ и РЭ в отношении возбудителей бактериальных болезней сои. Например, в работе (Sotelo et al., 2021) показано, что при обработке ЭМ тимьяна количество бактерий на семенах уменьшалось на 6%, а всхожесть увеличивалась на 21%. В работе (Jagtap et al., 2012) сообщается об антибактериальной активности *in vitro* водных экстрактов нима (*Azadirachta indica*) и имбиря (*Zingiber officinale*), а

Lo Cantore (2009) сообщает о сильном антибактериальном действии карвакрола на штаммы Psg. В отношении Cff ЭМ тмина (*Carum carvi*), мошкурака (*Oliveria decumbens*), душицы обыкновенной (*Origanum minutiflorum*), душицы мелколистной (*Origanum microphyllum*) и железнолистника (*Sideritis erytrantha*) (Altundag et al., 2011) проявляли сильную антибактериальную активность *in vitro*. Из РЭ известно, что этанольный экстракт зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum*) проявляет сильную антибактериальную активность в отношении Psg *in vitro* (Hrubanova et al., 2022). Данные исследования в большинстве своем проводились в лабораторных условиях и ограничивались опытами *in vitro*, и отсутствует информация об эффективности веществ растительного происхождения на инфекционном фоне бактериозов сои на вегетирующих растениях.

Бактериофаги (фаги) – вирусы, которые специфически инфицируют и лизируют бактериальные клетки, безопасны для человека и окружающей среды и часто рассматриваются как экологичный способ борьбы с патогенными бактериями, особенно штаммами, устойчивыми к антибиотикам (Lukianova et al., 2019). С момента обнаружения бактериофагов, они стали рассматриваться как способ борьбы с бактериями, в том числе, поражающими растения (Moore, 1926).

В последние десятилетия применение бактериальных вирусов (бактериофагов) рассматривается как перспективный способ борьбы с бактериальными болезнями сельскохозяйственных растений (Buttimer et al., 2017, Svircev et al., 2018). Фаги применялись для контроля фитопатогенных бактерий из родов *Xanthomonas* (Nakayinga et al., 2021), *Pseudomonas* (Flores et al., 2020), *Clavibacter* (Kimmelshue et al., 2019), ряда других и показали себя как перспективные агенты борьбы с заболеваниями растений. Эффективность фагов колебалась от 20% на побегах и корнях кукурузы в отношении *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Kimmelshue et al., 2019) до 86-100% на саженцах персика в отношении *Xanthomonas pruni* (Civerolo, 1969). Эффективность применения фагов зависит от биологических особенностей растения, патогена, фага, препаративной формы и климатических условий.

Успешное применение фагов для борьбы с болезнями сельскохозяйственных культур должно быть основано на всесторонней характеристике их вирулентности, физиологических и генетических свойств (Holtappels et al., 2021). Широкое применение фагов в защите растений от бактериальных патогенов сдерживается их слабой устойчивостью к ультрафиолетовому излучению и узким инфекционным спектром хозяев, часто ограничивающимся лишь патовариантом бактерий. Известны несколько препаратов на основе фагов, применяющихся в коммерческих посевах и посадках для борьбы с бактериальными фитопатогенами. Например, препарат Agriphage производится компанией Omnilytics (Sandy, UT, США) и применяется для контроля *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* и *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* на томате.

Известно о нескольких фагах, заражающих Psg, однако их описание ограничено лишь характеристикой биологических свойств, и оценка их эффективности при применении на растениях не проводилась. Сообщается, что они образуют маленькие (1-2 мм в диаметре) бляшки (Susianto et al., 2014), имеют двухцепочечную ДНК, (Addy et al., 2016), с диаметром головки 35-95 нм и хвостом длиной до 140 нм. Бактериофаги были также предложены для борьбы с Cff, однако кроме факта выделения изолята, более подробной информации не представлено (Klement, 1957)

Многообещающим подходом является использование хитозана и препаратов на его основе в борьбе с бактериальными болезнями растений (El Hadrami et al., 2010). Хитозан - биоразлагаемый, биосовместимый и малотоксичный биополимер, характеризующийся антимикробными, противовирусными, антиоксидантными свойствами (Bernkop-Schnürch et al., 2012). Хитин является одним из наиболее распространенных полисахаридов, обнаруживаемых в панцирях ракообразных, кутикуле насекомых и клеточных стенках грибов. Защитный эффект хитозана проявляется тройным действием: активацией иммунитета растения, воздействием на микроорганизмы и образованием пленки (Romanazzi et al., 2019). Усиление иммунного ответа растений обусловлено тем фактом, что положительно заряженный хитозан может взаимодействовать с отрицательно заряженным

пектином. Клетки растений получают информацию о разрушении клеточной стенки в присутствии патогенов путем индуцирования специфического сигнала, возникающего в результате воздействия хитозана на структуру пектина. Хитозан также может напрямую ингибировать рост многих патогенов растений: фитопатогенных грибов и бактерий (Cuong et al., 2017). Хитозан образует защитную пленку, предотвращающую взаимодействие патогенов с клеточной стенкой растения. Ряд коммерческих продуктов на основе хитозана, таких как Armour-Zen (Новая Зеландия), Chito Plant (Германия) и KaitoSol (Великобритания), используются для подавления бактериальных болезней растений.

Применение наночастиц хитозана для борьбы с патогенами растений стало трендом последних лет. Наночастицы хитозана действуют как стимуляторы роста растений и противомикробные агенты в отношении фитопатогенных бактерий (Kong et al., 2010). Механизм антибактериальной активности наночастиц хитозана аналогичен механизму хитозана и обусловлен в первую очередь взаимодействием с клеточной стенкой и мембраной бактериальной клетки. Наночастицы хитозана обладают ценными преимуществами, а именно их большой площадью поверхности и малым размером (Ma, 2017). Наноконструкции хитозана с металлами, в частности с медью, также активно изучаются. В работе (Chidanandappa et al., 2020) было показано, что наночастицы на основе хитозана насыщенные медью с диаметром частиц 89 нм эффективно ингибировали рост *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*, вызывающей бактериальную гниль граната при 1000 ppm и проявляли активность на уровне стандартного антибиотика стрептоциклина при 500 ppm.

Информация об антибактериальной активности обогащенных медью наночастиц хитозана и немодифицированного хитозана в отношении Psg скудная. В статье (Swati et al., 2017) было показано, что Cu-хитозановые наночастицы обладают высокой антибактериальной активностью в отношении Psg в условиях *in vitro* при концентрациях 400 ppm и 1000 ppm. Отсутствует информация об эффективности хитозана и наночастиц хитозана с Cu^{2+} в отношении Cff.

Таким образом, бактериальный ожог и ржаво-бурая бактериальная пятнистость и увядание являются вредоносными болезнями сои. На данный момент

изучен ряд биологических свойств, экология взаимоотношений с растениями-хозяевами, опробованы некоторые меры борьбы с данной группой болезней. Для использования в целях диагностики данной группы болезней известны прецеденты применения метода ПЦР, однако необходима разработка нового протокола, учитывающего штаммовое разнообразие и новейшие филогенетические изменения. Перспективным приёмом защиты растений от бактериальных болезней является использование бактериофагов – вирусов, поражающих бактериальные клетки. Активно проводятся исследования по использованию веществ растительного происхождения в защите растений от бактериальных болезней. Многообещающим является использование наночастиц хитозана – биodeградируемого вещества, получаемого из живых организмов и его комплексов с металлами, в частности с медью. Остаётся неясным чувствительность изучаемых патогенов к действующим веществам фунгицидов, известных антибактериальным действием в отношении других фитопатогенных бактерий. Биологические особенности штаммов возбудителей бактериозов сои в России, их генетические свойства, антибактериальная активность фунгицидов, эффективность новых нетрадиционных мер борьбы с болезнями, таких как бактериофаги, вещества растительного происхождения и наночастицы комплекса хитозана и меди остаются недостаточно изученными. Отсутствует информация о восприимчивости к бактериозам сортов сои, возделываемых в России. Использование данных мер борьбы позволит выстраивать научно обоснованные системы борьбы с бактериальными болезнями сои в рамках концепции интегрированной защиты растений.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основная часть научно-исследовательской работы выполнена на кафедре защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева». Отдельные эксперименты, связанные с изучением бактериофагов, были проведены в лаборатории молекулярной биоинженерии ФГБУН «Институт биоорганической химии» им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН; химический анализ эфирных масел и растительных экстрактов проведён в лаборатории ГК «Союзснаб»; получение и изучение свойств наночастиц хитозана и его комплексов с медью проводили на базе лаборатории инженерии биополимеров ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

2.1. Оценка разнообразия штаммов *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

Выделение штаммов *Psg* проводили из инфицированных листьев и семян сои по общепринятой методике (Alvarez et al., 1995) с небольшими изменениями. Всего было проанализировано 87 образцов семян и вегетирующих растений сои. Для этого части растений с симптомами и семена гомогенизировали в ступке с добавлением стерильной дистиллированной воды до однородного состояния. Последовательные десятикратные разведения гомогената наносили на среду Кинга Б, дополненную 10 мкг/мл цефалексина (название модифицированной среды - КВС) и инкубировали при 28°C в течение 4-6 дней. Типичные колонии флуоресцирующих псевдомонад очищали для получения чистых культур путём трех последовательных пересевов и использовали для дальнейшего анализа. Для сравнения во всех тестах использовали эталонный штамм *Psg* CFBP 2214.

Фенотипически изоляты оценивали по форме колоний и образованию сидерофора пиовердина (Wensing et al., 2010) при культивировании на среде Кинга Б. Биохимическая характеристика включала себя анализ LOPAT (образования левана (L), оксидазы (O), пектолитической активности на ломтиках картофеля (P), активности аргининдигидролазы (A) и реакции сверхчувствительности (СВЧ) на

растениях табака (Т)) (Lelliott, 1966). Штаммы хранили при -72°C в 15%-ном водном растворе глицерина.

Молекулярно-генетическую характеристику штаммов, показавших сходство с Psg на предварительных этапах, проводили методами ПЦР и секвенирования. Для этого из двухсуточных культур бактерий выделяли ДНК с помощью набора для выделения "ГС-Проба" («АгроДиагностика», Россия) в соответствии с протоколом производителя. ПЦР анализ проводили с использованием праймеров PsgFOR-1 (5'-GGC GCT CCC TCG CAC TT-3') и PsgREV-2 (5'-GGT ATT GGC GGG GGT GC-3') (размер продукта - 650 п.н.), специфичных для гена *cfl*, кодирующего синтез коронафакат-лигазы, необходимой для образования фитотоксина коронатина (Ignjatov et al., 2007). Для проведения амплификации готовили 25 мкл ПЦР-смеси, содержащей 5 мкл 5×Master Mix (5×Mas^{DD}TaqMIX-2025, Диалат, Россия); 1,0 мкл каждого праймера с концентрацией 10 пМ и 5 нг целевой ДНК. Анализ проводили в амплификаторе T100 (Bio-Rad, США) в соответствии с рекомендованной программой (Bereswill et al., 1994). Ампликоны разделяли электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием в 0,5×TBE-буфере, и анализировали в системе гель-документирования Gel Doc XR+ (Bio-Rad).

Для более детальной генетической характеристики выделенных штаммов проводили секвенирование последовательностей гена цитратсинтазы (далее - *gltA*) и межгенного спейсера (далее - *ITS 16S-23S* рНК). Для амплификации гена *gltA* использовали праймеры *cts-Fs* (5'-CCC GTC GAG CTG CCA ATW CTG A-3') и *cts-Rs* (5'-ATC TCG CAC GGS GTR TTG AAC ATC-3'), описанные в работе (Sarkar et al., 2004), а для гена *ITS 16S-23S* рНК – *ITS-1_Psg* (5'-GAA CCT GCG GCT GGA TCA-3') и *ITS-2_Psg* (5'-GCG CTT CTT CAC TTG ACC ATA TAA-3'), разработанные в рамках этой работы при анализе генома штамма Psg ICMP 2189 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_001400375.1/). Состав реакционной смеси был аналогичен составу при амплификации гена *cfl*.

Температурно-временные условия амплификации гена *gltA* были аналогичны (Sarkar et al., 2004), а в случае с геном *ITS 16S-23S* рНК использовали те же условия, но температуру отжига 61°C . Определение нуклеотидных

последовательностей проводили на генетическом анализаторе 3130xl ABI (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя в компании Евроген (Россия).

Эволюционная история была выведена с помощью метода минимальной эволюции (Rzhetsky et al., 1991) в программе MEGA X с помощью алгоритма Close-Neighbour-Interchange (CNI), и показаны оптимальные деревья. Попарное генетическое расстояние между штаммами было рассчитано методом минимальной генетической дистанции Nei (Nei, 1972) с использованием программы MEGA X по гену ITS 16S-23S рРНК. Использовали алгоритм среднего арифметического (UPGMA) с бутстрепом 1000 согласно (Felsenstein et. al., 2007) с модификациями.

В анализе были использованы последовательности гена ITS 16S-23S рРНК штаммов Psg, выделенных в рамках данной работы и последовательности других видов *Pseudomonas* sp. из NCBI Genbank. Тепловая карта попарных сравнений штаммов построена в программе GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Software Inc., США). Последовательности ДНК собирали с помощью программного пакета Bioedit. Для определения величины сходства последовательностей их сравнивали с имеющимися в GenBank с помощью программы Basic Local Alignment Search Tool - BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В качестве критерия для определения видовой идентичности использовали последовательности, сходные с ранее опубликованными на >95% и являющиеся близкородственными к Psg.

Оценку вирулентности у выделенных штаммов, показавших высокую (> 95%) идентичность к штаммам группы 3 геновида 2 *P. syringae* (*P. savastanoi*) на предыдущем этапе работы, проводили по отношению к растениям сои согласно описанной в разделе 2.6 методике. Для этого штаммы выращивали на среде Кинга Б при $18 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 72 ч. Колонии суспендировали в стерильной воде, после чего доводили концентрацию до 10^8 КОЕ/мл. Определение титра бактерий проводили спектрофотометрически по ОП₆₀₀ (оптической плотности при 600 нм), измеренной с помощью спектрофотометра Nanodrop One C (Thermo FS, США). Для лучшего контакта с листом в суспензию добавляли смачивающий агент Silwet Gold (Chemtura, США) до концентрации 0,01%.

Для заражения использовали метод разрезания листьев сорта Касатка (Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ, Россия) ножницами, смоченными в суспензии каждого штамма перпендикулярно жилкам на глубину 1 см от края. Условия культивирования растений были аналогичны упомянутым выше. Положительным контролем служила суспензия штамма CFBR 2214, отрицательными – стерильная вода и суспензии штаммов других видов: *Pseudomonas fluorescens* и *P. putida* из коллекции микроорганизмов кафедры защиты растений. Искусственное заражение проводили в мае-августе 2022–2023 гг. в экспериментальных теплицах лаборатории защиты растений. Опыт повторяли двухкратно (в июне и в августе каждого года), заражая одним штаммом все листья 4-х растений. Учёт проводили на 12-е сутки после инокуляции, измеряя ширину зоны листа с симптомами при помощи штангенциркуля.

Оценку расового состава штаммов Psg по расам проводили по толерантности/восприимчивости сорта-дифференциатора к заражению каждым штаммом. Набор дифференциаторов, включавший сорта Acme, Chippewa, Flambeau, Harosoy, Lindarin, Merit и Norchief, Hardee, Peking, Centennial (Abo-Moch et al., 1995), был получен из коллекции образцов сои ФГБНУ ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова» (ВИР, Санкт-Петербург). Для определения рас патогена заражали сорта-дифференциаторы методом, описанным в разделе 2.6. По прошествии 12 дней отмечали для каждого штамма наличие (восприимчивость; S = susceptible) или отсутствие (устойчивость; R = resistant) симптомов на листе вокруг зоны разреза ножницами. Каждым штаммом заражали по 3 растения каждого сорта.

2.2. Оценка разнообразия штаммов *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Всего было проанализировано 56 образцов семян и вегетирующих растений сои и других растений. Для этого каждый образец, содержащий ~ 100 г ткани, заливали 300 мл стерильного SPS буфера (8,5 г NaCl, 991,5 мл дистиллированной воды) и перемешивали в течение 12 ч при 200 об/мин и 4°C (Fatmi et al., 2017).

Экстракт осаждали при 7000 об/мин в течение 20 мин при 4°C в центрифуге Eppendorf 5430 (Eppendorf, Германия). Надосадочную жидкость удаляли, а осадок суспендировали в 1,5 мл SPS буфера. 100 мкл суспензии с десятикратным разведением в SPS высевали на полуселективную среду MSCFF (г/л: 5 - пептон; 3 - мясной экстракт; 5 - сахароза; 15 – агар-агар; 5 - сухое обезжиренное молоко; 0,05 - конго красный (Диаэм, Россия); 0,01 - хлороталонил* (Браво, КС, Сингента); 0,01 - тиофанат-метил* (Топсин-М, СП; Nippon Soda, Япония); 0,01 - налидиксовая кислота* (Диаэм, Россия); 0,01 - нитрофурантоин* (Sigma-Aldrich, США); 0,001 - оксациллина натриевая соль* (Sigma-Aldrich); 0,001 - азид натрия) (Maringoni et al., 2006). Компоненты, отмеченные *, добавляли после автоклавирования базовой среды.

При отборе типичных колоний ориентировались на эталонный штамм C001 (CFBP 3418). Изоляты культивировали в течение 7 дней при температуре 28°C. Колонии выросшие на этой среде переносили на полуселективную среду SSM (г/л: 5,0 – рамноза; 2,0 - дрожжевой экстракт; 0,5 - KH_2PO_4 ; 2,0 - K_2HPO_4 ; 1,0 - NH_4Cl ; 10,0 – LiCl ; 0,25 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ *; 1,2 - Tris-HCl; 2,0 - азид натрия*; 0,1 - циклогексимид* (Sigma-Aldrich); 0,04 - полимиксина В сульфат* (Sigma-Aldrich); 1 мл - бромкрезоловый фиолетовый (15% раствор в этаноле; Диаэм, Россия)*; 15 – агар (Tegli et al., 1998). Компоненты, отмеченные *, добавляли после автоклавирования базовой среды. Изоляты культивировали на среде в течение 12 дней при 28°C и выросшие колонии использовали в последующих тестах.

Изоляты пересеивали трёхкратно для получения чистых культур на среде YD (г/л: 10 - дрожжевой экстракт; 20 - декстроза; 15 – агар-агар) и культивировали при 28°C в течение 48 ч. Очищенные штаммы хранили в 15% глицерине при -72 °C. Выделенные изоляты были дополнены штаммами Cff из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ; Пушкино, Россия), Французской коллекции фитопатогенных бактерий (CFBP; Veaucouzé, Франция), включая типовой штамм CFBP 3418 (C001).

Молекулярно-генетическую характеристику штаммов проводили классическими методами. ДНК выделяли из двухсуточных культур набором для

выделения «Фитосорб» (Синтол, Россия) по протоколу производителя. Первичную идентификацию проводили с использованием набора родоспецифических праймеров Curto-F2 5'-GAA ATG GTG TTA TGG CCG GAT-3' и 5'-Curto-D-R ACG GGT TAA CCT CGC CAC A-3' в соответствии с протоколом (Evseev et al., 2022). Далее штаммы были дополнительно протестированы методом ПЦР с набором праймеров, рекомендованных для выявления вида Cff: CffFOR2 5'-GTT ATG ACT GAA CTT CAC TCC-3' и CffREV4 5'-GAT GTT CCC GGT GTT CGA-3' (Tegli et al., 2002). Реакционная смесь объемом 25 мкл включала в себя 5 мкл мастер-микса 5x Mas^{DD}TaqMIX-2025 (Диалат, Россия), 0,5 мкМ каждого праймера и 50 нг ДНК. Температурно-временные параметры реакции включали этапы: начальной денатурации при 94°C в течение 3 мин, 30 циклов денатурации при 94°C в течение 1 мин; отжиг при 62°C в течение 45 с, элонгацию при 72°C в течение 30 с и финальную элонгацию при 72°C в течение 5 мин. Разделение и анализ ампликонов проводили аналогично описанным в разделе 2.1 условиям.

ПЦР-амплификацию гена аланин-синтазы (далее - *alaS*) проводили с использованием набора праймеров AS-F (5'-TTCCAGATGAACGGBAACTTC-3') и AS-R (5' TGGTTCGRTCTCGTACATGTTTG-3'), разработанного специально для данного исследования и оптимизированного для филогении *Curtobacterium*. Состав ПЦР-смеси для каждой реакции объемом 25 мкл включал 5 мкл мастер-микса 5X ScreenMix (Евроген, Россия), 17,5 мкл воды, 1 мкл ДНК (20 нг) и 0,1 мкл (100 мкМ) каждого праймера. Продукты ПЦР секвенировали методом Сэнгера в обоих направлениях на базе компании Евроген. Выравнивание последовательностей ПЦР-ампликонов *alaS* проводили с помощью программы MAFFT 7.48 с настройками AUTO (Kato et al., 2013). Филогенетическое дерево строили с помощью программы IQ-TREE 2.2.2.7 с параметрами "--alrt 1000 - B 1000" (Nguyen et al., 2015). Для оценки робастности дерева использовали сверхбыстрый бутстреппинг (1000). Визуализацию филогенетического дерева *alaS* осуществляли с помощью программы iTOL v6 (Letunic et al., 2021).

Для получения инокулюма штаммы выращивали на агаризованной среде YD при 28 (± 2) °C в течение 72 ч согласно (Hsieh et al., 2003). Колонии штаммов

суспендировали в воде и доводили до 10^8 КОЕ/мл, измеряя оптическую плотность на спектрофотометре Nanodrop One C. Для лучшего контакта с листом в суспензию добавляли смачивающий агент Silwet Gold (Chemtura, США) в концентрации 0,01%. В качестве отрицательного и положительного контроля использовали стерильную дистиллированную воду со смачивающим агентом и суспензией штамма CFBR 3418 (C001), соответственно.

Перед инокуляцией растения сои сорта Касатка выращивали, как описано в разделе 2.7. За два дня до инокуляции и через 24 часа после неё поддерживали температуру в пределах 28/22°C (днём/ночью) и относительную влажность ~95%. Растения фасоли обыкновенной сорта Пурпурная королева выращивали в торфо-перлитовом субстрате в пластиковых лотках до стадии V2. Остальные параметры выращивания и инокуляции были такими же, как и для сои. Каждый эксперимент повторяли дважды: в мае-июне и в августе-сентябре 2022 года в экспериментальных теплицах лаборатории защиты растений.

Патогенность штаммов проверяли, разрезая все листья на растениях ножницами, смоченными в бактериальной суспензии, перпендикулярно жилкам на глубину 1 см от края листа, согласно (Salah Eddin et al., 2005). Каждым штаммом инокулировали по три растения. Симптомы регистрировали на 12-й день после инокуляции, измеряя ширину зоны некроза листьев штангенциркулем на всех листьях всех растений и вычисляли среднее значение показателя для каждого штамма.

Для завершения триады Коха при подтверждении патогенности штаммов бактерии повторно изолировали из листьев с симптомами и идентифицировали как *Sff* методом ПЦР (Tegli et al., 2002) согласно (Puia et al., 2021b) с модификациями. Для этого участок ткани с симптомами поверхностно стерилизовали в 70%-ном этаноле, пятикратно промывали стерильной водой, помещали в 0,5х буфер SPS на ночь при 4°C, гомогенизировали стерильным лабораторным пестиком, фильтровали через марлю и центрифугировали в течение 15 мин при 8000 об/мин в центрифуге Eppendorf 5430 (Eppendorf, Германия). Бактериальную ДНК выделяли

с помощью набора для выделения ДНК Фитосорб в соответствии с протоколом производителя. Выделенную ДНК использовали непосредственно для ПЦР.

Оценку чувствительности штаммов к дигидроксиду меди (Cu(OH)₂) in vitro проводили по методике (CLSI, 2015) с изменениями. Для этого фунгицид на основе дигидроксида меди (350 г/кг) (Косайд 2000, ВДГ; Corteva Agriscience, США) разводили в жидкой среде YD в соотношении 1:1 (14 разведений). По одной двухсуточной колонии каждого штамма суспендировали в 5 мл бульона YD и инкубировали в течение 24 ч при 28°C и 150 об/мин в орбитальном шейкере-инкубаторе ES-20 (BioSan, Латвия). Суспензии бактерий разбавляли бульоном YD до получения значения ОП₆₀₀ ~ 0,05, что соответствовало концентрации ~ 10⁵ КОЕ/мл.

Жидкую среду YD (90 мкл), разведения препаратов (100 мкл) и суспензии отдельных штаммов (10 мкл) добавляли в стерильные пробирки объемом 2 мл. Общий объем культуральной смеси составлял 200 мкл. Испытывали концентрации: 50000; 25000; 12500; 6250; 3125; 1562,5; 781,25; 390,6; 195,3; 97,6; 48,8; 24,4; 12,2 и 6,1 ppm (в пересчёте на д.в.). Пробирки, содержащие 200 мкл жидкой среды YD (без агара), использовали в качестве отрицательного контроля для каждой повторности, а пробирки, содержащие 190 мкл жидкой среды YD и 10 мкл суспензии каждого штамма – в качестве положительных контролей. Пробирки тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 48 ч при 28°C и 350 об/мин в шейкере-инкубаторе ThermoMixer F 2.0 (Eppendorf, Германия).

По окончании инкубации отбирали по 10 мкл смеси из каждой пробирки и разбавляли десятикратно стерильной водой в отдельных пробирках объёмом 2 мл. По 100 мкл из каждой пробирки с разбавлением переносили в чашки Петри со средой YD и распределяли по всей поверхности среды с помощью шпателя. Чашки помещали в термостат при температуре 28°C на 48 ч. Затем оценивали рост и рассчитывали концентрацию бактерий в каждой пробирке. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) определяли как наименьшую концентрацию Cu(OH)₂, которая приводила к 90 % ингибированию роста по сравнению с контролем. Минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) определяли как

наименьшую концентрацию $\text{Cu}(\text{OH})_2$, при которой погибало 99,9% бактерий. Испытания проводили в четырёх повторностях для каждого штамма. Чувствительными к дигидроксиду меди считали штаммы со значениями МИК ≤ 390 ppm.

2.3. Оценка вредоносности бактериальных болезней сои при искусственном заражении в условиях Московской области

Исследование проводили на базе опытного поля лаборатории защиты растений в 2020-2021 гг. Почва опытного участка по гранулометрическому составу – дерново-подзолистая, легкосуглинистая, в пахотном слое содержалось в среднем от 1,8 до 2,1 % гумуса. Содержание P_2O_5 – 286-288 мг/кг, калия - 79,5 до 101 мг/кг почвы, а рН солевой вытяжки почвы варьировал в пределах 5,5-5,8. Все операции по уходу за культурой проводили вручную.

Климатические условия во время проведения опыта в целом отличались от средних многолетних данных. К примеру, 2020 год в начале вегетации отличался от средних многолетних данных повышенным количеством осадков (3 декада мая-3 декада июля; 120,0 – 64,0 мм соответственно), а в 2021 году значения осадков были больше во вторую половину вегетации (1,2 декады августа, 3 декада сентября и 3 декада октября; 36,0, 50,0 и 36,0 мм соответственно) (прил. А). По среднесуточной температуре в первую половину и середину вегетации (1 декада мая – 3 декада августа) значения температуры были выше в 2021 году в сравнении со средними многолетними данными (15,0-25,0 °С в 2021 году и 13,0-20,0 °С по средним многолетним данным), а в 2020 году более жарким был конец вегетации (1 декада сентября – 3 декада октября; 18,0-7,0 °С) в сравнении со средними многолетними значениями в тот же период (14,5-4,0 °С) (прил. Б). Климатические данные за годы проведения исследований были любезно представлены метеорологической обсерваторией имени В.А. Михельсона.

Опыт проводили на растениях сои сорта Касатка. Предшественником служил ранний картофель. Подготовка почвы включала в себя вспашку с оборотом пласта с осени и двукратную культивацию зяби весной.

Посев осуществляли 31 мая (2020 год) и 18 мая (2021 год) на глубину 3-4 см при ширине междурядий 45 см и норме высева семян 65 кг/га. Подготовка семян к посеву включала в себя обработку фунгицидным протравителем Делит Про, КС при норме расхода 0,5 л/т для защиты от корневых гнилей и плесневения семян. Применяли превентивную нетрадиционную систему защиты сои с упором на фунгициды для снятия эффекта контаминации и неравномерного распределения грибных патогенов между вариантами опыта с интервалом между обработками в 15 дней начиная, с фазы двух настоящих листьев. Схема фунгицидной защиты в период вегетации была следующей: Колосаль Про, КМЭ, Оптимо, КЭ (0,5 л/га), Зантара, КЭ (1 л/га), Пиктор Актив, КС (0,6 л/га). Инсектицид Борей Нео, СК (0,1 л/га) применяли для борьбы с тлей. Десикацию проводили препаратом Дикват, ВРК (0,2 л/га) за 14 дней до уборки.

Для заражения использовали штаммы Psg CFBR 2214 и Cff CFBR 3418. Суспензию бактериальных клеток 2-х суточных культур готовили в стерильной воде первоначальным разведением до $ОП_{600} = 0,5$ и последующим доведением до концентрации 10^8 КОЕ/мл. Инокуляцию патогенами проводили 17 июня (2020 год) и 27 июня (2021 год) в вечерние часы с помощью ручного опрыскивателя, равномерно смачивая листья. Распространённость рассчитывали, как процентное соотношение растений с симптомами к общему количеству растений. Интенсивность поражения листьев оценивали в баллах по шкале (Price et al., 2016). Учёты проводили каждые 18 дней с первого появления симптомов на растениях.

Уборку проводили 29 сентября (2020 год) и 3 октября (2021 год), анализируя структуру урожая по всем опытным растениям. Опыт проводили в двукратной повторности по 12 м² в каждой.

2.4. Оптимизация этапов лабораторного анализа семян сои на выявление фитопатогенных бактерий (на примере возбудителя бактериального ожога сои)

Для проведения анализа использовали реакционную смесь, условия амплификации и методику визуализации аналогичные приведённым в разделе 2.1. Анализ проводили на амплификаторах «T100 Thermal Cycler Bio-RAD» (Applied

Biosystems, США) и «Nyxtechnik» АТС 201 (Nyx Technik Inc., США). Повторность эксперимента – двукратная.

Определение оптимального метода выделения патогена проводили на искусственно зараженных семенах. Искусственное заражение семян проводили способом, описанным в разделе 2.7.

Для определения оптимального метода выделения патогена из семян использовали следующие варианты пробоподготовки: 1) встряхивание семян с буфером на шейкере и 2) разрушение семян в буфере, рекомендованное ЕРРО для выявления *C. flaccumfaciens* рв. *flaccumfaciens* в партиях семян фасоли (ЕРРО, 2011). При использовании первого метода 200 г искусственно заражённых семян сои с внутренней и внешней инфекцией помещали в колбу, заливали 300 мл SPS-буфера и ставили на шейкер при +4°C на 12 ч при 180 об/мин. При втором способе семена заливали буфером и помещали на 12 ч при +4°C. После набухания раствор с семенами переносили в пакеты BagFilter S (Interscience, Франция) и разрушали в гомогенизаторе BagMixer 400 P (Interscience) в течение 300 с. В обоих случаях затем фильтровали с использованием стерильных ватных фильтров, суспензию концентрировали при 8000 об/мин, надосадочную жидкость удаляли, а осадок растворяли в 1,5 мл SPS-буфера, центрифугировали при 13000 об/мин и удаляли надосадочную жидкость. Из полученных экстрактов семян выделяли ДНК с помощью набора Проба-ГС в соответствии с инструкцией производителя и проводили ПЦР в соответствии с условиями, приведёнными ранее.

Для определения оптимальной пары «метод выделения ДНК - мастер-микс» из экстракта семян с внутренней инфекцией и экстракцией с помощью гомогенизатора выделяли ДНК пятью различными наборами и методами (Тараканов и др., 2022в). В качестве вариантов опыта использовали 3 коммерческих набора: Проба ГС (ООО "АгроДиагностика"), Фитосорб и Цитосорб (ООО "Синтол") и 2 метода: нагревание в NaOH ("термолизис") и модифицированный SDS-СТАВ (mSDS-СТАВ). В вариантах с использованием коммерческих наборов следовали инструкциям производителей. При методе с нагреванием в NaOH (термолизис) к экстракту добавляли NaOH до концентрации 50 мМ и помещали в

твердотельный термостат при 96°C на 10 мин (Asadzadeh et al., 2010). В случае модифицированного метода mSDS-CTAB следовали протоколу (Tsygankova et al., 2004). В анализе также использовали 2 мастер-микса: 5x Master Mix (5x Mas^{DD}TaqMIX-2025, (Диалат)) и 5x ScreenMix-HS (Евроген). Таким образом было проанализировано 10 вариантов (2 мастер-микса x 5 методов выделения ДНК). Объем праймеров подбирали путём варьирования от 0,5 до 2 мкл на реакцию (Тараканов и др., 2024а).

Определение оптимального метода выделения ДНК при различной локализации патогена в семенах сои проводили из семян с внутренней и внешней инфекцией выделяли ДНК с помощью 5 различных наборов и методов, описанных в ранее. Количество вариантов эксперимента составило 20 (5 методов выделения x 4 варианта локализации и метода экстракции патогена). После выделения ДНК проводили ПЦР при ранее описанных условиях. Графические изображения результатов электрофореза визуализировали денситометрическим методом и анализировали в программе IMAGEJ2 (National Institute of Health, США) в соответствии с протоколом (Rueden et al., 2017).

2.5. Разработка мультиплексной ПЦР в реальном времени для диагностики возбудителей бактериозов в семенах сои

Штаммы бактерий, использованные в работе, были получены из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ; Пушкино, Россия), Французской коллекции фитопатогенных бактерий (CFBP; Бокузе, Франция), Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ, Германия), Американской коллекции типовых культур (ATCC, США) и Национальной коллекции фитопатогенных бактерий (NCPPB, Великобритания). Некоторые оригинальные штаммы были выделены и описаны нами в рамках этого исследования. Среди 43 штаммов различного географического происхождения 25 относились к целевым видам (13 штаммов Psg и 12 штаммов Cff); 15 штаммов принадлежали к родственным видам, а 13 – к нецелевым бактериям, встречающимся в виде эпифитов на растениях. Другие варианты анализа включали

25 коммерческих партий семян (три Psg/Cff-положительных и 22 – Psg/Cff-отрицательных).

Для поиска видоспецифичных последовательностей были созданы собственные базы данных с использованием BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения 25 февраля 2023 г.)). Поиск видоспецифичных регионов для амплификации проводили по схеме, представленной в работе (Lukianova et.al., 2021). Праймеры и зонды генерировали с помощью программы Primer3Plus (<https://primer3.ut.ee/> (дата обращения: 15 марта 2023 г.)) и вручную проверяли на соответствие температур плавления и отсутствие образования шпилек и димеров с помощью функций Geneious Prime и Primer Biosoft (<http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/>) и AnalyzePrimerServlet (доступ получен 20 марта 2021 г.)).

Для конструирования праймеров к *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg) был выбран ген, кодирующий 2-оксоглутарат-зависимый этилен/сукцинат-образующий фермент (далее – *efe*). Набор праймеров и зонды, использованные для ПЦР-диагностики Cff, были сконструированы на основе ПЦР-протокола, разработанного Tegli и др. (2002) с использованием в качестве таргетного - гена трипсиноподобной сериновой протеазы (далее – *tlsp*) и прилегающей к нему 3'-некодирующей области.

Оптимизацию дуплексной классической ПЦР проводили с использованием модифицированной схемы эксперимента Тагучи (Cobb and Clarkson, 1994). Метод Тагучи — одна из лучших экспериментальных методик выявления основных факторов, влияющих на признаки при минимальном количестве проводимых экспериментов. Этот метод помогает найти оптимальные параметры наиболее важных факторов ПЦР-анализа в факторном эксперименте внутри ортогонального массива. Для эксперимента были выбраны четыре критических параметра мультиплексной ПЦР в реальном времени в девяти комбинациях: 1) MgCl₂, 2) dNTP и концентрация праймеров для 3) Psg и 4) Cff. Каждый фактор имел три уровня (концентрации): MgCl₂ (1,25, 2,5 и 3,75 мкМ), dNTP (200, 300 и 400 мкМ), праймеры

Psg2F+Psg2R и Cff1F+Cff1R (10,0, 20,0 и 30,0 пмоль на реакцию для каждой пары) (табл. 1 и 2).

Таблица 1. Ортогональная схема оптимизации классической ПЦР согласно модели Тагучи

Номер реакции	Тестируемая реакция				Коды факторов			
	1. MgCl ₂ , мкМ	2. dNTP, мкМ	3. Праймеры Psg2F+Psg2R, пмоль	4. Праймеры Cff1F+Cff1R, пмоль	1	2	3	4
1	1,25	200	10,0	10,0	A	A	A	A
2	1,25	300	20,0	20,0	A	B	B	B
3	1,25	400	30,0	30,0	A	C	C	C
4	2,50	200	20,0	30,0	B	A	B	C
5	2,50	300	30,0	10,0	B	B	C	A
6	2,50	400	10,0	20,0	B	C	A	B
7	3,375	200	30,0	20,0	C	A	C	B
8	3,75	300	10,0	30,0	C	B	A	C
9	3,75	400	20,0	10,0	C	C	B	A

Таблица 2. Компоненты 9 вариантов ПЦР реакций согласно модели Тагучи

№ реакции	Компоненты реакционной смеси (на 25 мкл), мкл на реакцию							
	SmarTaq полимера за (C=1,25 U)	MgCl ₂ (C=50 мкМ/мкл)	Праймеры Psg2F+Psg2R (C=5 пмоль/мкл)	Праймеры Cff1F+Cff1R (C=5 пмоль/мкл)	dNTP, (C=100 мкМ/мкл)	ДНК (C=10 нг/мкл) каждого	10x ПЦР буфер	Вода для ПЦР
1	1	0,625	1+1	1+1	2	1+1	2,5	12,875
2	1	0,625	2+2	2+2	3	1+1	2,5	7,875
3	1	0,625	3+3	3+3	4	1+1	2,5	2,875
4	1	1,25	2+2	2+2	2	1+1	2,5	8,25
5	1	1,25	3+3	3+3	3	1+1	2,5	3,25
6	1	1,25	1+1	1+1	4	1+1	2,5	10,25
7	1	1,875	3+3	3+3	2	1+1	2,5	3,625
8	1	1,875	1+1	1+1	3	1+1	2,5	10,625
9	1	1,875	2+2	2+2	4	1+1	2,5	5,625

Температурно-временные параметры каждой стадии приведены ранее. Все ПЦР-анализы проводили с использованием коммерческого набора «Hot-start PCR Color» (Диалат, Россия). Ампликоны разделяли и анализировали как описано в

разделе 2.1. Изображения анализировали денситометрическим методом с помощью программы ImageJ2. Для дальнейшей амплификации использовали реакционную смесь для ПЦР с лучшим соотношением сигнал/шум.

Оптимизацию температуры отжига и оценку специфичности проводили с использованием ДНК, выделенной на предыдущем этапе.

Поиск оптимальной температуры для проведения ПЦР был проведён в диапазоне температур отжига от 58,0 до 63,0 °С. Эксперимент повторяли пятикратно. Для дальнейших экспериментов использовали температуру, обеспечивающую наименьшую среднюю температуру отжига при наименьшем значении порогового цикла (Ct).

Температурно-временной профиль реакции был следующий: 95°C - 10 мин (начальная денатурация); 40 циклов 95°C – 30 сек, 60°C – 2 мин; 72°C – 30 сек; и финальная элонгация при 72°C – 5 мин. Флуоресценцию измеряли после этапа отжига праймеров на каждом цикле. Пороговые значения выбирались вручную для каждого зонда TaqMan.

Специфичность мультиплексного ПЦР-анализа в реальном времени проверяли на 43 штаммах. ДНК для анализа выделяли из трехсуточных бактериальных культур с использованием коммерческого набора «ГС-Проба» по инструкции производителя. Концентрацию и чистоту образцов ДНК оценивали с помощью спектрофотометра Nanodrop One C. Все образцы имели соотношение A 260/280 ~1,8 и были доведены до концентрации 10 нг/мкл. Каждый тест на специфичность повторяли три раза.

Все штаммы также были проверены с помощью классического ПЦР-анализа с использованием ранее опубликованных протоколов. Протокол, разработанный С. Bereswill был использован для амплификации гена-мишени *cfl* в Psg (Bereswill et al., 1994), а для гена *tlsp* использовали протокол S. Tegli - для Cff (Tegli et al., 2002). Анализ повторяли трёхкратно и амплифицированную ДНК анализировали, как описано в разделе 2.1. В качестве положительного контроля использовали геномную ДНК штаммов NCPPB 2411 (CFBP 2214) (Psg) и CFBP 3418 (Cff), а в качестве отрицательного контроля - стерильную дистиллированную воду. Результат

классической ПЦР был положительным, если размер ампликонов составлял ~650 п.н. для Psg и ~300 п.н. для Cff, определённый при сравнении размера продукта с маркером молекулярного веса «100 bp+ Ladder» (ООО «Диалат», Россия).

Оценку чувствительности дуплексной и мультиплексной ПЦР в реальном времени проводили с использованием зондов TaqMan в режиме реального времени при помощи амплификатора CFX96 Touch (BioRad, США) с использованием температурно-временного профиля, описанного ранее. Эффективность ПЦР рассчитывали путём построения стандартной кривой с использованием программного обеспечения CFX Maestro™ (BioRad).

Очищенную геномную ДНК Psg (NCPPB 2411) и Cff (CFBP 3418) доводили с помощью воды, не содержащей нуклеазы, до концентрации 100 нг/мкл и использовали для проведения серийных 10-кратных разведений. Каждое разведение применяли в качестве матрицы для дуплексной ПЦР или ПЦР в реальном времени в трех независимых повторностях.

Концентрацию жизнеспособных бактериальных клеток в образцах оценивали для штаммов Psg NCPPB 2411 и Cff CFBP 3418. Бактерии собирали стеклянным шпателем после 4-х суточного культивирования на среде Кинга Б при 28 °С и суспендировали в 10 мкМ PBS буфера. Серийные десятикратные разведения готовили в 10 мкМ PBS буфере и по 100 мкл каждого разведения высевали на среду Кинга Б. Бактериальную суспензию распределяли стерильным шпателем по среде и инкубировали при 28 °С в течение 96 ч. Колонии бактерий подсчитывали и использовали для расчёта концентрации в каждом разведении. Каждую суспензию использовали для анализа количественной ПЦР в реальном времени, как описано в (Holeva et al., 2019) с модификациями. Для этого, к 23 мкл реакционной смеси для ПЦР добавляли 2 мкл бактериальной суспензии. Эксперимент повторяли трёхкратно.

Для оценки чувствительности протокола в экстракте семян, использовали свободные от патогенов семена сои, собранные в 2021 году в Рамонском районе Воронежской области с поля 2-й репродукции сои сорта Султана (Societe Ragt 2n S.A.S., Франция). Проверку отсутствия контаминации семян проводили согласно

протоколу EPPO PM 7/102 (1), который был разработан для диагностики Cff в семенах бобовых (EPPO, 2011) и согласно (Ignjanov et.al., 2007).

Образец семян (200 г) помещали в пластиковый пакет для гомогенизации с боковым фильтром BagFilter S; затем добавляли 300 мл SPS-буфера и оставляли на ночь при +4,5°C. После инкубации образец гомогенизировали в течение 5 минут с помощью BagMixer 400 P (Interscience, Франция). Фильтрат переносили в пробирки типа Falcon объемом 50 мл и центрифугировали 20 мин при 10 000 g и +4 °C. Полученный осадок ресуспендировали в 1,5 мл SPS-буфера. Образцы (по 500 мкл каждый) с различными концентрациями целевых бактерий получали путём смешивания 495 мкл экстракта семян и 5 мкл бактериальной суспензии для получения конечных концентраций в диапазоне от 10^5 до 10^1 КОЕ/мл.

Эти образцы использовали для экстракции ДНК с использованием коммерческого набора с магнитными частицами «Фитосорб» (ООО «Синтол», Россия) согласно инструкции производителя. Для проведения ПЦР к 23 мкл реакционной смеси ПЦР добавляли 2 мкл выделенной ДНК. В качестве отрицательного контроля использовали экстракт семян сои, не содержащий патогены. Значения порогового цикла для ПЦР в реальном времени использовали для построения калибровочной кривой эффективности реакции. Эксперимент проводили в двух повторностях.

Всего с использованием описанных выше методов проанализировали 25 образцов семян сои, произведённых в разных географических регионах России. Результаты, полученные при использовании новой мультиплексной ПЦР в реальном времени, были проверены с использованием ранее опубликованных протоколов для Psg (Bereswill et al., 1994) и Cff (Tegli et al., 2002). Эталонные штаммы Psg (NCPPB 2411) и Cff (CFBR 3418) использовали в качестве положительного контроля, а стерильную дистиллированную воду - в качестве отрицательного контроля. Эксперимент был повторён трёхкратно.

2.6. Оценка устойчивости сортов сои к бактериальным болезням

Сравнение способов создания инфекционного фона проводили с использованием 3 штаммов Psg - CFBP 2214, G2, G17 и Cff - CFBP 3418, C086 и C089.

Штаммы бактерий выращивали на среде Кинга Б при 18 (± 2)°C 72 часа, суспендировали в воде до концентрации 10^8 КОЕ/мл, измеренной при помощи спектрофотометра Nanodrop One C. Для лучшего контакта с листом в суспензию добавляли смачивающий агент Silwet Gold (Chemtura, США) до концентрации 0,01%. Перед заражением растения сорта Касатка выращивали как описано в разделе 2.7.

Сравнивали несколько методов искусственного заражения растений. В первом варианте проводили инфильтрацию суспензии в мезофилл листа при помощи медицинского инъекционного шприца согласно (Chincinska et al., 2021). Данный метод обычно применяется для проверки патогенности бактерий, поражающих листья. Во втором варианте ножницы замачивали в суспензии бактерий и срезали ими лист перпендикулярно жилкам на глубину 1 см от края, как в случае проверки патогенности *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Salah Eddin et al., 2005). В третьем варианте стерильный пинцет и вату опускали в колбу с суспензией бактерий, вату накручивали на оба зубца пинцета и сжимали лист сверху и снизу ими в нескольких местах для создания поранений и возможности суспензии проникнуть в лист. В четвёртом варианте суспензию при помощи шприца вводили в черешок пары примордиальных листьев (Huang et al., 2003). В пятом варианте проводили инфильтрацию бактерий при помощи аэрографа 1113 AirControl (JAS, Китай), описанную для инокуляции *Pseudomonas syringae* (Shine et al., 2015) с модификациями. Для этого тройчатые листья сои заражали на стадии V2, прижимая лист к плоской поверхности (чашке Петри), чтобы избежать повреждения давлением от распыления аэрографа. Все листья были инокулированы из расчёта 5 мл суспензии с концентрацией 10^9 КОЕ/мл на растение. Отрицательный контроль опрыскивали эквивалентным количеством воды с использованием смачивающего агента. За два дня до и через 24 ч после инокуляции относительную влажность в теплице поддерживали на уровне ~95%

при температуре 28/22°C.

Оценку площади поражения инокулированных листьев проводили на 12-й день после заражения, используя приложение LeafDoctor (<https://www.quantitative-plant.org/software/leaf-doctor>, дата обращения 21 октября 2021 года), установленное на iPhone SE 2 в соответствии с инструкцией производителя (Sibiya et al., 2019). Анализировали 3 повторности по 2 растения в каждой. Для дальнейшей инокуляции сортов коллекции использовали метод, обеспечивший наибольшую площадь поражения листа при наименьших затратах рабочего времени.

Образцы партий семян сои производства 2020-2021 гг. из Орловской, Курской, Воронежской и Рязанской областей, Ставропольского и Хабаровского краёв были предоставлены семеноводческими хозяйствами. Информацию о характеристиках сортов получали с сайта Госсорткомиссии (Государственный реестр селекционных достижений. <https://reestr.gossortrf.ru/> (дата обращения 2 Августа 2022)). После сбора семена хранили в бумажных пакетах без доступа света и влаги при +4°C. Полная характеристика сортов, использованных в исследовании представлена в прил. В. Опыты по оценке устойчивости проводили в мае-августе 2021-2022 гг. в экспериментальных теплицах лаборатории защиты растений (Тараканов, 2022а).

Растения культивировали аналогично условиям, указанным в разделе 2.7. Для заражения использовали метод разрезания листа ножницами, смоченными в суспензии бактерии, показавший хорошие результаты на этапе выбора способа инокуляции. За два дня до и через 24 ч после инокуляции относительную влажность поддерживали на уровне ~95% при температуре 28/22°C. Опыт повторяли дважды: в июне и в августе, заражая все листья 4 растений каждого сорта. Учёт проводили на 12 сутки после инокуляции, измеряя ширину зоны листа с симптомами при помощи штангенциркуля.

2.7. Использование бактериофагов в защите сои от бактериального ожога сои

Выделение бактериофагов, специфичных к Psg, проводили из образцов почвы, взятых с полей, поражённых бактериальным ожогом сои. Географические

координаты мест отбора проб были на Дальнем Востоке: 50°10'18" северной широты, 128°00'19" восточной долготы (Амурская область, Россия, фаг P421); 44°07'37" северной широты, 132°01'04" восточной долготы (Приморский край, Россия, фаг P311) и в Центрально-Чернозёмном регионе: 51°10'04" северной широты, 37°49'51" восточной долготы (Белгородская область, Россия, фаг P413).

Размножение фагов проводили с использованием штамма Psg CFBP 2214 в качестве хозяина при 28°C в жидкой среде Кинга Б в соответствии с ранее опубликованным протоколом (Van Twest et al., 2009). Фаговый лизат обрабатывали хлороформом, а остатки бактерий осаждали путём центрифугирования при 8000×g в течение 20 мин с последующей фильтрацией супернатантов через мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм (Millex-GV, Ирландия) и добавлением ДНКазы I (0,5 мг/мл, 1 ч). Фильтраты фагов концентрировали ультрацентрифугированием при 100 000×g при 4°C в течение 2 ч с использованием ротора Beckman SW28 (Beckman Coulter, США). Дальнейшую очистку фагов проводили ультрацентрифугированием в ступенчатом градиенте CsCl (0,5–1,7 г/мл) при 22 000×g в течение 2 ч; опалесцирующую полосу фага собирали и диализировали в SM буфере (10 mM Трис-HCl; pH 7,5; 10 mM MgSO₄; 100 mM NaCl). Суспензию фага хранили при 4°C.

Электронно-микроскопическую характеристику изолятов проводили для оценки морфологии выделенных фагов методом просвечивающей электронной микроскопии с негативным контрастированием. Аликвоты очищенных фагов загружали на покрытую углеродом медную сетку, подвергали воздействию тлеющего разряда, а затем отрицательно окрашивали 1% уранилацетатом в течение 30 с и высушивали на воздухе. Подготовленные сетки исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEM-2100 на 200 кВ (JEOL, Япония). Размеры каждого фага были усреднены среди ~20 индивидуально измеренных частиц. Электронная микроскопия выполнена Е.Е. Куликовым (Московский физико-технический институт, Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН), микрофотографии опубликованы в статьях, написанных совместно с автором диссертации.

Специфичность фагов P311, P413 и P421 была протестирована в отношении ряда коллекционных штаммов Psg, других патогенных микроорганизмов видов *P. savastanoi* и *P. syringae*, фитопатогенных видов *Pseudomonas* sp. и других бактерий с использованием метода двухслойного агара. Для этого, 300 мкл суспензии штаммов, выращенных в среде YD (YDC без CaCO₃) при 28°C до ОП₆₀₀~0,3, смешивали с 4 мл верхнего агара (жидкая среда YD с добавлением агара до концентрации 0,6%) и выливали на нижний агар YD. Затем суспензию фага (~10⁶ бляшкообразующих единиц (БОЕ) на мл) наносили на поверхность верхнего агара и инкубировали при 28°C в течение 24 ч. Штаммы *Bradyrhizobium japonicum* выделяли из коммерческих препаратов, используемых для инокуляции семян сои путём культивирования на селективной среде BJSM (Tong et al., 1994). Затем изоляты очищали путём трёхкратного пересева, и чистые культуры использовали для дальнейшего анализа.

Эксперименты по адсорбции фагов и одноэтапному росту проводили на штамме Psg CFBR 2214. Для этого, образцом фага P421 инокулировали растущую культуру штамма с приблизительной множественностью инфекции (multiplicity of infection; далее по тексту - MOI) 0,1 и инкубировали при 28°C в орбитальном шейкере-инкубаторе ES-20. Каждую минуту отбирали 100 мкл образца и смешивали с 850 мкл SM-буфера и 50 мкл хлороформа. После центрифугирования супернатанты титровали для дальнейшего определения неабсорбированных фагов путём десятикратных разведений и их посева на двуслойный агар (Adams et al., 1959). Эксперимент повторяли трёхкратно.

Для определения одношаговых кривых роста фагов, ночную культуру Psg CFBR 2214 в фазе экспоненциального роста (ОП₆₀₀~0,2 ~ 10⁴ КОЕ/мл) инфицировали фагом P421 при MOI = 0,1. Затем смесь инкубировали при 28°C на шейкере, собирали аликвоты каждые 10 мин, охлаждали в холодильнике до 4°C, концентрировали центрифугированием (21000×g, 3 мин, 4 °C), а надосадочную жидкость титровали с использованием двуслойного YD. Количество бляшек подсчитывали после инкубации в течении ночи при 28°C. Процедуру проводили в трёхкратно и результаты усредняли. Латентный период определяли как интервал

между адсорбцией фагов бактериальными клетками и высвобождением потомства фага. Значение вспышки численности фага определяли как отношение среднего количества свободных частиц фага после фазы высвобождения к их количеству во время латентной фазы.

Стабильность фага в стрессовых условиях оценивали (i) путём инкубации образца фага (10^6 КОЕ/мл в SM-буфере) при 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60 и 70°C в течение одного часа в инкубаторе Thermomixer F 2.0 (Eppendorf, Германия); (ii) путём добавления ряда буферных растворов (20 мМ Трис-HCl/20 мМ цитрата Na/20 мМ фосфата Na), доведённых NaOH до pH в диапазоне от 2-12 в суспензию фага с концентрацией 10^7 БОЕ/мл, с последующей инкубацией при 25°C в течение одного часа; (iii) путём воздействия на образец фага (10^6 БОЕ/мл в SM буфере) УФ-В-излучением (280-315 нм) с использованием лампы PL-S9W/12/2p (Philips, Нидерланды) в соответствии с (Orynbayev et al., 2020). Обработанные фаги титровали методом анализа бляшек на двуслойном YD агаре с CFBP 2214. Эксперименты повторяли трёхкратно и результаты усредняли.

Эксперименты по оценке эффективности применения фага в борьбе с бактериальным ожогом сои проводили в период с мая по август 2021 года.

Искусственное заражение семян сои проводили в соответствии с (Rooney, 2021) с некоторыми изменениями. Культуру штамма Psg CFBP 2214 выращивали в течение трёх дней при 18°C на среде Кинга Б (Ullrich et al., 2000). Бактерии ресуспендировали в стерильном 10 мМ растворе $MgCl_2$ до $\sim 10^4$ КОЕ/мл. Семена сои сорта Касатка промывали в 75% этаноле в течение 2 мин, затем этанол сливали и добавляли водный 50% отбеливатель/0,002% Твин 20 и осторожно перемешивали в течение 8-10 мин. Семена промывали двукратно в дистиллированной воде для удаления отбеливателя и оставляли во влажной камере на 2 ч, чтобы они набухли. Набухшие семена прокалывали стерильной зубочисткой в двух местах и помещали в коническую колбу. К семенам добавляли бактериальную суспензию до полного покрытия семян в растворе и помещали колбу в вакуумную камеру при 10^5 Па на 10 мин. Обработанные семена подсушивали на бумажных полотенцах для удаления излишней жидкости.

Бактериофаги наносили на инфицированные семена сои путём смешивания суспензии фага и семян (13 мл/кг семян) в пробирке типа Falcon и перемешиванием на вортексе. Семена высевали в дерново-перлитовый субстрат (Велторф, Россия) в пластиковые лотки для культивирования на 40 ячеек (объем ячейки - 0,12 л; Агрофлорапак, Россия). Опыт включал три варианта: обработку фагом в концентрации 10^7 , 10^8 и 10^9 БОЕ/мл и контрольный вариант (обработку водой). Опыт проводили в трех повторностях по 40 семян в каждой (по 1 лотку).

Заражение Psg вегетирующих растений сои сорта Касатка проводили путём инфильтрации суспензии бактерии в лист сои с использованием аэрографа AirControl 1113 (JAS, Китай) в соответствии с (Shine et al., 2015) с некоторыми изменениями. Бактериальную суспензию готовили так же, как и для заражения семян, но с добавлением смачивателя Silwet Gold (Chemtura, США) до концентрации 0,01%. На стадии V2 заражали тройчатые листья, прижимая лист к чашке Петри, чтобы избежать повреждения распылителем аэрографа. Все листья были инокулированы средней дозой 7 мл суспензии с концентрацией 10^9 КОЕ/мл на тройчатый лист. Отрицательный контроль обрабатывали эквивалентным количеством воды с использованием смачивателя. Растения выращивали в пластиковых горшках объемом 0,5 л на дерново-перлитовом субстрате в теплице при средней температуре днём/ночью 25/20°C и при естественном освещении без удобрений. Полив проводили дождеванием ежедневно по мере необходимости. За два дня до и через 24 ч после инокуляции поддерживали относительную влажность на уровне ~95% при постоянной температуре 27°C.

Эффективность применения фага на вегетирующих растениях проводили путём обработки 25-дневных растений сои фагом за 12 ч до инокуляции бактерией. Затем на каждое растение опрыскивателем наносили по 5 мл суспензии фага. Дальнейшее культивирование растений проводили согласно условиям, упомянутым ранее. Были изучены четыре варианта (обработка водой (контроль) и фагом в концентрации 10^7 , 10^8 и 10^9 БОЕ/мл) в 3 повторностях по 20 растений в каждом.

Распространённость рассчитывали, как процент растений, у которых проявлялись симптомы на листьях. Оценку интенсивности поражения заболеванием рассчитывали с помощью приложения LeafDoctor (<https://www.quantitative-plant.org/software/leaf-doctor>, дата обращения 21 октября 2021 года), установленного на iPhone SE 2 в соответствии с инструкцией производителя (Sibiya et al., 2019) согласно разделу 2.6. В эксперименте с обработкой семян были проведены аналогичные расчёты, но при достижении стадии V3 (т.е. через 35 дней после посева).

2.8. Использование фагов в защите сои от ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания

Бактериофаг Аука, специфичный к Cff, был выделен из образца почвы, взятого с унавоженного поля в Пензенской области. Фаг размножали с использованием штамма C089 при 26°C. Культивирование, очистку, электронную микроскопию и определение биологических свойств (диапазона хозяев, адсорбции, одностадийного роста, стабильности в стрессовых условиях, филогении) фага проводили как описано в разделе 2.7.

Для оценки безопасности применения фага в отношении азотфиксаторов применяемых для обработки семян сои, использовали штамм *Bradyrhizobium japonicum* Semia 5079 и штаммы из трёх коммерческих инокулянтов, разрешённых для применения на сое: Атува (Сингента), Хайстик Соя (БАСФ) и Planteco Соя MC09 (Planteco, ООО «Биопрепарат»). Выделение чистых культур из инокулянтов проводили согласно разделу 2.7.

Множественность инфекции (MOI) определяли как отношение вирусных частиц к клеткам-хозяевам (Birge, 2000). Для этого, штамм C089 выращивали в жидкой среде YD при 26°C до 10^8 КОЕ/мл. Клетки ранней log-фазы инфицировали фагом Аука в пяти различных соотношениях (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, и 100 БОЕ/КОЕ). После инкубации в течение 6 ч при 26°C лизат фага центрифугировали при $21\ 000\times g$ в течение 3 мин при 4°C. Надосадочную жидкость фильтровали (0,22 мкм Millex-GV, Millipore, Ирландия) и титровали ее с использованием верхнего агара YD. Все анализы проводились в трех экземплярах. MOI, показавший

наибольший титр фага в течение 6 ч, считался оптимальным и использовался в последующих экспериментах.

Эксперименты по оценке эффективности применения фага проводили в период с марта по июнь 2022 года на сое сорта Касатка (средняя масса 1000 семян для сорта Касатка составляла $\sim 122,4$ г) в экспериментальных теплицах лаборатории защиты растений.

Метод, описанный в (Hsieh et al., 2003) с модификациями, был использован для искусственного заражения семян. Для этого штамм Cff C089 выращивали в течение 72 часов при $20\pm 2^\circ\text{C}$ на агаризированной среде YD. Бактериальные суспензии получали путём разведения в стерильной воде и доведения концентрации до 10^8 КОЕ/мл. Рубчик каждого семени прокалывали стерильной иглой и семена замачивали в бактериальной суспензии (полностью погружая) на 1 час. Затем смесь помещали в вакуум при $\sim 10^5$ Па на 10 мин и семена высушивали на бумажных полотенцах для удаления излишней жидкости.

Эксперимент по борьбе с Cff при помощи фага включал четыре варианта: (1) обработка незаражённых Cff семян водой (отрицательный контроль); (2) обработка заражённых Cff семян водой (положительный контроль); (3) обработка заражённых семян фагом (концентрация 10^9 БОЕ/мл) и (4) обработка заражённых семян стандартным бактерицидом (Косайд 2000, ВДГ) в концентрации 10 г/л, согласно (Estefani et al., 2007).

Обработку фагом заражённых семян проводили следующим образом: 25 г семян взвешивали в пробирках типа Falcon объемом 50 мл, добавляли раствор фага в пробирку и перемешивали в течение 1-2 мин для сорбции раствора на семенах, имитируя таким образом промышленную машину для протравливания. Обработанные семена высевали в дерново-перлитовый субстрат и культивировали согласно разделу 2.7. Обработки в каждом эксперименте проводились с полной рандомизацией. Каждый вариант включал три повторности по 40 семян (по одному лотку с 40 ячейками (растениями) на повторение).

На 15, 18, 21, 24, 27 и 31-й дни после посева оценивали интенсивность поражения в баллах в соответствии с (Hsieh et al., 2003) в диапазоне 0-5, где 0 -

отсутствии симптомов увядания; 1 - увядание одного из первичных листьев; 2 - увядание обоих первичных листьев, но не первого тройчатого листа; 3 - увядание первого тройчатого листа; 4 - гибель растений после появления семядольных листьев; 5 - отсутствие всходов или полное увядание растений после всходов. AUPDC (площадь под кривой прогрессирования заболевания) рассчитывали в соответствии с (Madden et al., 2007) с использованием той же шкалы в MS Excel 2007. Шкалы фенотипической оценки (Hsieh et al., 2003) была нами адаптирована для сои (рис. 3).

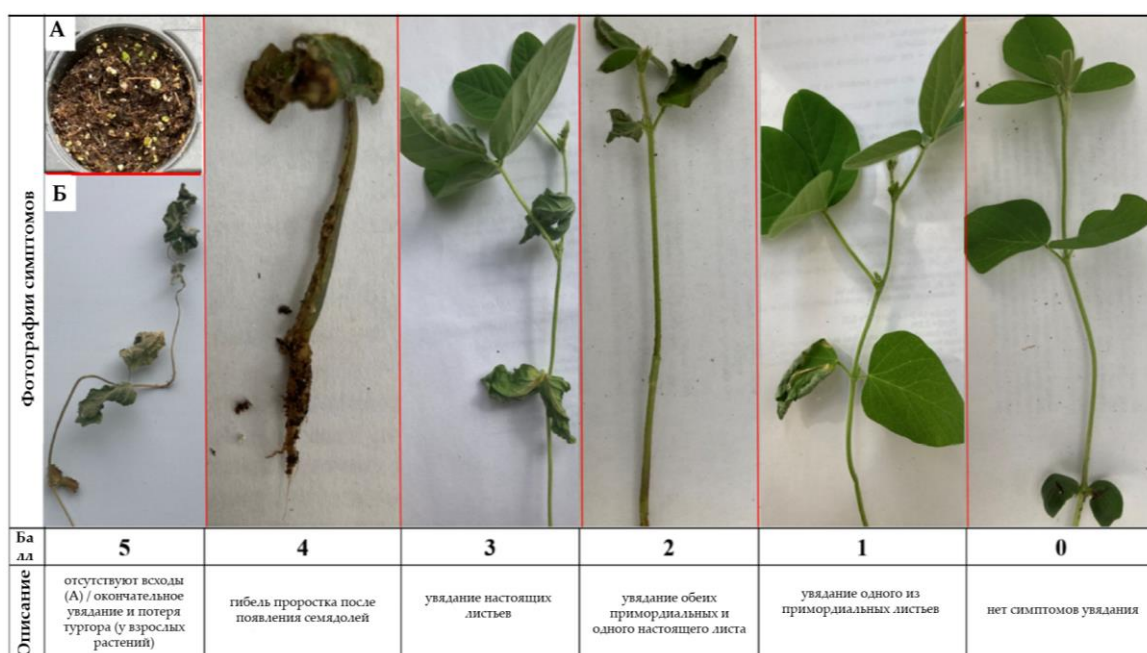


Рисунок 3. Шкала оценки увядания при заражении семян Cff (Hsieh et al., 2003) адаптированная для сои. Балл 5 указывает на гибель растения до всходов (А) или полное увядание вегетирующего растения (Б)

Одновременно с оценкой симптомов болезни измеряли высоту каждого растения от черешка листа до верхушечной почки. Индекс относительного роста (далее – RGI) рассчитывали как $RGI = (LnP2 - LnP1)/(T2 - T1)$, где Ln = натуральный логарифм, P2 и P1 = высота растения в моменты T2 (конечная точка) и T1 (начальная точка), согласно (Martins et al., 2013).

Заражение вегетирующих растений сои Cff проводили путём инфильтрации бактерий в листья сои при помощи аэрографа AirControl 1113 (JAS, Китай) согласно (Shine et al., 2015) с изменениями. Бактериальную суспензию готовили так же, как

и для заражения семян, но с добавлением смачивателя Silwet Gold (Chemtura, США) до концентрации 0,01%. Тройчатые листья растений инокулировали на стадии V2, прижимая лист к плоской поверхности (чашке Петри), чтобы избежать повреждения от давления аэрографа. Все листья инокулировали средней дозой 5 мл суспензии с концентрацией 10^9 КОЕ/мл на растение. Отрицательный контроль обрабатывали эквивалентным количеством воды с использованием смачивающего агента. Растения выращивали аналогично условиям, указанным в разделе 2.7.

Эксперимент по контролю болезни на вегетирующих растениях при помощи фагов включал четыре варианта: (1) обработка заражённых Cff листьев водой (положительный контроль); (2) нанесение суспензии фага (10^9 БОЕ/мл) через 1 час после заражения; (3) одновременная инокуляция листьев фагом (10^9 БОЕ/мл) и бактериями (10^9 КОЕ/мл), смешанными непосредственно перед нанесением; (4) обработка препаратом Косайд 2000, ВДГ (10 г/л). Во всех случаях на каждое растение опрыскивателем наносили ~5 мл рабочего раствора (размер капель ~ 300 мкм) до полного увлажнения листьев. Дальнейшее культивирование растений проводили согласно разделу 2.7.

Оценку интенсивности поражения болезнью на заражённых вегетирующих растениях проводили на 12-й день после заражения согласно разделу 2.7. После этого высчитывали процент площади поражённых частей листа от площади всего листа в соответствии с рекомендациями разработчика программы (Pethybridge et al., 2015).

2.9. Использование веществ растительного происхождения в защите сои от бактериальных болезней

Большинство образцов растений для выделения эфирных масел и растительных экстрактов собирали в июне–августе 2021 года на территории ботанического сада Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова, поля лаборатории защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (чеснок, сорт Новосибирский) и покупали на местных рынках (лайм настоящий, мандарин красный, перец стручковый (страна происхождения — Индия)). Эфирное масло коричника китайского (далее по тексту

- ЭМКК) было любезно предоставлено группой компаний «Союзснаб» (Красногорск, Россия). Выбор видов растений и используемых эфирных масел (далее по тексту – ЭМ) и растительных экстрактов (далее по тексту – РЭ) был основан на сообщениях об их антибактериальной активности (прил. Г). У двух растений (аир обыкновенный и чеснок посевной) эфирное масло и экстракты анализировали отдельно. Полный список растений и частей, из которых были выделены ЭМ и РЭ, представлен в прил. Г. Биологические виды были идентифицированы по морфологическим признакам согласно (Heinrich et al., 2007).

Экстракцию эфирных масел проводили после сбора и высушивания растений без доступа прямых солнечных лучей и при естественной вентиляции в течение 2 недель. Образцы разрезали ножницами на мелкие кусочки размером 5-6 мм и подвергали гидродистилляции. Для этого 100 г биомассы каждого вида растений замачивали в 2-литровых колбах в 1500 мл воды, гидродистиллировали в течение 3 ч в аппарате Клевенджера, а собранные дистилляты высушивали над безводным Na_2SO_4 . ЭМ хранили в герметичных пробирках при 4°C до проведения анализов.

Выделение растительных экстрактов проводили в аппарате Сокслета в соответствии с (Abeysinghe et al., 2010). Для этого 50 г биомассы каждого вида растений измельчали в лабораторной мельнице в порошок, добавляли 300 мл воды или 96% этанола и экстрагировали в течение 12 часов. Полученные растворы фильтровали через бумагу Whatman №1, выпаривали и концентрировали до сухости с помощью роторного испарителя RE100-Pro (DLab, Китай) при 50°C. Полученные экстракты растворяли в 4%-ном водном растворе диметилсульфоксида (далее по тексту - ДМСО) до конечной концентрации 50% (по д.в.) и хранили в закрытых пробирках при 4°C до проведения анализа.

Для оценки антибактериального действия использовали штаммы Psg CFBP 2214, G2, G17 и Cff CFBP 3418, C086 и C089, охарактеризованные в разделе 3.1. Первоначально ЭМ и РЭ были проверены на антибактериальную активность методом диффузии в агар согласно (Burt et al., 2004) с некоторыми изменениями для всех 6 штаммов. Исследование проводили с использованием двухсуточных культур, выращенных при 28°C на среде Кинга Б. Для этого суспензию доводили до

10^5 КОЕ/мл стерильной водой. Затем 100 мкл суспензии бактерий распределяли на поверхности среды в чашке Петри при помощи стерильного шпателя. Диски из фильтровальной бумаги Whatman (№1) диаметром 6 мм вырезали методом штамповки, а заготовки дисков стерилизовали в сухожарочном шкафу с горячим воздухом при 160°C в течение одного часа.

Эфирные масла растворяли в 2,5% водном растворе Твин 20 до концентрации 5% и перемешивали на вортексе до образования стабильной эмульсии. В асептических условиях стерильные диски помещали на среду с бактерией и наносили на них 10 мкл эмульсии (0,5 мкл д.в./диск) соответствующих эфирных масел.

Растительные экстракты, предварительно растворенные в ДМСО, тестировали аналогично эфирным маслам, за исключением того, что на диски наносили 10 мкл 50% водного/этанольного экстракта, растворенного в ДМСО. В качестве отрицательного контроля использовали диски, содержащие 2,5% водный раствор Твин 20, и диски, содержащие 10 мкл 4% водного раствора ДМСО. В качестве положительного контроля использовали диски, содержащие 0,5 мг антибиотика гентамицина (Дальхимфарм, Россия) и эталонного фунгицида тирама (ТМТД, ВСК (400 г/л), ООО «Август», Россия)). Все чашки закрывали лабораторной плёнкой, чтобы избежать возможного испарения тестируемых образцов. Чашки оставляли на 30 мин при комнатной температуре, чтобы обеспечить диффузию масла, а затем инкубировали при 28°C в течение 48 ч. После периода инкубации измеряли диаметры зон ингибирования роста бактерий без учёта диаметра дисков (6 мм) при помощи штангенциркуля. Исследования проводили в трёх повторностях на 3 чашках с одним диском определённого ЭМ, РЭ или гентамицина/тирама на каждой чашке, и рассчитывали среднее значение зоны ингибирования роста бактерий.

Значения МИК и МБК ЭМ и РЭ в отношении Psg и Cff оценивали методом микроразведения бульона (CLSI, 2015) с модификациями. Стартовые культуры готовили путём суспендирования бактериальных клеток в 5 мл жидкой среды Кинга Б и инкубации при 28°C в течение 24 ч при 150 об/мин в шейкере ES-20. Суспензии

разбавляли для получения значения поглощения на спектрофотометре, соответствующего титру 10^5 КОЕ/мл. Стерильные пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл заполняли жидкой средой Кинга Б, эмульсиями или растворами ЭМ/РЭ/гентамицина/тирама до заданной концентрации и добавляли 50 мкл суспензии штаммов бактерий (Psg G2 и Cff C086). Общий объем реакционной смеси составил 1000 мкл.

Ряд концентраций тестируемых ЭМ и гентамицина/тирама составлял 50, 100, 200, 400, 800, 1200, 1600, и 3200 ppm; для РЭ – 500, 1000, 2500, 5000, 10 000, 50 000, и 100 000 ppm (в пересчёте на д.в.). После приготовления реакционных смесей пробирки инкубировали при 28°C и 350 об/мин в течение 48 ч в термошейкере Thermomix F 2.0. После инкубации из каждой пробирки отбирали по 100 мкл реакционной смеси, проводили серию десятикратных разведений в стерильной воде, наносили на среду Кинга Б и распределяли по всей поверхности среды с помощью стерильного шпателя. Чашки помещали в термостат при температуре 28°C на 48 ч, после чего рассчитывали концентрацию бактерий в каждой исходной пробирке. Эксперимент повторяли 2 раза по 3 чашки для каждого разведения. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) определяли как наименьшую концентрацию тестируемых соединений, которая вызывала 90% ингибирование роста по сравнению с контролем, которая определялась путём расчёта изменения титра бактерий. Минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) определяли как наименьшую концентрацию анализируемого вещества, которая вызывала снижение титра бактерий на 99,9%. Для получения более точного результата был проведён тот же эксперимент, но со снижением концентрации анализируемого вещества до значений МИК через регулярные интервалы концентраций (5 пунктов концентрации от ожидаемого МБК до МИК). Для дальнейших целей были отобраны 2 ЭМ и 1 РЭ, показывавших наименьшие значения МБК: ЭМКК для Psg, ЭМДО для Cff и ЭЭБТ для обеих бактерий.

Фитотоксичность ЭМ и РЭ на семенах сои оценивали с помощью теста на прорастание с использованием стандартного метода «поверх бумаги», описанного в Международных правилах тестирования семян (ISTA, 1999). Семена сои (сорт

Касатка) обрабатывали погружением в водный раствор ЭМ или РЭ в различных концентрациях в течение 10 мин, а затем полностью высушивали на стерильной фильтровальной бумаге при комнатной температуре в стерильном ламинар-боксе. ЭМ растворяли в 2,5% водном растворе Твин 20 до концентрации 5% на вортексе до образования стабильной эмульсии, а РЭ предварительно растворяли в ДМСО. Растворы ЭМ разбавляли до концентраций 0,25; 0,5; 1; 2; 3, и 5%, ЭЭБТ до 2,5; 5; 10; 13; 15; 20; 40, и 50% стерильной водой. В качестве отрицательного контроля использовали семена, замоченные в воде. Затем семена выдерживали в условиях постоянной влажности и инкубировали при 25°C. Всхожесть оценивали через 8 дней; семя считалось проросшим, если из него образовывался росток с хорошо развитым корнем. После подсчёта всхожести семядоли отделяли и измеряли длину корней с помощью штангенциркуля. Эксперимент включал 3 повторности по 50 семян для каждого варианта.

Для тестирования фитотоксичности анализируемых веществ в отношении вегетирующих растений их выращивали до фазы R1 в условиях аналогичных описанным в разделе 2.7. После приготовления и гомогенизации растворы наносили на растения с помощью опрыскивателя (с размером капель ~300 мкм) при расходе рабочего раствора ~5 мл на растение (до полного увлажнения всех листьев). После обработки растения выдерживали в теплице в тех же условиях в течение 7 дней, а затем оценивали фитотоксичность в баллах (Nalini et al., 2018), где: 0 — отсутствие симптомов; 1 — очень незначительное изменение цвета; 2 — значительное изменение цвета; 3 — умеренная и более продолжительная фитотоксичность; 4 — средней степени; 5 — умеренно тяжёлая; 6 — тяжёлая фитотоксичность; 7 — очень тяжёлая; 8 — лист почти разрушен; 9 — лист разрушен; 10 — лист полностью разрушен (некроз всего листа). Каждый вариант включал три повторности по 5 растений в каждом.

Анализ химического состава РЭ и ЭМ проводили на газовом хроматографе Agilent 8890 GC System с двумя независимыми каналами, капиллярными кварцевыми колонками DB-1MS длиной 60 м, диаметром 0,250 мм, толщиной плёнки неподвижной фазы 0,25 мкм, с использованием масс-спектрометрического

детектора (далее - МСД)) Agilent 5977В и пламенно-ионизационного детектора (далее - ПИД) производства Agilent Technologies, Inc. (США) по методу (Baharum et al., 2010) с модификациями. Анализ проводили на базе лаборатории ГК «Союзснаб».

Для анализа ЭМ готовили 1% растворы в метаноле и вводили его в устройство в количестве 0,2 мкл на канал МСД и 0,5 мкл на канал ПИД. Для анализа РЭ образец экстракта помещали во флакон и нагревали при 120°C в течение 5 минут. С помощью газового шприца из флакона отбирали 2500 мкл равновесной парогазовой смеси и вводили в устройство через канал, соединённый с МСД. Температурная программа была следующей: температура инжектора 250°C, начальная изотерма 35°C - 2 мин, нагрев 5°C/мин до 140°C, затем 10°C/мин до 250°C, конечная изотерма 250°C - 5 мин. В качестве газа-носителя использовали гелий со скоростью 1,3 мл/мин по каналу МСД и 1,0 мл/мин по каналу ПИД. В качестве вспомогательных газов для ПИД использовали воздух - 400 мл/мин и водород - 30 мл/мин. Температура источника МСД = 230°C, квадрупольная температура = 150°C, режим сканирования —общий ионный ток, температура ПИД = 260°C. Спектры были идентифицированы с использованием библиотеки спектров NIST (National Institute of Standards and Technology, США). Анализ повторяли четырёхкратно, и результаты были представлены в виде средней площади пиков \pm стандартного отклонения.

Эксперименты по использованию анализируемых ЭМ и РЭ в борьбе с Psg и Cff на искусственно заражённых семенах и листьях сои проводили в течение июня—августа 2022 года в экспериментальных теплицах лаборатории защиты растений. Во всех вариантах испытания проводились на сое сорта Касатка (год уборки - 2021, масса 1000 семян = 122,8 г). Эксперименты с обработкой семян проводили при полной рандомизации с пятью повторностями по 40 семян (по 1 лотку на повторность). Опыты с вегетирующими растениями также проводили по схеме полной рандомизации, по 10 растений в каждой повторности.

Для оценки эффективности ЭМ и РЭ в отношении семенной инфекции Psg, заражённые семена обрабатывали замачиванием на 10 мин. Схема опыта включала:

(1) контроль - стерильная вода, (2) водный раствор ЭМКК в концентрации 0,5% и (3) ЭЭБТ в концентрации 13%. После экспозиции семена высушивали на бумажных полотенцах, чтобы удалить лишнюю влагу. В качестве стандартного протравителя семян использовали ТМТД, ВСК. Обработку им семян проводили при норме расхода препарата 7 л/т и расхода рабочего раствора 8 л/т в соответствии с рекомендациями производителя. Для этого 25 г семян и 200 мкл раствора порциями помещали в пробирку объемом 50 мл (типа Eppendorf) и тщательно перемешивали на вортексе в течение 2 мин, пока раствор полностью не впитался в семена. Обработанные семена высевали как описано в разделе 2.7.

Для оценки эффективности применения анализируемых ЭМ и РЭ на заражённых Psg вегетирующих растениях обработку изучаемыми веществами проводили с использованием 35-дневных растений сои через 2 ч после инокуляции бактерией при норме расхода рабочего раствора ЭМ и РЭ ~5 мл на растение (до полного увлажнения всех листьев) с помощью ручного опрыскивателя (с размером капель ~300 мкм). Варианты эксперимента включали в себя использование (1) стерильной воды, (2) ЭМКК в концентрации 0,5%, (3) ЭЭБТ в концентрации 13% и 4) эталонного фунгицида с бактерицидным действием Косайд 2000, ВДГ. Эталонный фунгицид использовали в концентрации рабочего раствора 0,6% в соответствии с рекомендациями производителя. Оценку эффективности проводили на 12-й день (в эксперименте с вегетирующими растениями) и на 35-й день (в эксперименте с семенами) после обработки как описано в разделе 2.7.

Для оценки эффективности в отношении семенной инфекции Cff использовали семена, заражённые методом, представленным в разделе 2.8. Семена обрабатывали путём погружения в (1) стерильную воду, водные растворы (2) ЭМДО в концентрации 0,5%, (3) ЭЭБТ в концентрации 13% на 10 мин, и высушивали на бумажных салфетках для удаления избыточной влаги. ТМТД (4) использовали в качестве эталонного протравителя семян. Условия культивирования растений были аналогичны приведённым ранее. На 15, 18, 21, 24, 27, и 31 день после посева оценивали AUPDC Cff аналогично разделу 2.8.

Оценку эффективности ЭМ и РЭ в отношении заражённых Cff листьев сои проводили аналогично разделу 2.8. Варианты эксперимента включали использование (1) стерильной воды, (2) ЭМДО в концентрации 0,5%, (3) ЭЭБТ в концентрации 13%, и (4) препарата Косайд 2000, ВДГ.

2.10. Использование обогащенных медью наночастиц хитозана для борьбы с бактериальными болезнями сои

Хитозан из панциря краба с молекулярной массой 1040 кДа и степенью деацетилирования 85% был приобретён в компании Биопрогресс (Щелково, Россия). Гидролизат хитозана (далее – ГХ) получали деполимеризацией хитозана панциря краба с использованием азотной кислоты, как описано ранее (Shagdarova et al., 2018). Наночастицы хитозана (далее – НЧХ) были сформированы методом ионотропного гелеобразования, как описано ранее (Qi et al., 2004). Синтез гидролизата хитозана, его наночастиц и комплексов с медью был проведён на базе лаборатории инженерии биополимеров ФИЦ Биотехнологии РАН.

Для оценки антибактериального действия хитозана и его комплексов использовали штаммы Psg CFBP 2214, G2, G17 и Cff CFBP 3418, C086, C089. Для первичного определения антибактериальной активности с использованием всех шести упомянутых выше штаммов использовали метод диффузии в агар (Islam et al., 2011). Для этого 100 мкл бактериальной суспензии с концентрацией 10^8 КОЕ/мл наносили на среду Кинга Б, распределяли с помощью стерильной петли, и прокалывали лунки диаметром 8 мм стерильным пробковым сверлом. Затем в каждую ячейку добавляли по 100 мкл образца в концентрациях 1, 5, 10, 25, 50, и 100% от исходных растворов. Образцы с различной концентрацией были получены путём разведения исходных (100% растворов) в стерильной воде в соответствии с табл. 3. Чашки оставляли при 4°C для диффузии растворов в агар на 2 ч, а затем инкубировали при 28°C в течение 48 ч. В качестве контроля использовали растворы ГХ и CuSO_4 . Эксперимент повторяли трёхкратно.

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) определяли в 96-луночных стерильных планшетах для микротитрования (Corning, США), для чего

готовили серийные двукратные разведения анализируемых образцов в жидкой среде Кинга Б; рабочий объем составлял 100 мкл.

Таблица 3. Концентрации образцов, полученных путём разведения исходных (100% растворов) в дистиллированной воде

Образцы	Относительные концентрации образцов, %	Концентрация хитозана, мг/мл	Концентрация CuSO ₄ , мг/мл
ГХ	100	5	-
	75	3,75	-
	50	2,5	-
	25	1,25	-
	10	0,5	-
	1	0,05	-
Cu ²⁺ ГХ	100	5	0,83
	75	3,75	0,62
	50	2,5	0,42
	25	1,25	0,21
	10	0,5	0,083
	1	0,05	0,0083
НЧХ	100	5	-
	75	3,75	-
	50	2,5	-
	25	1,25	-
	10	0,5	-
	1	0,05	-
Cu ²⁺ НЧХ	100	5	0,83
	75	3,75	0,62
	50	2,5	0,42
	25	1,25	0,21
	10	0,5	0,083
	1	0,05	0,0083
CuSO ₄	100	-	0,83
	75	-	0,62
	50	-	0,42
	25	-	0,21
	10	-	0,083
	1	-	0,0083

После проведения разведений 70 мкл бактериальной суспензии в концентрации 10⁴ КОЕ/мл растворяли в жидкой среде Кинга Б, добавляли по 30 мкл 0,02% резазурина в каждую ячейку и тщательно перемешивали смесь. Через 24 часа инкубации планшеты оценивали визуально. О росте бактерий в среде

свидетельствовало изменение цвета ячейки с фиолетового на розовый. Наименьшую концентрацию, при которой наблюдалось изменение цвета, регистрировали как значение МИК. Эксперимент повторяли трёхкратно.

Бактерицидную активность образцов хитозана оценивали методом микроразведения бульона, описанным в (CLSI, 2015) с модификациями. Для этого на 96-луночном планшете для микротитрования (Corning, США) готовили серийные двукратные разведения образцов хитозана в жидкой среде Кинга Б. Объем составлял 100 мкл. После разведений в каждую ячейку добавляли по 100 мкл бактериальной суспензии в концентрации 10^4 КОЕ/мл и содержимое тщательно перемешивали. Планшеты запечатывали лабораторной плёнкой и инкубировали в шейкере-инкубаторе ES 20 при 180 оборотах в минуту и 28°C . Через 24 часа культивирования 10 мкл бактериальной суспензии из каждой ячейки десятикратно разбавляли в стерильной воде и распределяли по чашкам Петри со средой YD для последующего расчёта титра через 48 часов. Эксперимент повторяли четыре раза. Статистический анализ основанный на результатах определения МИК и МБК не проводился, поскольку не было выявлено различий в пределах повторностей.

Кривые времени летального действия были определены по методике (Foerster et al., 2016), с некоторыми изменениями. По одной колонии каждой бактерии (Psg CFBP 2214 и Cff CFBP 3418) предварительно культивировали в 4 мл жидкой среды Кинга Б в течение 12 ч при 28°C и инкубировали на шейкере ES 20 при 200 об/мин. Клетки осаждали центрифугированием и титровали до концентрации 10^4 КОЕ/мл стерильной водой. Контроль титра бактерий проводили при помощи спектрофотометра Nanodrop One C. Затем клеточную суспензию переносили в стерильные пробирки объемом 1,5 мл и добавляли анализируемые образцы до концентрации $1 \times \text{МБК}$. После этого пробирки помещали в термошейкер Thermomixer 2.0 (Eppendorf, Германия) и культивировали при 27°C и 350 об/мин. Через 0, 2, 5 и 30 мин и 1, 2 и 24 ч отбирали по 10 мкл смеси, разводили в стерильном SPS буфере и распределяли на агаризованной среде Кинга Б. Колонии подсчитывали через 48 часов культивирования при 28°C . В качестве

отрицательного контроля использовали суспензию, в которую добавляли стерильную воду. Эксперимент повторяли трёхкратно.

Фитотоксичность образцов хитозана на семенах сои оценивали с помощью теста на прорастание с использованием стандартного метода «поверх бумаги (ISTA, 1999). Семена сои сорта Касатка замачивали в водных растворах образцов хитозана в различных концентрациях в течение 10 мин, а затем полностью высушивали на стерильной фильтровальной бумаге при комнатной температуре в стерильных условиях. Варианты включали обработку (1) водой, разбавленными с использованием стерильной воды до концентраций 1, 5, 10, 25, 50 и 100% исходных растворов образцов (2) ГХ, (3) Cu^{2+} НЧХ, (4) Cu^{2+} ГХ, (5) НЧХ и (6) CuSO_4 (табл. 3). В качестве отрицательного контроля использовали семена, замоченные в стерильной воде. Затем семена инкубировали при температуре 25°C при постоянной влажности. На 8-й день после обработки оценивали всхожесть; если из семени вырастал проросток с хорошо развитым корнем, считалось, что он пророс. Средний процент прорастания семян определяли для всех повторностей. Длину корней измеряли штангенциркулем после подсчёта скорости прорастания и отделения семядолей. Эксперимент включал 3 повторности по 50 семян в каждой группе.

Для проверки фитотоксичности образцов хитозана на вегетирующих растениях, их выращивали до фазы R1 согласно разделу 2.7. Обработку листьев тестируемыми образцами проводили с использованием опрыскивателя (с размером капель ~300 мкм) при норме расхода раствора ~5 мл на растение (до полного увлажнения всех листьев). Фитотоксичность оценивали после 7 дней инкубации в тех же условиях в соответствии со шкалой фитотоксичности аналогично разделу 2.9. Эксперимент повторяли трёхкратно, в каждой повторности использовали по два растения. Оценка фитотоксичности рассматривалась как средний балл для каждого варианта (сумма баллов всех листьев/количество проанализированных листьев).

Эксперименты по определению эффективности применения образцов хитозана на искусственно заражённых семенах и листьях сои бактериальными

болезнями проводились с мая по август 2022 года в условиях экспериментальной теплицы с использованием сои сорта Касатка. В этих экспериментах использовали штаммы Psg CFBR 2214 и Cff CFBR 3418.

Искусственное заражение семян Psg проводили по методике, описанной в разделе 2.7. Заражённые семена погружали на 10 мин в 50%-ные растворы (1) воды, (2) ГХ, (3) Cu^{2+} НЧХ, (4) Cu^{2+} ГХ, (5) НЧХ и (6) CuSO_4 (табл. 3). После этого семена высушивали на бумажных полотенцах, чтобы избавиться от лишней влаги. В дальнейшем семена высевали и растения культивировали аналогично разделу 2.7. Обработки в каждом эксперименте были организованы по схеме полной рандомизации. Каждая обработка проводилась в 5 повторностях с 40 семенами (1 лоток с 40 ячейками на повторность).

Эффективность образцов хитозана в отношении Psg на вегетирующих растениях оценивали на инфекционном фоне, созданном аналогично разделу 2.7. Каждая обработка проводилась трёхкратно по 10 растений в каждой повторности. Варианты эксперимента включали обработку (1) водой, (2) ГХ, (3) Cu^{2+} НЧХ, (4) Cu^{2+} ГХ, (5) НЧХ (6) и CuSO_4 (табл. 3). Оценку параметров болезни проводили аналогично разделу 2.7.

Эффективность образцов хитозана в отношении Cff на семенах проводили с использованием заражённых семян. Инокуляцию проводили аналогично разделу 2.8. Схема опыта включала: (1) контроль - стерильная вода, (2) водные растворы ГХ, (3) Cu^{2+} НЧХ, (4) Cu^{2+} ГХ, (5) НЧХ и (6) CuSO_4 . Затем высушивали на бумажных салфетках для удаления избыточной влаги. Дальнейшие действия с растениями, условия выращивания и оценка симптомов были аналогичны разделу 2.10.

Эффективность образцов хитозана в отношении Cff на вегетирующих растениях оценивали на инфекционном фоне. Заражение растений сои Cff и метод расчёта заболеваемости растений были аналогичны описанным в разделе 2.8. Схема эксперимента включала использование: (1) воды, (2) ГХ, (3) Cu^{2+} НЧХ, (4) Cu^{2+} ГХ, (5) НЧХ и (6) CuSO_4 . Учёты поражения растений и условия культивирования были аналогичны описанным в разделе 2.8.

2.11. Скрининг фунгицидов для борьбы с бактериальными болезнями на сое

Для определения антибактериальных свойств фунгицидов, использовали штаммы Psg CFBP 2214 и Cff CFBP 3418. Значения МБК оценивали *in vitro* методом стандартных серийных разведений согласно (Valouiri et al., 2016). Для этого проводили серийные разведения каждого фунгицидов в стандартных стерильных 96-луночных планшетах (Corning, США); добавляли бактерии в жидкую среду LB и культивировали в шейкере-инкубаторе ES-20 при 28°C в течение 24 ч. После культивирования каждое разведение высевали на чашки Петри со средой LB и подсчитывали количество выросших колоний через 4 дня инкубации при 28°C. В качестве МБК принимали концентрацию фунгицида, обеспечивающую сокращение числа колоний бактерий на 99,9%. Эксперимент повторяли трижды. Специфичность бактерицидного эффекта рассчитывали, как отношение более высокого МБК к более низкому МБК.

Фунгициды для исследования были отобраны на основе ранее известного антибактериального действия в отношении других бактерий, зарегистрированные для применения на территории РФ (Государственный каталог, 2023) или не имеющие регистрации в РФ, но известные по литературным источникам. В приложении Д приведены полные характеристики использованных в исследовании фунгицидов. Нормы внесения препаратов, не входящих в утверждённый «Список пестицидов и агрохимикатов, разрешённых к применению на территории Российской Федерации», были взяты из соответствующих литературных источников.

Оценку эффективности фунгицидов проводили на искусственном инфекционном фоне патогенов. Заражение патогенами семян и вегетирующих растений проводили согласно разделам 2.7 и 2.8. Для всех экспериментов использовались семена сои сорта Касатка, проверенные на всхожесть и качество в соответствии с ГОСТ Р 52325-2005. Для обработки семян сои фунгициды применяли в рекомендуемой норме расхода рабочей жидкости 10 л/т путём добавления суспензии фунгицида к семенам в пластиковой пробирке с

перемешиванием на вортексе. В качестве контроля использовали стерильную воду. Обработанные фунгицидами семена высевали в 40-ячеечные пластиковые лотки и культивировали как в разделе 2.7. Эксперимент проводился по схеме полной рандомизации в трёх независимых повторностях по 3 лотка (120 растений) на каждый вариант.

Обработку фунгицидами заражённых вегетирующих растений проводили через 24 ч после инокуляции, обрабатывая суспензией фунгицида по 5 мл на растение с помощью ручного опрыскивателя в трёхкратной повторности (по 4 растения). Контрольные варианты включали растения обработанные эквивалентным количеством воды, но заражённые Psg или Cff. Растения культивировали в условиях, указанных в разделе 2.7. Оценку симптомов, проводили аналогично разделам 2.7 и 2.8.

Фитотоксичность фунгицидов при обработке семян проверяли согласно методике (ISTA, 1999). Для определения фитотоксичности фунгицидов на вегетирующих растениях сою выращивали в торфо-перлитной смеси. На стадии роста R1 проростки пересаживали из лотков в пластиковые горшки объёмом 1 л и опрыскивали растворами фунгицидов (при рекомендованных нормах расхода препарата и рабочего раствора), что и ранее, а в качестве контроля использовали воду. Фитотоксичность оценивали по шкале (Sathiyamurthi et al., 2017) через 72 ч после обработки. Каждым фунгицидом обрабатывали по три растения, эксперимент повторяли трёхкратно.

2.12. Статистический анализ и визуализация данных

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием дисперсионного анализа. В некоторых случаях использовали тест множественных интервалов Дункана, критерий множественного сравнения Тьюки, корреляцию рангового порядка Спирмена. Анализы проводили в программе Statistica v.10 (StatSoft, TIBCO, США). Данные, полученные в процентах, перед статистическим анализом переводили в арксинусы. Графики были построены в программе GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Software Inc., США).

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Разнообразие штаммов *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

Согласно современной концепции защиты растений, для эффективной борьбы с патогеном необходимо знать особенности его биологии (Singh et al., 2023). Известно, что штаммы патогенов на определённой территории могут обладать рядом биологических особенностей, к примеру, устойчивостью к ряду действующих веществ (в случае *Phakopsora pachyrhizi* на сое – резистентностью к трём классам фунгицидов) (Müller et al., 2021), отличаться расовым составом и набором генов а/вирулентности (к примеру у рас *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* в Индии (Singh et al., 2023)) или в целом высоким генетическим разнообразием, которое может являться источником изменчивости патогена. Тщательная характеристика штаммов на определённой территории также необходима для целенаправленной селекции растения-хозяина на устойчивость к местным штаммам. Штаммовый состав возбудителя бактериального ожога сои на территории РФ на данный момент остаётся неизвестным, в связи с чем одной из наших задач являлась характеристика штаммов *P. savastanoi* pv. *glycinea*, циркулирующих на территории РФ как возбудители бактериального ожога сои.

Выделение штаммов *Psg* проводили в период с 2019 по 2022 год из семян и частей растений сои, собранных на территории РФ. Всего из 87 образцов было выделено около 150 изолятов, проявляющих флуоресценцию и предварительно относящихся к *Pseudomonas* sp. Помимо этого, были выделены и сохранены в коллекции для дальнейшей работы другие виды бактерий, в т.ч. фитопатогенные, однако они не представлены в работе, так как не являлись предметом исследования. При изучении фенотипических, биохимических и генетических признаков выделенных штаммов в качестве положительного контроля использовали референтный штамм CFBR 2214. После микробиологических и молекулярно-генетических анализов для дальнейшего анализа были отобраны около 40 изолятов, наиболее похожих на *Psg*. Предварительная оценка ВОХ-ПЦР указала на наличие 12 штаммовых групп, и в дальнейший анализ было взято по 1 представителю

каждой группы (табл. 4). Выделенные изоляты имели сходные биохимические и морфологические характеристики: белый, слегка кремовый цвет колоний, круглые, блестящие колонии, которые образовывали сидерофор пиовердин за три дня и не проявляли пектолитической активности.

Таблица 4. Штаммы *Pseudomonas* sp., использованные в работе

Штамм	Растение - хозяин	Орган изоляции	Источник	Год выделения	
Штаммы <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>					
G1	Соя (<i>Glycine max</i>)	семена	Воронежская область	2019	
G2			Амурская область	2019	
G3			Амурская область	2019	
G4			Хабаровский край	2020	
G5			Воронежская область	2020	
G6			Воронежская область	2021	
G7			Воронежская область	2021	
G8		листья	Приморский край	2021	
G9		семена	Хабаровский край	2021	
G10			Амурская область	2021	
G11			Хабаровский край	2021	
G17			Хабаровский край	2021	
CFBP 2214		листья	Новая Зеландия	1968	
Другие виды <i>Pseudomonas</i> sp.					
<i>P. fluorescens</i>		-	почва	Краснодарский край	2021
<i>P. putida</i>	-	почва	2021		

Анализ агрессивности штаммов *Ps*g показал, что они различались значениями этого показателя по отношению к растениям сорта Касатка, образуя разной ширины зоны хлороза вокруг места разреза листа ножницами, смоченными в суспензии бактерии (рис. 4А). Наименьшее значение ширины зоны поражения давал изолят G7 с шириной 3,23 мм, наибольшее – G4 (6,53 мм), а листья, инокулированные штаммом CFBP 2214 демонстрировали среднее значение 3,83 мм (рис. 4Б). Другие штаммы показывали промежуточные значения. На листьях инокулированных стерильной водой и штаммами других видов *Pseudomonas* (*fluorescens* и *putida*) не наблюдали симптомов поражения. Различия в вирулентности штаммов могут быть связаны, как с различным каскадом факторов вирулентности (например системы секреции III типа), так и с возможным

ослаблением агрессивности при культивировании-распространенного явления для патогенов. Различия в агрессивности штаммов, выделенных из одного растения известны, например, для штаммов *P. syringae* pv. *tomato* (Jones et al., 2015).

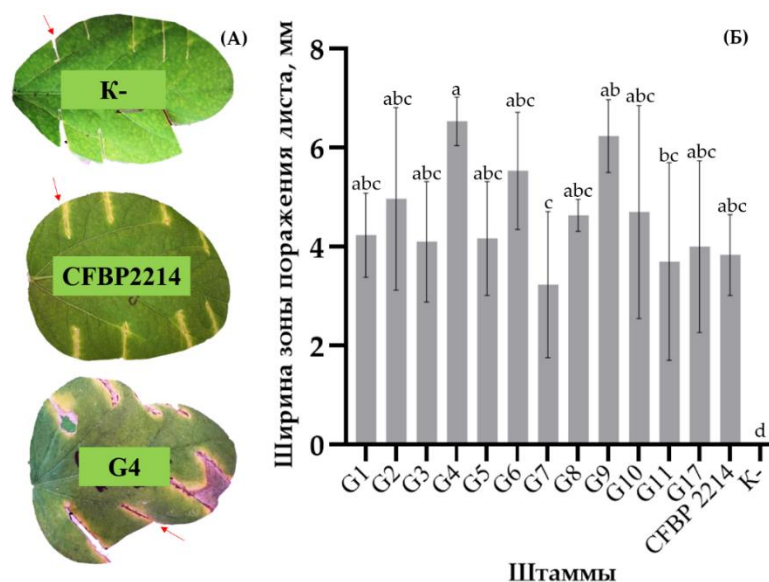


Рисунок 4. Агрессивность штаммов *Pseudomonas savastanoi* pv. *glyciniae* на растениях сои сорта Касатка. А: разница в ширине зоны поражения между штаммами и контролем. Б: значения ширины зоны поражения листьев через 12 дней после инокуляции разными штаммами

Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Psg* показала, что при амплификации с *Psg*-специфичными праймерами все штаммы, в том числе CFBP 2214, образовывали чёткий продукт размером ~ 650 п.н. (рис. 5). Амплификация гена *cfl* указывала на принадлежность к *Psg* (Ignjatov et al., 2007), однако Moriwaki et. al. доказано, что существуют штаммы патогена, которые не продуцируют данный фитотоксин и не реагируют с данными праймерами при ПЦР (Moriwaki et. al., 1996). Данный ген присутствует у ряда патогенов *P. syringae*, поражающих другие культуры, например, у *P.s.* pv. *morsprunorum*, *P.s.* pv. *atropurpurea* и *P.s.* pv. *tomato* (Bereswill et al., 1994). Таким образом, амплификация гена *cfl* косвенно указывала на принадлежность выделенных штаммов к *Psg*.

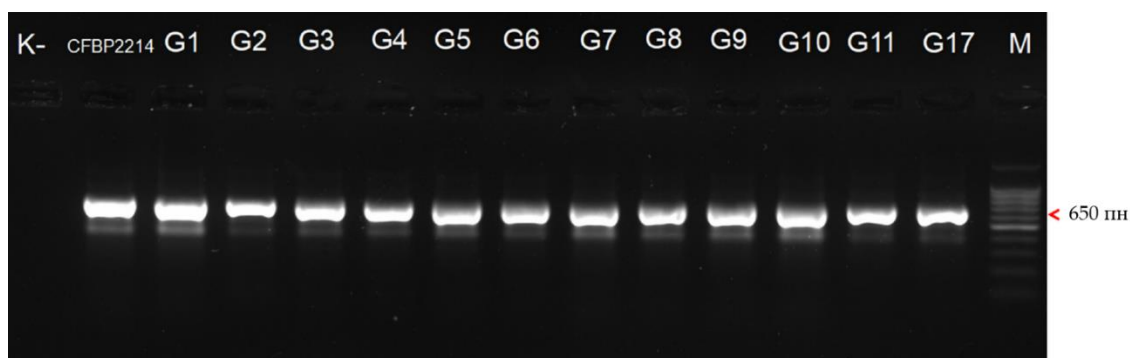


Рисунок 5. ПЦР-детекция гена *cfl* у штаммов *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. М: маркер молекулярного веса 100+bp (Евроген); К-: отрицательный контроль (реакция без ДНК); G1-G17 - анализируемые штаммы

Для окончательного подтверждения ДНК штаммов секвенировали по генам цитратсинтазы *gltA* и *ITS* 16S-23S рРНК. Аннотированные последовательности генов *gltA* и *ITS* 16S-23S рРНК Psg были депонированы в NCBI GenBank, номера депонирования приведены в табл. 5. При сравнении последовательностей с имеющимися в базе данных NCBI GenBank, оказалось, что все штаммы с высокой степенью идентичности (> 95%) комплементарны видам *P. syringae* и *savastanoi* по гену *gltA*. Связано это с тем, что вид *P. syringae* совсем недавно был перегруппирован в девять отдельных геномных подвидов с *P. savastanoi*, включая патовары *phaseolicola*, *savastanoi*, *glycinea* и *tabaci* (Gardan et al., 1982).

Ряд штаммов, например, G1, G2, G7 и G11 также с высокой идентичностью (99,2-99,6%) по последовательностям *ITS* 16S-23S рРНК были комплементарны к *P. amygdali*. Данный факт можно объяснить тем, что последовательности генов *gltA* и *ITS* 16S-23S рРНК являются генами т.н. «домашнего хозяйства» и имеют высокую идентичность у близкородственных видов (Li et al., 2019). Похожая картина высокой степени гомологии к близкородственным видам наблюдалась, например, у *P. syringae* pv. *coriandricola* в работе Popović и коллег (Popović et al., 2019).

Для определения родства 12 штаммов Psg с близкородственными видами был проведён филогенетический анализ и построено филогенетическое дерево с использованием программы MEGA X. Анализ последовательностей гена *gltA* поместил все штаммы Psg в одну кладу вместе с видами *P. syringae* и *savastanoi* (рис. 6А).

Таблица 5. Штаммы *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, идентифицированные по последовательностям генов *gltA* и *ITS* 16S-23S рПНК

Штамм	Наиболее близкие виды при сравнении последовательностей с базой Genbank по		Идентификационный номер депонирования последовательности в Genbank	
	гену цитратсинтазы (<i>gltA</i>)	гену <i>ITS</i> рПНК 16S-23S	по гену цитратсинтазы (<i>gltA</i>)	По гену <i>ITS</i> рПНК 16S-23S
G1	<i>P. syringae</i> ; <i>P. savastanoi</i>	<i>P. amygdali</i> ; <i>P. syringae</i>	OQ743493	OR750531
G2	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. amygdali</i> ; <i>P. syringae</i>	OQ743494	OR750532
G3	<i>P. savastanoi</i>	<i>P. syringae</i> ; <i>P. savastanoi</i>	OQ743495	OR750533
G4	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i>	OQ743496	OR750534
G5	<i>P. savastanoi</i>	<i>P. syringae</i> ; <i>P. amygdali</i>	OQ743497	OR750535
G6	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i>	OQ743498	OR750536
G7	<i>P. syringae</i> ; <i>P. amygdali</i>	<i>P. amygdali</i> ; <i>P. syringae</i>	OQ743499	OR750537
G8	<i>P. savastanoi</i>	<i>P. syringae</i> ; <i>P. savastanoi</i>	OQ743500	OR750538
G9	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i>	OQ743501	OR750539
G10	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. syringae</i> ; <i>P. amygdali</i>	OQ743502	OR750540
G11	<i>P. savastanoi</i> ; <i>P. syringae</i>	<i>P. amygdali</i> ; <i>P. syringae</i>	OQ743503	OR750541
G17	<i>P. savastanoi</i>	<i>P. syringae</i> ; <i>P. amygdali</i>	OQ743504	OR750542

Штаммы отличались по генетическому разнообразию между собой. К примеру, отделились 3 группы штаммов, включавших:

- группу 1 (G6) с наиболее близким по последовательности *gltA* к *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* штаммом SUPP 1574;
- группу 2 (G3-G4, G7-G11, G17), близкую к другим штаммам *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* и штамму NCPPB 3335 *P. sav.* pv. *savastanoi*; и
- группу 3 (G1-G2, G5), сходную с *P. savastanoi* по *gltA*, но наиболее близкую по последовательности *ITS* 16S-23S рПНК к *P. amygdali*.

Филогенетический анализ по последовательностям гена *ITS* 16S-23S рПНК поместил штаммы Psg в 3 монофилетические клады (рис. 6Б). Первая группа

включала в себя штаммы G4, G8, G10, G17 и штамм Psg RICPCZE из Genbank. Вторая клада была самой многочисленной и включала в себя штаммы G3-G4, G6-G8 и G10-G11, а третья – штаммы G1-G2, G5 и G9. В другие клады были помещены штаммы других патогенов, а именно *morsprunorum*, *syringae* и *lachrymans*.

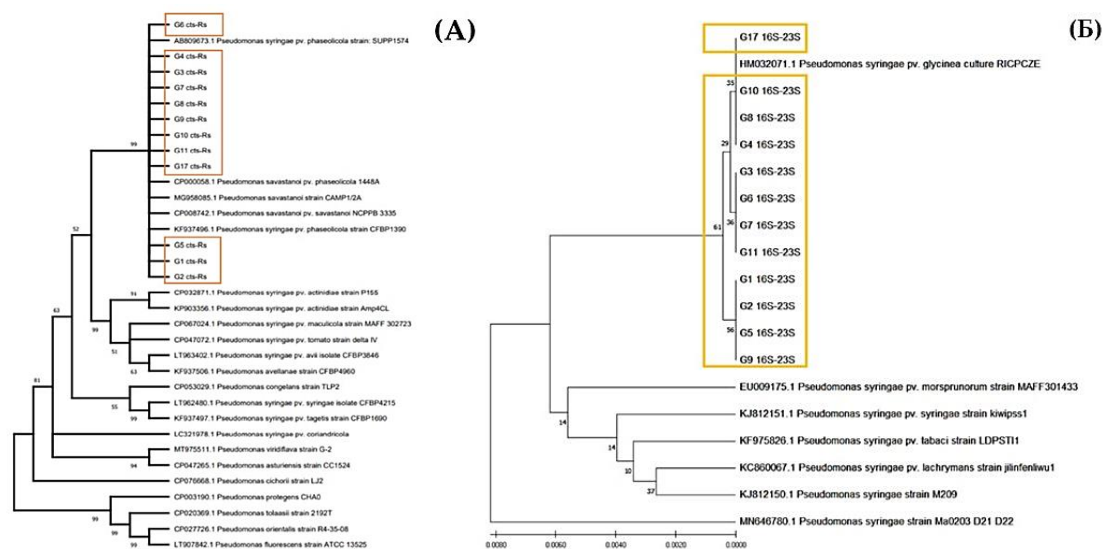


Рисунок 6. Филогенетические деревья нуклеотидных последовательностей генов цитратсинтазы (*gltA*) (А) и *ITS* 16S-23S рДНК (Б) *Pseudomonas* spp. Рамками обведены штаммы, изученные в данной работе

По попарным генетическим расстояниям штаммы в целом не отличались между собой, однако имелись различия между несколькими (рис. 7). Например, отличались между собой штамм G4 и штаммы G1-G2 и G8-G9 в пределах 0,00187 единиц. Другие исследователи также указывают на малый генетический полиморфизм популяции Psg при анализе методами тандемных повторов с переменным числом множественных локусов (MLVA) (Rahi et al., 2020), ВОХ-ПЦР (Marques et al., 2000) и макро-рестриктивного анализа (pulsed-field gel electrophoresis - PFGE) (Grothues et al., 1991). Таким образом, нами показана малая вариабельность и генетическая однородность штаммов популяции Psg в РФ.

Все 12 штаммов Psg, выделенных в РФ, относились к расе 4, согласно схеме, «ген-на-ген» взаимоотношений рас патогена и сортов-дифференциаторов (Аво-Moch et al., 1995; Cross et al., 1966). Похожие результаты были получены другими исследователями. К примеру, Аво-Moch с коллегами провели анализ встречаемости рас Psg в Европе и пришли к выводу, что из 58 штаммов 42 относились к расе 4 (Аво-Moch et al., 1995). Широкая распространённость расы 4 также подтверждена анализом изолятов из Канады (Gnanamanickam et al., 1982), Сербии (Ignjatov et al., 2007), США (Prom, 1997) и некоторых других стран (Fett, 1981).

Таким образом, анализ выделенных в РФ штаммов *P. savastanoi* pv. *glycinea* выявил их различия по агрессивности в отношении растений сои, низкую степень внутривидового генетического полиморфизма. Все штаммы относились к расе 4 по взаимодействию с набором сортов-дифференциаторов. Доминирование расы 4 показывает, что в селекции сои на устойчивость к бактериальному ожогу в РФ необходимо использовать штаммы именно этой расы, как наиболее распространённой в РФ.

3.2. Разнообразие штаммов *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Выделение штаммов *Cff* проводили в период 2018-2022 гг. Всего из 56 проб было выделено 33 изолята, предположительно относящихся к *Curtobacterium* sp. Инфицированные растения и семена включали растения семейства Бобовые (соя, горох), а также другие культурные и сорные растения (табл. 7). Эти образцы составили коллекцию штаммов со сквозной нумерацией С001, С002 и т.д. Часть штаммов (из сои) была выделена автором, часть – любезно предоставлена лабораторией молекулярной биоинженерии ИБХ РАН, ВКМ (референтные штаммы и изоляты из сорных растений и пшеницы), лабораторией бактериологии Всероссийского центра карантина растений (штаммы из гороха и яблони), аграрно-технологическим институтом РУДН (штаммы из подсолнечника).

При отборе типичных колоний ориентировались на эталонный штамм С001 (CFBP 3418), с жёлтым цветом колоний, мукоидной консистенцией, способностью

образовывать прозрачную зону диаметром 7-10 мм вокруг колоний на среде MSCFF путём гидролиза казеина и Конго красного (Tarakanov et al., 2023a).

Таблица 7. Список штаммов *Curtobacterium* sp., использованных в исследовании

№	Штамм	Название	Источник	Год
Штаммы из культурных растений				
1	C034	SF20	Подсолнечник, Курская область	2018
2	C035	SF21		2018
3	C036	SF22		2018
4	C037	SF23		2018
5	C038	SF24		2018
6	C039	SF25		2021
7	C040	SF26		2021
8	C043	Curt3	Томат, Московская область	2021
9	C086	F125-1	Соя, сорт Касатка, Рязанская область	2021
10	C087	F125-2		2021
11	C088	F125-3		2021
12	C089	F30-1	Соя, сорт Даурия, Амурская область	2021
13	C090	F30-2		2021
14	C091	F30-3		2021
15	C137	362	Пшеница, Московская область	2022
16	C138	429	Саженьцы яблони, Московская область	2022
17	C139	507	Горох, Московская область	2022
18	C142	44	Соя сорт Нордика, Белгородская область	2022
19	C144	19	Соя, сорт Султана, Новосибирская область	2022
Штаммы из сорных растений				
20	C108	414DL	Сныть обыкновенная (<i>Aegopódium podagrária</i>), Московская область	2020
21	C109	557DL	<i>A. podagrária</i> , Московская область	2020
22	C110	412DL		2020
23	C112	329DL	Осот (<i>Sonchus</i> sp.), Московская область	2020
24	C113	415DL	<i>A. podagrária</i> , Московская область	2020
25	C114	367DL	<i>Sonchus</i> sp., Московская область	2020
26	C115	411DL	<i>A. podagrária</i> , Московская область	2020
27	C116	575DL		2020
28	C117	571DL		2020
29	C118	332DL	<i>Sonchus</i> sp., Московская область	2020
30	C122	144DL		2020
31	C123	570DL	<i>A. podagrária</i> , Московская область	2020
32	C129	53150	Донник лекарственный (<i>Melilótus officinális</i>), Краснодарский край	2019

№	Штамм	Название	Источник	Год
33	C130	400DL	<i>A. podagraria</i> , Московская область	2020
Референтные штаммы				
34	C001	ВКМ Ас-1923 (CFBP 3418, DSM 20129, ATCC 6887, NCTC 4758)	Фасоль обыкновенная (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	до 1990
35	C106	52862 = ВКМ Ас-2861	<i>Marah</i> sp., Калифорния, США	2019
36	C119	53223	Бук крупнолистный (<i>Fagus grandifolia</i>), Нью Йорк, США	2019
37	C120	53217	<i>F. grandifolia</i> , Нью Йорк, США	2019
38	C121	53256	Злаковая нематода (<i>Anguina agrostis</i>) на	2020
39	C133	53258 = ВКМ Ас-2884	Полевице тонкой (<i>Agrostis capillaris</i>), Вашингтон, США	2020

На среде YD и селективной среде SSM большинство штаммов образовывали жёлтые или светло-жёлтые колонии (рис. 8), что согласовалось с наблюдаемым в Европе доминированием жёлтоокрашенных штаммов *Curtobacterium* sp. (Osdaghi et al., 2020). Все изученные штаммы, отнесённые к Cf, были грамположительными, обладали казеиназной активностью, образуя зоны гидролиза на среде MSCFF, были способны потреблять рамнозу как источник углерода на среде SSM.

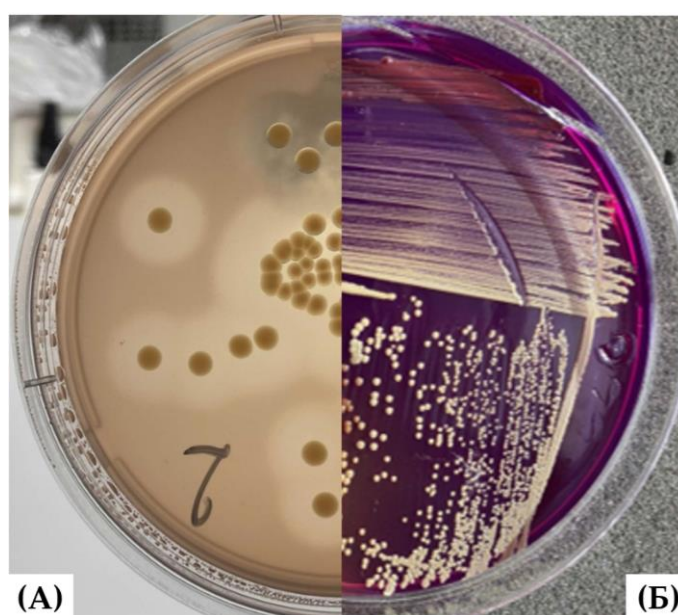


Рисунок 8. Колонии *Curtobacterium flaccumfaciens* на питательных средах: А - MSCFF на пятый день культивирования; В-SSM на 12 день культивирования

Отнесение новых изолятов к *Curtobacterium* sp. первоначально проводилось с помощью родоспецифической (Evseev et al., 2022) и Cff-специфической диагностической ПЦР (Tegli et al., 2002). В первом случае регистрировали положительный сигнал при анализе с $Ct = 21,0$ и более, а во втором случае - наблюдали амплификацию продукта размером приблизительно 306 п.н (рис. 9). Аналогичную картину наблюдали у референтных штаммов.

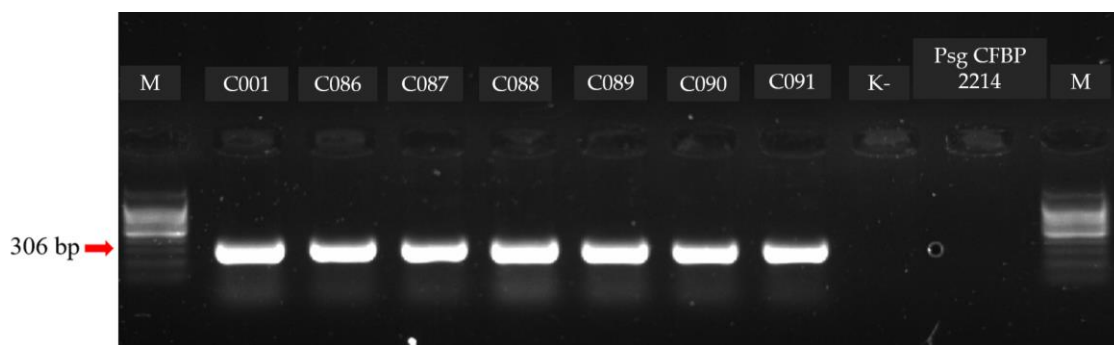


Рисунок 9. ПЦР-детекция Cff-специфичного гена *tlsp* (Tegli et al. 2002) на примере некоторых штаммов *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. М: маркер молекулярного веса 100+bp (Евроген); К-: отрицательный контроль (реакция без ДНК); С001-С091 - анализируемые штаммы; Psg- *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (реакция с нетаргетной ДНК)

Молекулярно-генетическую характеристику штаммов *Cff* проводили при помощи секвенирования, так как данный метод даёт более детальное представление о разнообразии штаммов. Для этого обычно применяют либо секвенирование гена 16S рРНК (Chase et al., 2016), либо секвенирование нескольких генов т.н. «домашнего хозяйства» (Multi-Locus Sequence Analysis: MLSA) (Gonçalves et al., 2019). Первый метод не обеспечивает надёжного определения видов *Curtobacterium* (Evseev et al., 2022), а второй является дорогостоящим. Кроме того, биоинформатический анализ показал, что предложенные в литературе праймеры для маркерного фрагмента гена гиразы (*gyrB*) не подходят для генотипирования популяции *Curtobacterium*, так как полностью комплементарны только для трети геномов *Curtobacterium* sp., представленных в Genbank NCBI (Evseev et al., 2022). Поэтому разработка универсальных маркеров, ПЦР-амплификация и

секвенирование которых позволяет надёжно дифференцировать виды *Curtobacterium* sp., является актуальной задачей.

Анализ филогенетических деревьев, построенных с использованием около 90 однокопийных генов «домашнего хозяйства» (англ. housekeeping genes), эффективно использованных ранее для таксономического анализа MLSA (Na et al., 2018), показал, что относительно короткая последовательность, принадлежащая *alaS* - гену аланин-синтазы, несёт филогенетические сигналы, достаточно сильные для разделения большинства известных геномных групп описанных ранее (Evseev et al., 2022). Для проведения дальнейших биоинформатических анализов была сконструирована пара праймеров AS-F и AS-R. Для проверки правильности работы праймеров они были протестированы на наборе типовых штаммов рода *Curtobacterium*. Для всех использованных штаммов были амплифицированы ПЦР-продукты ожидаемой длины (около 506 п.н.).

Далее фрагменты этого маркерного гена были секвенированы для оценки филогенетического родства штаммов. Результаты филогенетического анализа, основанного на последовательностях гена *alaS*, показали сходство типового штамма *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* LMG 3645 с небольшой частью анализируемых штаммов. Филогенетическое дерево *alaS* (рис. 10) показало, что референтные штаммы C106 и C133 (Cf ВКМ Ас-2884), а также штаммы C108, C110, C113 и C123, выделенные из сорных растений, могут быть тесно связаны с *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *oortii* CFBP 3400 (близкое родство Cf ВКМ Ас-2884 и Cf pv. *oortii* CFBP 3400). Это также было показано ранее на основе комплексного филогенетического анализа, включавшего большой набор консервативных генов (Evseev et al., 2022).

Интересно, что изоляты 2021 года с сои кластеризовались с изолятами дикорастущих растений 2020 года выращивания. Можно предположить, что заражённые семена являются основным путём распространения штаммов *Curtobacterium flaccumfaciens*, обеспечивая низкое генетическое разнообразие изолятов, полученных из культурных растений, произрастающих в широком географическом ареале (Токмакова et al., 2024).

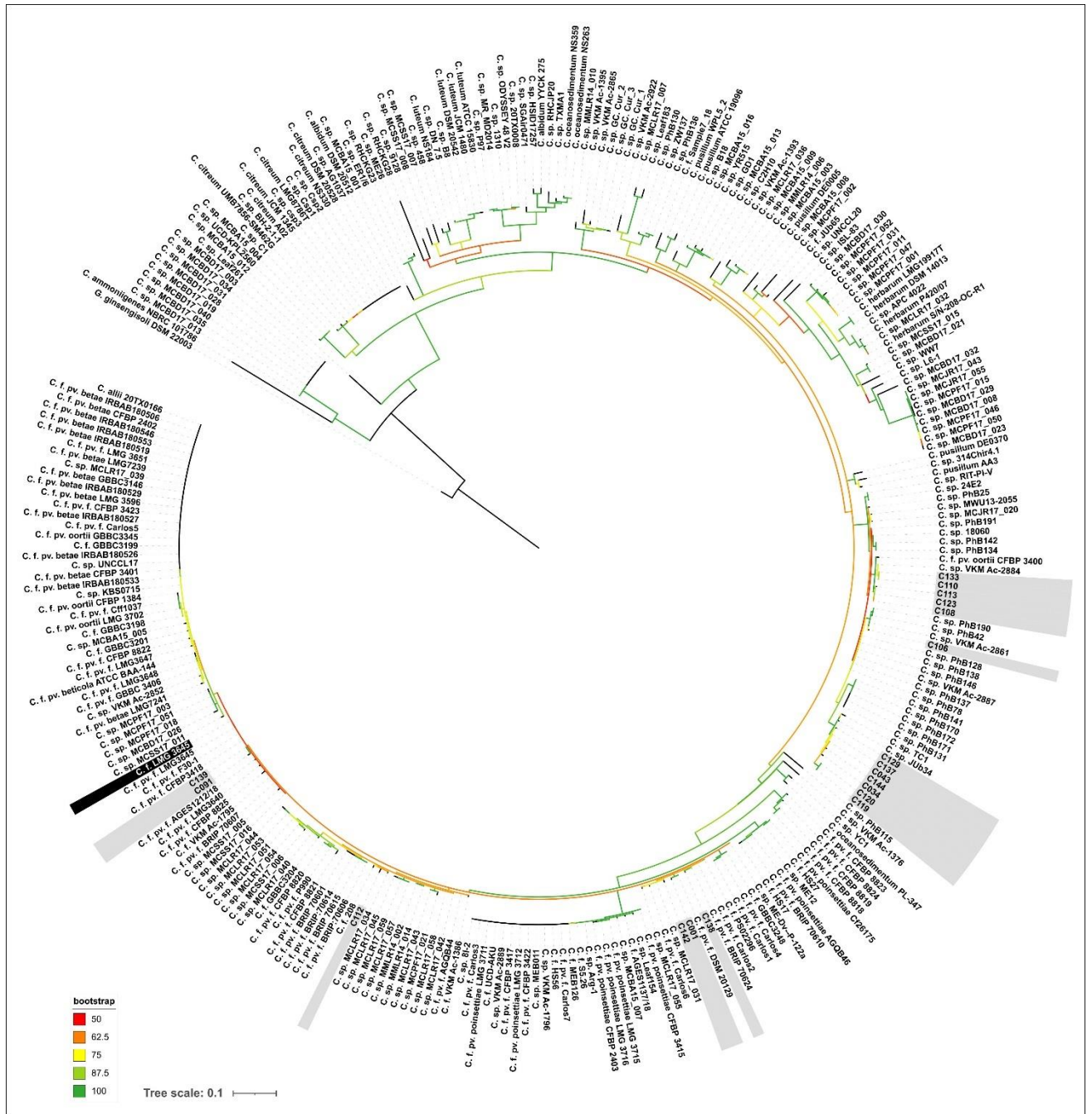


Рисунок 10. Филогенетическое дерево на основе нуклеотидных последовательностей аланин-тРНК-синтетазы. Коллекционные штаммы показаны на сером фоне. Типовой штамм Cff LMG 3645 показан на черном фоне. В качестве внешней группы использовали штамм *Gryllotalpica ginsengisoli* DSM 22003. Масштабная линейка показывает 0,1 нуклеотидных замен на сайт. Общее число бутстреп-реплик составило 1000. Ветви с бутстреп-поддержкой 50% и выше показаны цветовым градиентом, поясняемым в легенде

Тот факт, что генетически близкие штаммы могут быть выделены из культурных и дикорастущих растений, может свидетельствовать о том, что ранее неизвестные как резерваторы Cff дикорастущие растения могут являться

значительным источником потенциальной инфекции, что необходимо учитывать при разработке мер борьбы с патогеном. Остальные штаммы относились к трём различным кластерам, содержащим штаммы *Curtobacterium flaccumfaciens* и неклассифицированные *Curtobacterium* spp. Штаммы, C137, C129-C130, C144, C034 - C040 и C043 также были объединены в кластер по последовательностям гена *alaS* (рис. 10). В эту группу входили штаммы, выделенные из нетипичных для Cff растений-хозяев за исключением штамма C144.

Анализ вирулентности штаммов Cff показал, что все протестированные штаммы, кроме четырёх (C043, C115, C118 и C137), вызывали характерные симптомы на инокулированных листьях сои и фасоли обыкновенной. Через 5 дней на сое и 7 дней на фасоли появлялись участки ткани с хлорозом, постепенно переходящим в некроз соломенного цвета (рис. 11). На 12-й день после инокуляции поражение листьев было максимальным. У растений, инокулированных стерильной водой и непатогенными штаммами, симптомы не были замечены, а на листьях, заражённых эталонным штаммом C001, появлялись типичные симптомы пятнистости. Бактерии были повторно выделены из листьев с симптомами и идентифицированы как Cff с помощью видоспецифичной ПЦР (Tegli et al., 2002).

Штаммы были неравномерно распределены по агрессивности, что показано на рис. 12. Коэффициент корреляции между агрессивностью штаммов на сое и фасоли составил 0,701 (высокая степень корреляции). Полученные результаты согласуются с работами (Harveson et al., 2015; Gonçalves et al., 2017; Osdaghi et al., 2018), в которых описано, что штаммы, выделенные из ячменя (*Hordeum vulgare*), овса черного и обыкновенного или белого (*Avena strigose* и *A. sativa*), рапса (*Brassica napus*), райграса (*Lolium* spp.), пшеницы (*Triticum* spp.), томатов (*Solanum melongena* и *S. lycopersicum*) и видов перца (*Capsicum* spp.), были патогенны для бобовых культур, в частности для фасоли обыкновенной.

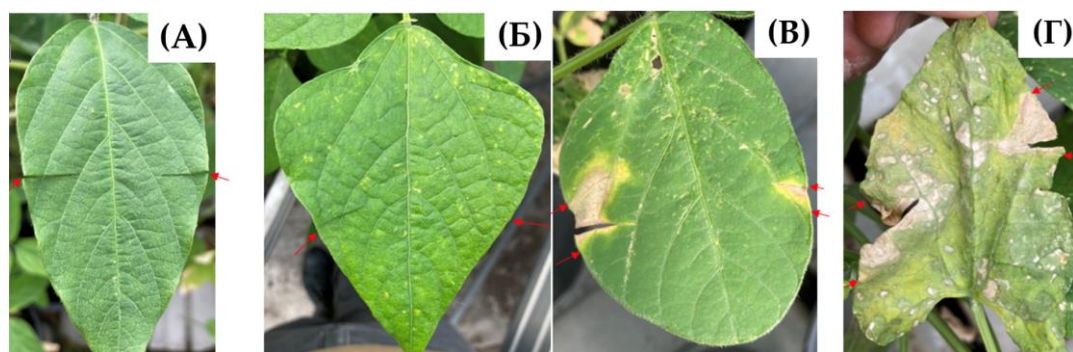


Рисунок 11. Симптомы заражения штаммами *Cff* на листьях сои и фасоли обыкновенной. А - отрицательный контроль на сое, Б - отрицательный контроль на фасоли обыкновенной, В - инокуляция штаммом С089 листьев сои, Г - инокуляция штаммом С086 листьев фасоли обыкновенной

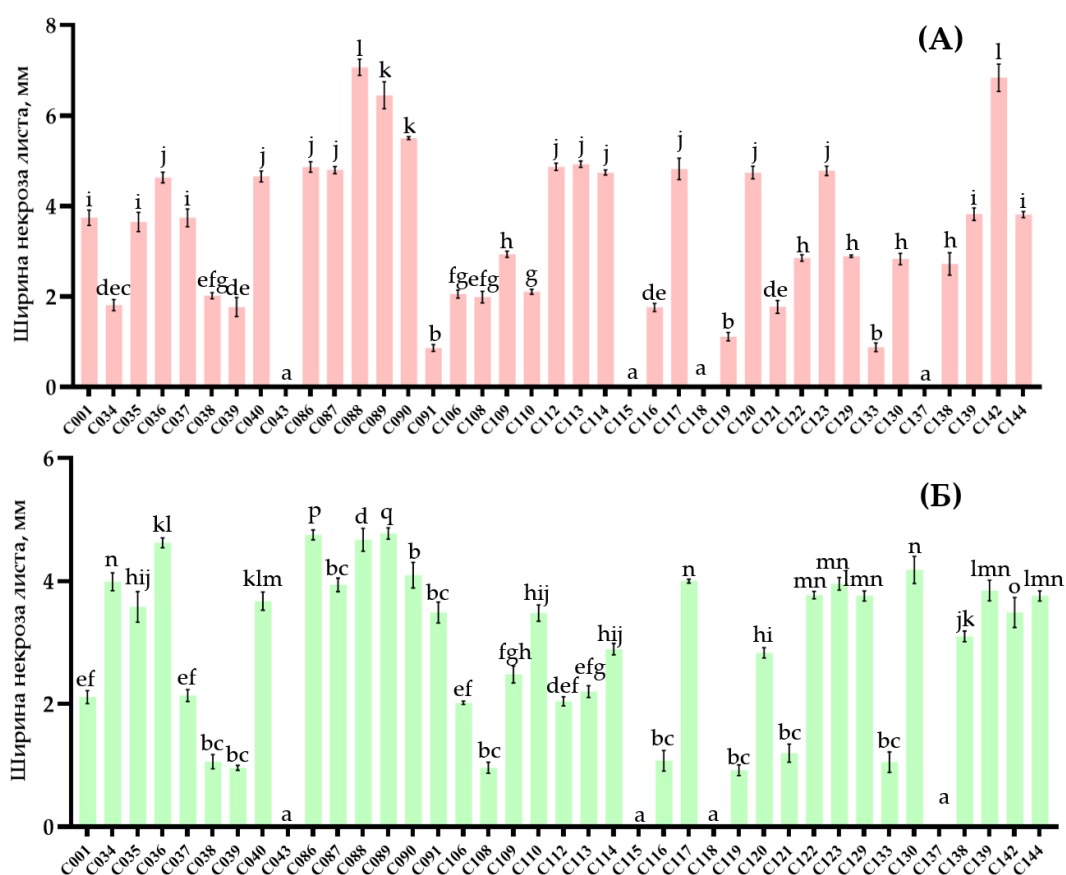


Рисунок 12. Значения ширины зоны поражения листьев при инокуляции растений сои сорта Касатка (А) и фасоли сорта Пурпурная Королева (Б) различными штаммами *Curtobacterium flaccumfaciens*. Здесь и на других графиках, если не написано иное: значения на графиках представляют собой соответствующие средние значения трех независимых повторений, столбцы ошибок - стандартное отклонение, значения в столбцах, обозначенные разными буквами, указывают на значимые различия по критерию Дункана, $p=0,05$

Для сои наиболее агрессивными оказались штаммы С088 и С142 (со средними значениями ширины зоны повреждения листьев 7,07 и 6,84 мм

соответственно), а наименее агрессивными - штаммы C091 и C133 (со значениями 0,87 и 0,88 мм соответственно). При инокуляции фасоли обыкновенной наибольшие значения были получены для штаммов C086, C088 и C089 (5,50, 5,24 и 6,78 мм, соответственно), а наименьшие - для штаммов C039, C108 и C119 (0,96, 0,93 и 0,92 мм, соответственно).

Различия в агрессивности, наблюдаемые при инокуляции разными штаммами растений сои и фасоли, могут быть связаны со сложной системой секреции факторов патогенности и их изменчивостью. В работе (Maringoni et al., 2003) было показано, что штаммы, выделенные из фасоли обыкновенной, были слабо патогенными для сои, однако инокуляция теми же штаммами, повторно выделенными после инокуляции сои, показала сильную степень агрессивности в отношении сои, что свидетельствует об изменчивости системы секреции, которая, безусловно, должна быть тщательно изучена в дальнейших работах.

При разработке методов борьбы с патогенами необходимо отделять в звеньях севооборота фасоль обыкновенную, донник лекарственный и сою, поскольку, согласно полученным данным, большинство штаммов могут поражать или заселять все эти культуры. В качестве дополнительной меры защиты от Cff необходимо бороться с сорными растениями-резервуарами, такими как виды осота (*Sonchus* sp.), сныть обыкновенная (*Aegopodium podagraria*), полевица тонкая *Agrostis capillaris*). В настоящее время известно о способности Cff колонизировать широкий спектр растений (Osdaghi et al., 2020). Очевидно, что этот список неполный, и для понимания полной картины биологии патогенеза бактерии на растениях потребуются дополнительные исследования.

Анализ чувствительности штаммов Cff к соединениям меди проведённый путём определения значений МИК и МБК в жидкой среде показал, что исследуемые штаммы существенно различались по этому показателю (рис. 13). У 38 штаммов значения МИК были ниже 390 ppm. Единой количественной оценки устойчивости *Curtobacterium* sp. к соединениям меди не существует, поэтому эти штаммы были классифицированы как чувствительные к меди. Штамм C116 отметили как устойчивый к $\text{Cu}(\text{OH})_2$ со значением МИК = 781 ppm. Этот штамм был выделен из

снати обыкновенной (*Aegopodium podagraria*) вместе с некоторыми другими штаммами (C108-110; C113, C115-117; C123 и C130). Возможно, этот штамм подвергался обработке фунгицидами на основе меди при проведении обработок плодовых культур от болезней и таким образом приобрёл устойчивость к повышенным дозам меди. Этот факт следует учитывать, поскольку появление резистентных к меди форм патогена может снизить эффективность фунгицидов на основе меди, которые рекомендуют использовать в качестве меры борьбы с *Cff* (Estefani, 2007). Возникшая устойчивость штамма интересна для дальнейшего изучения, поскольку прецеденты появления устойчивых к меди штаммов *Cff* неизвестны, хотя это обычное явление для других фитопатогенных бактерий (Goto et al., 1994).

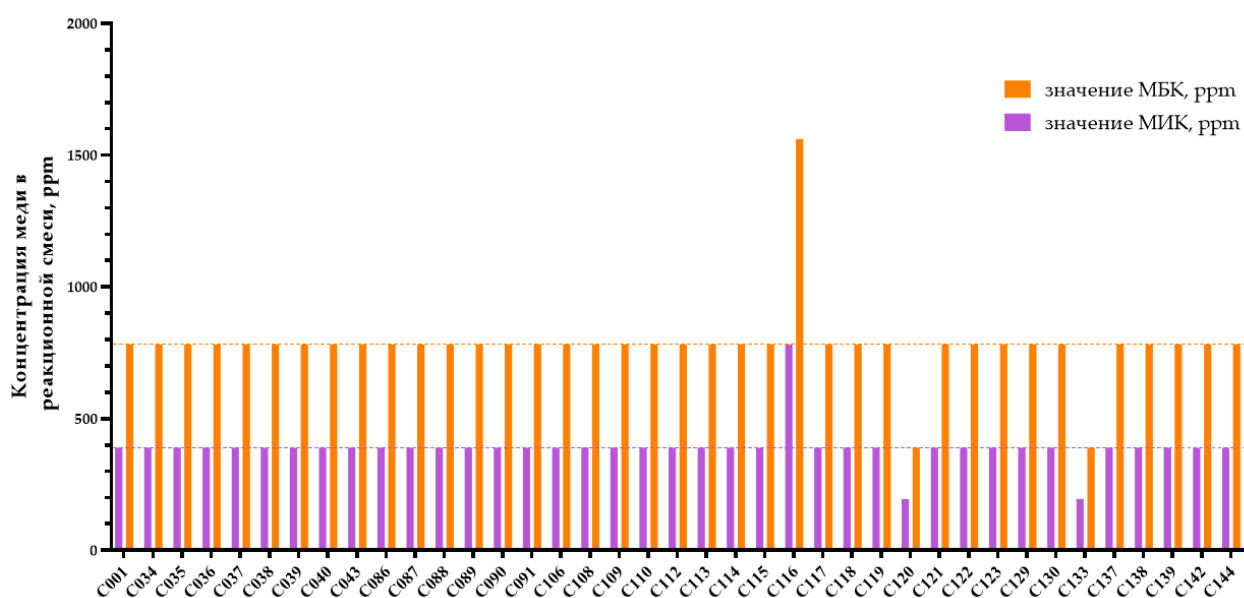


Рисунок 13. Значения МИК и МБК дигидроксида меди в отношении штаммов *Curtobacterium flaccumfaciens*, полученные методом разведения в бульоне YD. Пунктирные разделительные линии разделяют восприимчивые (нижние линии) и устойчивые (верхние линии) штаммы

Значения МИК для двух референтных штаммов, C120 и C133, выделенных из дикорастущих растений в США, были в два раза ниже, чем для большинства штаммов (195 и 390 ppm соответственно). Причины низкой/высокой чувствительности к соединению меди остаются неясными.

Таким образом, нами выделен ряд штаммов, относящихся к Cff по фенотипическим и молекулярно-генетическим характеристикам. Проведённая филогенетическая характеристика показала, что штаммы, выделенные с сои кластеризуются со штаммами из сорных растений, что может указывать на их возможную роль как дополнительного источника инфекции. Заражение выделенными штаммами растений сои и фасоли показало высокую степень корреляции, однако штаммы отличались между собой по интенсивности проявляемых симптомов на этих растениях. Показано, что один штамм являлся устойчивым к повышенным концентрациям дигидроксида меди, что может указывать на возможное появление резистентной формы. Этот факт необходимо учитывать при построении системы защиты от патогена и поиска новых альтернативных мер борьбы с ним.

3.3. Оценка вредоносности бактериальных болезней сои при искусственном заражении в условиях Московской области

Вредоносность бактериальных болезней на сое может варьировать в широких пределах в зависимости от климатических условий, технологии выращивания и восприимчивости сорта (Harveson et al., 2007; Лазарев и др., 2016; Sammer et al., 2012). К данному моменту накоплено недостаточное количество данных, касающихся вредоносности изучаемых патогенов. О влиянии данных болезней на структуру урожая сои в условиях Московской области ранее не сообщалось. В рамках данного этапа оценивали изменение структуры урожая сои при заражении возбудителями бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания в условиях Московской области.

Согласно климатическим характеристикам годов проведения исследования, интенсивные дожди в первой половине вегетации в 2020 году в комплексе с невысокими температурами способствовали тому, что в этот год интенсивность поражения болезнями была выше в сравнении с вегетационным периодом 2021 года.

Первые симптомы болезней на растениях сои наблюдали через 8-13 дней после заражения. Распространённость и интенсивность поражения нарастали по

мере увеличения вегетативной массы и к моменту последнего учёта составили для Psg: 34% и 0,9 балла, а для Cff: 21% и 1,11 балла в 2020 году, а в 2021 году для Psg: 21,2% и 0,7 балла, а для Cff: 13,5% и 1,02 балла (табл 8).

Таблица 8 – Динамика распространенности и интенсивности поражения изучаемых болезней на сорте сои Касатка при искусственном заражении

Вариант	Даты проведения учётов							
	2020 год							
	2 июля		20 июля		8 августа		25 августа	
	Р, %	Интенсивность поражения, балл	Р, %	Интенсивность поражения, балл	Р, %	Интенсивность поражения, балл	Р, %	Интенсивность поражения, балл
Заражение Psg	7,2 ± 0,3	0,14 ± 0,03	12,8 ± 0,1	0,62 ± 0,03	14,4 ± 1,1	0,74 ± 0,6	34,5 ± 2,5	0,92 ± 0,12
Заражение Cff	3 ± 0,5	0,33 ± 0,01	3,15 ± 0,3	0,4 ± 0,1	18,0 ± 0,2	0,94 ± 0,12	21,9 ± 0,9	1,11 ± 0,05
2021 год								
Вариант	6 июля		25 июля		12 августа		31 августа	
Заражение Psg	3,2 ± 0,45	0,19 ± 0,6	8,21 ± 0,28	0,32 ± 0,01	14,0 ± 2,13	0,52 ± 0,04	21,2 ± 1,1	0,70 ± 0,09
Заражение Cff	1,8 ± 0,9	0,13 ± 0,04	2,07 ± 0,19	0,27 ± 0,05	9,3 ± 1,8	0,79 ± 0,05	13,5 ± 1,2	1,02 ± 0,21

Анализ структуры урожая показал, что заражение сои Psg и Cff достоверно снижало количество семян на растении и продуктивность с 1 м² (табл. 8). При этом заражение не оказывало сильного влияния на высоту растений, длину бобов и массу 1000 семян. Возможно, это связано с тем, что основной габитус растений уже был сформирован к моменту инокуляции. При заражении сои Psg происходило снижение продуктивности на 38,1 г/м², а при заражении Cff - на 36,4 г/м² в сравнении с вариантом без инокуляции бактериями. Можно утверждать, что снижение продуктивности было обусловлено в основном благодаря снижению количества семян с 1 растения, а другие параметры структуры урожая оказывали

меньший эффект на конечную продуктивность (табл. 9). При этом более вредоносным в Московской области является бактериальный ожог, так как при заражении Psg происходит большее снижение продуктивности, чем при заражении Cff.

Таблица 9 – Структура урожая сои сорта Касатка при искусственном заражении возбудителями бактериальных болезней, среднее за 2020-2021 гг.

Вариант	Высота растений, см	Длина бобов, см	Количество семян в бобе, шт.	Масса 1000 семян, г	Количество семян с растения, шт.	Продуктивность, г/м ²
Контроль (без заражения)	63,1± 15,3	3,9± 0,71	1,8± 0,83	134,6± 3,97	34,5± 0,4	232,9± 9,5
Заражение Psg	56,0± 13,0	3,4± 0,92	1,6± 1,03	127,5± 4,32	30,5± 0,94*	194,8± 22,5*
Заражение Cff	59,1± 15,6	3,6± 0,68	1,5± 0,99	127,2± 1,71	30,9± 0,55*	196,5± 14,0*
НСР ₀₅	Fφ<F ₀₅	Fφ<F ₀₅	Fφ<F ₀₅	Fφ<F ₀₅	3,02	6,39

Примечание: * - различия по сравнению с контролем достоверны на 95 % уровне значимости.

Таким образом нами показано, что в условиях Московской области заражение сои возбудителями бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания достоверно снижало продуктивность культуры на 16,4 и 15,6 %, соответственно. Снижение продуктивности происходило в основном из-за снижения количества семян с 1 растения, а другие параметры структуры урожая оказывали меньший эффект на конечную продуктивность. В связи с этим необходима разработка методов диагностики и мер борьбы с данными патогенами.

3.4. Оптимизация этапов лабораторного анализа семян сои на выявление фитопатогенных бактерий (на примере возбудителя бактериального ожога сои)

Тестирование семенного материала сои на наличие возбудителей болезней – обязательный этап фитосанитарной экспертизы перед посевом. Знание видового состава патогенов, их локализации и инфекционной нагрузки помогает оптимизировать и увеличить эффективность системы защиты растений (Demeke et

al., 2012). При тестировании семян на наличие бактериальных болезней необходимо проводить тщательную пробоподготовку для повышения чувствительности метода и детекции пропагул патогена, так как даже в малых количествах данные патогены могут вызвать эпифитотии. В рамках данного раздела проводили оптимизацию протокола пробоподготовки и проведения анализа при диагностике *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* в семенах сои.

Экстракцию патогена из семян можно проводить как путём смыва с поверхности семян, так и разрушением семян в буфере из-за того, что патоген может находиться и на поверхности, и под оболочкой семян. По этой причине крайне важно было выявить оптимальный метод, позволяющий достичь максимальной площади пика ампликона для внутренней и для поверхностной локализации патогена (Тараканов и др., 2024б).

Полученные данные свидетельствуют о том, что максимальная площадь пика была достигнута при внешней локализации патогена, как в варианте со встряхиванием, так и при гомогенизации семян. Значения площади пиков составили 416,9 и 390,7 единиц, соответственно, для обоих вариантов (рис. 14).

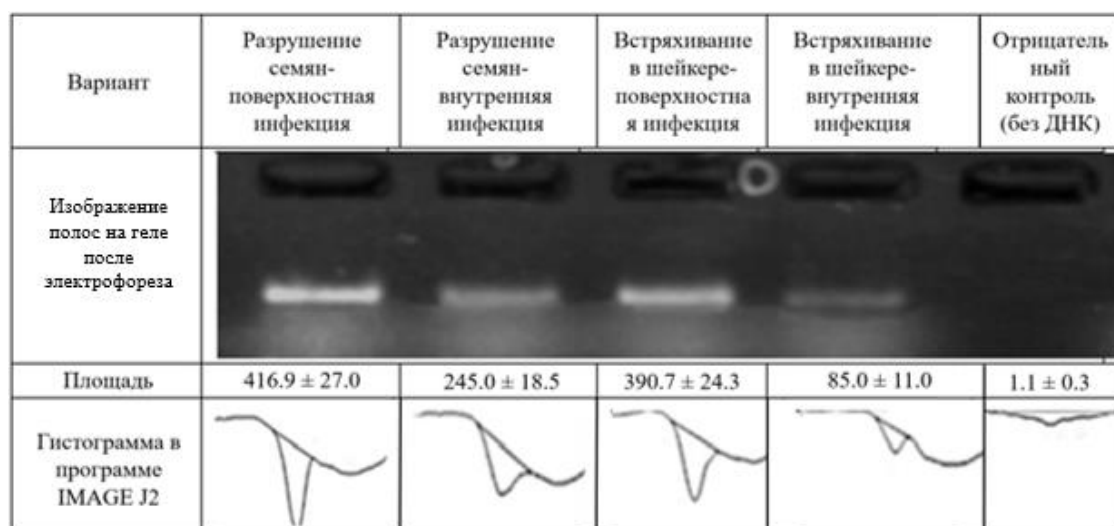


Рисунок 14. Графическое представление результатов электрофореза, полученных при обработке в программе IMAGEJ2, по вариантам локализации инфекции и методам выделения патогена из семян

В варианте с внутренней локализацией патогена площадь пика была ниже и составляла в среднем 245,0 и 85,5 единиц при разрушении и встряхивании семян,

соответственно. Таким образом, в качестве метода выделения патогена из заражённых семян необходимо применять разрушение семян.

Анализ результатов эксперимента по подбору оптимального мастер-микса с использованием образцов ДНК, выделенных пятью различными методами и двумя мастер-миксами, показал, что площадь пика была максимальной (645,0 единиц) при использовании набора для выделения ДНК Проба-ГС и мастер-микса Mas^{DD}TaqMIX-2025 (рис. 15А).

Результаты экспериментов по определению оптимальной схемы диагностики в зависимости от метода экстракции, локализации бактерии и способа выделения ДНК показали, что в вариантах с использованием мастер-микса 5x Screen Mix-HS при различных методах выделения либо не образовывался целевой ампликон, либо высота пика получалась очень низкой. В связи с этим для следующего этапа исследований при выделении ДНК использовали набор Проба-ГС, а для ПЦР-анализа включали в реакционную смесь мастер-микс 5x Mas^{DD}TaqMIX-2025 (Tarakanov et al., 2023d). Выделение ДНК с помощью набора Проба ГС позволило сэкономить время на проведение анализа (рис. 15Б). Подбор объёма праймеров в реакционной смеси показал, что наибольшую площадь пика достигали при использовании мастер-микса 5x Mas^{DD}TaqMIX-2025 по 1,0 и 2,0 мкл праймеров на реакцию. Учитывая, что выход ДНК в этих двух вариантах статистически не отличался, в дальнейшем использовали праймеры при объёме по 1,0 мкл на реакцию (рис. 16). В результате проведения эксперимента по определению оптимальной схемы диагностики показано, что наибольшая площадь пика ампликона была достигнута в варианте с выделением набором Проба-ГС, пробоподготовкой методом разрушения семян в гомогенизаторе (рис. 17).

Таким образом, в ходе работы было показано, что при сравнении двух методов выделения патогена, двух мастер-миксов для ПЦР, двух локализаций патогена в семенах и пяти методов выделения ДНК, оптимальной схемой для высокочувствительной диагностики патогена является гомогенизация семян в SPS-буфере и выделение ДНК с помощью набора Проба ГС.

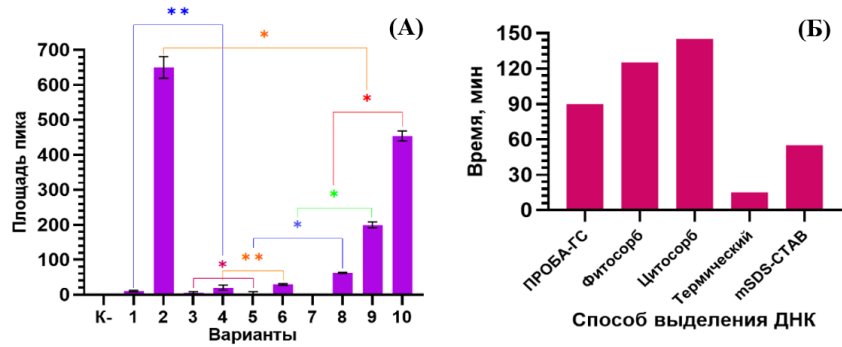


Рисунок 15. Значения площади пика в зависимости от метода выделения ДНК и мастер-микса. А: значения ошибок показывают стандартное отклонение в трёх повторностях. К - отрицательный контроль (ddH₂O); 1-2 – набор для выделения ДНК Проба-ГС, 3-4 - Фитосорб, 5-6 - Цитосорб, 7-8 - термический, 9-10 – mSDS-CTAB. Четные варианты - 5x Mas^{DD}TaqMIX-2025, нечетные - 5x ScreenMix-HS. Б: время выделения ДНК из 3 образцов семян сои разными методами

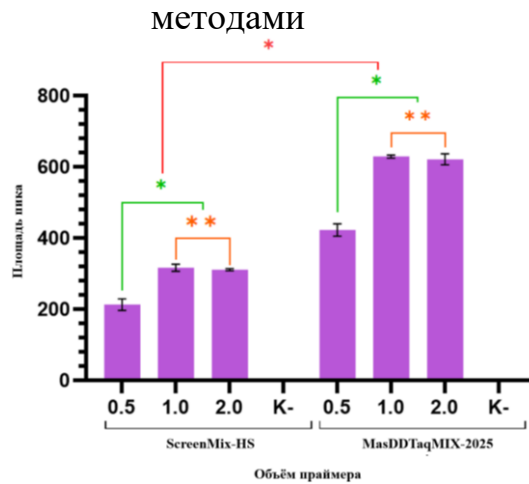


Рисунок 16. Значения площади пика в зависимости от объёма праймеров и мастер-микса. Статистические различия оценивали с помощью теста Крускалла-Уоллиса с использованием теста множественных сравнений Данна. ** - различий нет, * - различия при $p < 0,05$

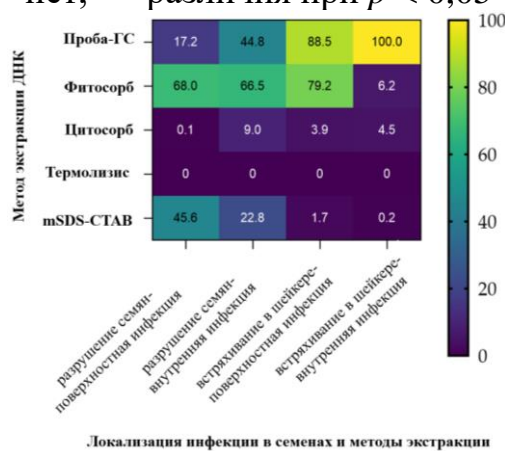


Рисунок 17. Тепловая карта значений интенсивности сигнала (процент от максимального значения площади) в зависимости от метода выделения ДНК, локализации инфекции и способа экстракции. Справа - столбик, показывающий зависимость значений относительной интенсивности сигнала от цвета

В составе смеси для ПЦР рекомендуется использовать мастер-микс 5x Mas^{DD}TaqMIX-2025 и по 1,0 мкл каждого праймера.

3.5. Разработка мультиплексной ПЦР в реальном времени для диагностики возбудителей бактериозов в семенах сои

Наиболее эффективным способом снижения риска потенциальных эпифитотий на полях и потерь урожая из-за бактериальных заболеваний является использование семян, не содержащих патогенов (Huang et al., 2009). Учитывая, что одно инфицированное семя на 5 000-9 000 штук здоровых (в зависимости от массы семян и метода обнаружения) может привести к эпифитотии, то тестирование семян должно проводиться с использованием высокочувствительных методов, таких как ПЦР. В рамках данного раздела проводили разработку метода диагностики при помощи мультиплексной ПЦР в реальном времени для обнаружения Psg и Cff в семенах сои.

Праймеры и зонды, разработанные и применённые в данной работе, представлены в табл. 10. Для конструирования праймеров к *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg) был выбран ген, кодирующий 2-оксоглутарат-зависимый этилен/сукцинат-образующий фермент (далее – *efe*) (рис. 18).

Этиленпродуцирующая способность штаммов *P. savastanoi* pv. *glycinea* и *phaseolicola* потенциально связана с их патогенностью (Weingart and Volksch, 1997). Этот маркерный ген был использован для выявления патоваров этиленпродуцирующих бактерий *Pseudomonas* (Weingart and Volksch, 1997; Sato et al., 1997). Проведённый BLAST-поиск по базе данных NCBI GenBank показал содержание 847 геномных последовательностей *Pseudomonas syringae* и *Pseudomonas savastanoi* и 59 последовательностей их плазмид. Поиск также показал наличие гена *efe* в проектах геномных сборок 35 из 43 штаммов Psg, в трёх из 45 штаммов *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, в одном из восьми штаммов *P. syringae* pv. *aptata*, в одном из шести штаммов *P. syringae* pv. *papulans*, у 11 из 13 штаммов *P. syringae* pv. *pisi*, у обоих штаммов *P. syringae* pv. *spinaseae* и в геномной сборке, обозначенной как штамм *P. savastanoi* JD03 (номер: NCBI JANA KG010000000).

Таблица 10. Последовательности праймеров и зондов, использованных в исследовании

Праймер / зонд	Последовательность нуклеотида (5'-3' направление)	Целевой ген	Последовательность ампликона для типового штамма	Размер продукта, п.н.	Источник
Psg 2F	CCT-CCA-GTC-GAG-GGA-GAG-AA	этилен-пропирующий фермент (<i>efe</i>)	CCTCCAGTCGAGGGAGAGAA GCGTAATCGTAACTGGTTGCC TGGTGAGAGCTCAGCAGGCAT GTTTGAGCACGATGAACCTTG GACCTTCGTGACGCCACCCC AGGCGTGTGGACAGTTTTCCC AGGTGATATCTTGCAGTTCATG ACCGGCGGCCAGCTGCTTTCC ACTCCGCACAAGGTTAAGCTC AATACCCGCGAACGTTTCGCC TGCGCTTATTTTCATGAGCCTA ATTTTGAAGCATCCGCCTATCC GTTGTTTCGAGCCCAGCGCCAA TGAGCGTATTCATTATGGTGAG CACTTACCAACATGTTTATGC GTTGCTATCCAGATCGGATCAC C	342	Эта работа
Psg 2R	GGT-GAT-CCG-ATC-TGG-ATA-GCA-A				
ProbePsg2	(FAM)AC-CCG-CGA-ACG-TTT-CGC-CTG-(RTQ1)				
Cff 1F	GTT-ATG-AC(T/C)-GAA-CTT-CAC-TCC	трипсин подобная сериновая протеаза (<i>tlsp</i>)	GTTATGACTGAACTTCACTCCT ACAGTCTCGGCCCGTCCGAAT TTCCGGCGGCTGACGGTGAGT CGAACCCGTTAGTGAAGGCTG ACGAATCCGTCGATGCGGGAT GGACACTAGCACCGACGGAA CCAACGACTCACAATAGTGAG ACACGCCCCGTACGGATGCAA ACGACCGATAGCTCCATGTATT TCGGTCCTGCAGTTAGTCAGC AACGGACGCGCGCCGAGCGG TAGCAGCAACTATCGCCACGC CGCGAACTATTCAATCAATTGC CGCCACCCGGTCAACTGAACA CCGGGAACATCC	308	Tegli et al., 2002 (с модификациями)
Cff 1R	GGA-TGT-TCC-CGG-TGT-TCA-GT				
ProbeCff	(R6G)TC-AAT-TGC-CGC-CAC-CCG-GTC-(BHQ2)				

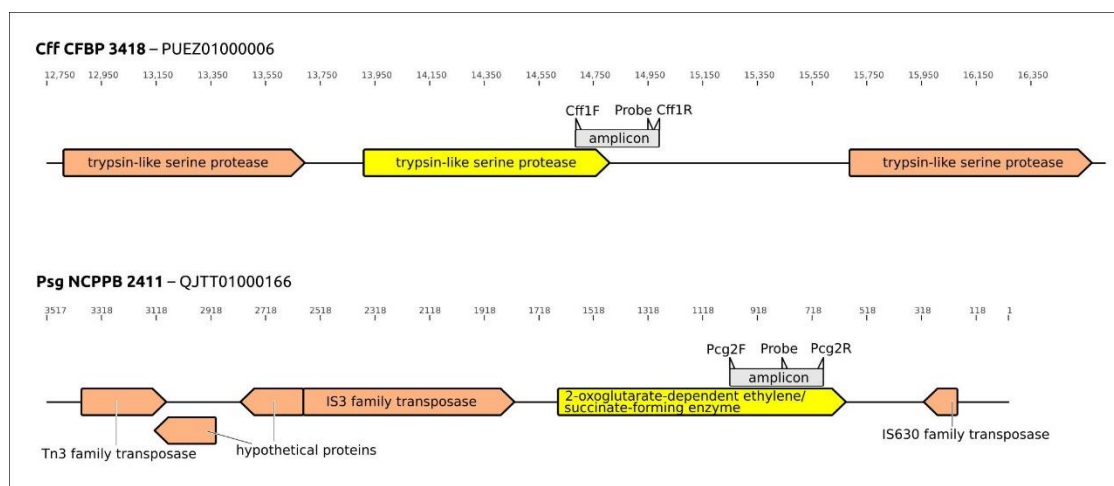


Рисунок 18. Геномные локусы, содержащие целевые гены, использованные для конструирования наборов праймеров. Cff CFBP 3418 означает типовой штамм *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (T), а Psg NCPPB 2411 - *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* NCPPB 2411(T). Регистрационные номера NCBI показаны справа от названий штаммов. Линейка вверху последовательностей показывает номер нуклеотидного основания в соответствующем контиге

По результатам расчётов средней нуклеотидной идентичности (ANI) последний может представлять собой штамм Psg (99,77% ANI по сравнению со штаммом типа Psg NCPPB 2411 = CFBP 2214 = ICMP 2189 = LMG 5066). Все перечисленные штаммы Psg были представлены черновыми сборками, поэтому отсутствие гена *efe* можно объяснить неполнотой геномов или, возможно, наличием аборигенных плазмид, как было показано ранее для других патогенов (Sato et al., 1997). Во всех штаммах целевой ген был обнаружен в одной копии.

Набор праймеров и зонды, использованные для ПЦР-диагностики Cff, были построены на основе ПЦР-протокола, разработанного Tegli et al. (2002). В наборе использовался ген трипсиноподобной сериновой протеазы (далее – *tlsp*) и прилегающая к нему 3'-некодирующая область, расположенная на островках патогенности, обнаруженных в сборках геномов Cff и плаزمид, потенциально связанных с патогенностью Cff (Evseev et. al., 2022) рис. 18). 5'-конец прямого праймера Cff1F был удлинен на три нуклеотида по сравнению с Tegli et al. (2002) для выравнивания температуры плавления праймеров Psg. Специфичность набора праймеров Cff была проверена с помощью поиска BLAST с использованием всех

277 геномных последовательностей *Curtobacterium* spp. в NCBI GenBank. Поиск показал наличие гена *tlsp* в 27 из 39 геномных последовательностей Cff, большинство из которых представляли собой черновые сборки, и в пяти плазмидах. Поиск не выявил целевую область в последовательностях, отличных от Cff. Последовательности ампликонов были идентичны для большинства штаммов за исключением одной вставки после положения 119 в последовательности ампликона и единственного полиморфизма С/Т в положении 9 по сравнению с типовым штаммом. Эти различия были обнаружены для четырёх новых штаммов Cff: Carlos1, Carlos2, Carlos4 и Carlos7. *In silico* анализ разработанных Cff-специфичных праймеров подтвердил отсутствие взаимодействия с нецелевыми микроорганизмами.

Стандартизация дуплексной классической ПЦР была проведена с использованием модифицированного метода Тагучи на этапе верификации классической ПЦР. На данном этапе проводили подбор оптимальных параметров ПЦР для получения повышенного выхода продуктов амплификации обоих генов и минимальной конкуренцией за dNTP. Были выбраны четыре критических фактора: концентрации MgCl₂ и dNTP, а также праймеры для Psg и Cff. Схема эксперимента включала девять реакций (см. подраздел «Материалы и методы», табл. 1-2), которые приводили к выходу разной интенсивности продуктов амплификации (рис. 19).

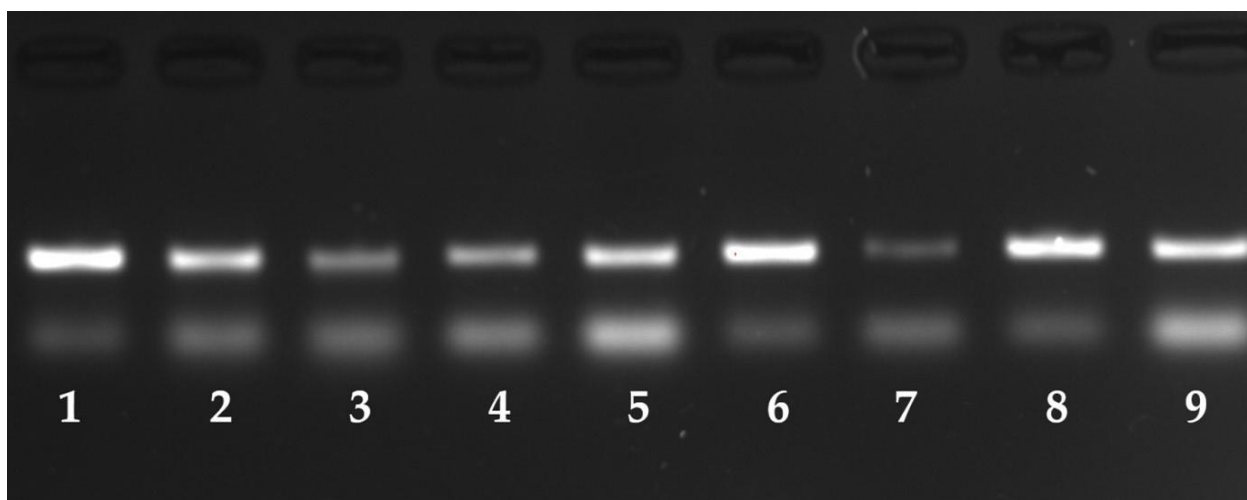


Рисунок 19. Классическая реакция ПЦР для дуплексного анализа в девяти вариантах реакции по модели эксперимента Тагучи (описание вариантов реакции см. в табл. 2)

Подтверждено наличие ампликонов с ожидаемой молекулярной массой (342 п.н. для гена *efe* и 308 п.н. для гена *tlsp*). Никаких неспецифических продуктов амплификации не наблюдалось. Анализ электрофоретических изображений, полученных денситометрической обработкой агарозного геля (рис. 20), продемонстрировал определённую конкуренцию между амплификацией генов *efe* и *tlsp* в нескольких вариантах реакционной смеси (Tarakanov et al., 2023с).

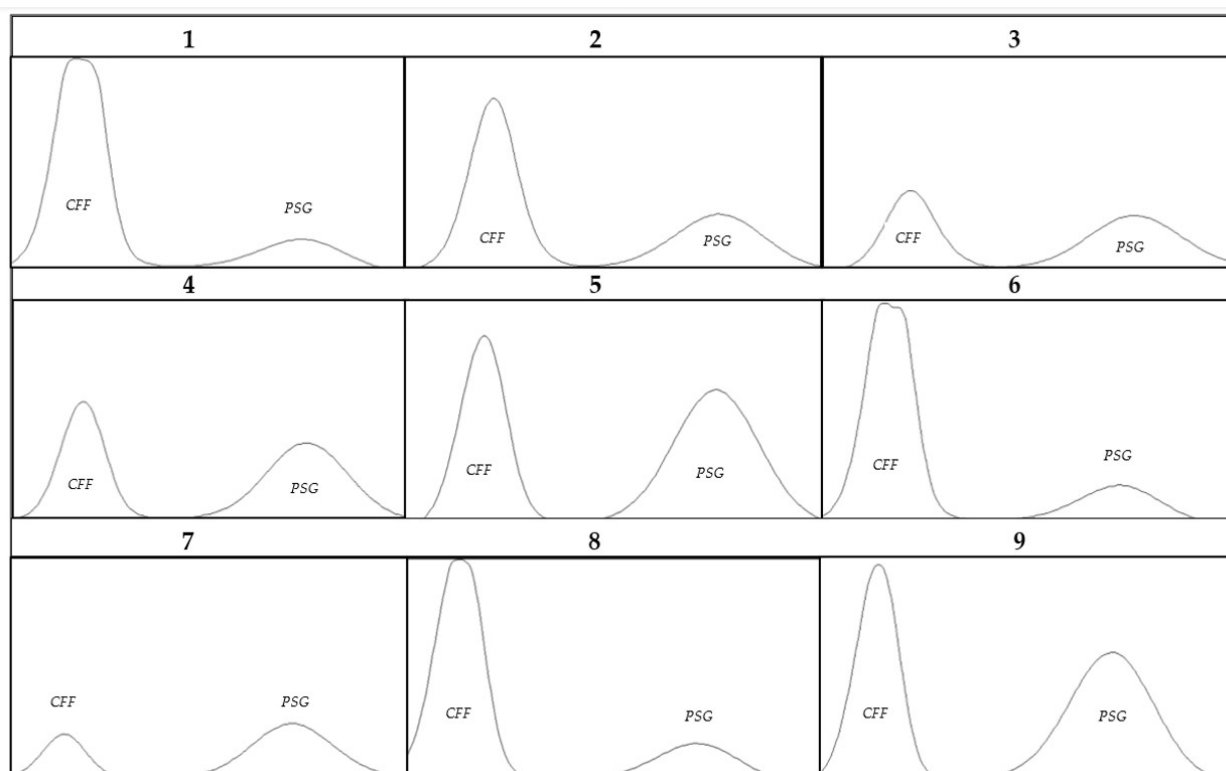


Рисунок 20. Количественная оценка ампликонов дуплексной классической ПЦР с помощью программы ImageJ для девяти вариантов реакции в соответствии с моделью эксперимента Тагучи (описание вариантов реакции см. в табл. 2)

Варианты показали разные общие выходы продуктов амплификации. Анализ данных денситометрии показал, что наибольший выход продуктов амплификации фрагмента гена *tlsp* наблюдался в вариантах 1, 6 и 8, а наибольшее количество ампликонов гена *efe* - в вариантах 5, 4 и 9.

Анализ показал, что оптимальным являлся вариант 3, где баланс количества продуктов амплификации (отношение суммы сигналов к дисперсии) был наибольшим, составив 0,077, при среднем выходе 10757-11573 единиц (табл. 11). Оптимальный состав реакционной смеси, который использовался в дальнейших

экспериментах, был следующим: 1,25 U полимеразы SmarTaq, 1,25 мкМ MgCl₂, прямой и обратный праймеры для генов *efe* и *tlsp* по 30,0 пмоль на каждую пару, по 400 мкМ каждого dNTP, 1+1 мкл ДНК каждого вида бактерий, 2,5 мкл 10-кратного буфера и воды для ПЦР до общего объема 25 мкл.

Таблица 11. Анализ ПЦР ампликонов, полученных в рамках экспериментов по модели Тагучи. Показаны средние значения трёх экспериментов

Номер реакции	Среднее значение сигнала, единиц (n=3)		Разница в значении сигнала (в модуле)	Соотношение суммы сигналов к разнице сигналов	Дисперсия	Соотношение суммы сигналов к дисперсии
	Cff	Psg				
1	31436,1	5634,2	25 760,6	1,4	331803972,8	0,000111928
2	22270,1	10537,8	11 298,4	2,9	63826412,9	0,000519752
3	10757,1	11573,9	763,5	29,3	291461,5	0,076800513
4	13223,6	14920,4	1 363,5	20,9	929574,3	0,030634814
5	22067,9	28590,5	6 162,6	8,2	18988622,2	0,00265168
6	27990,0	7082,2	20 796,4	1,7	216244627,4	0,000161673
7	4549,3	10567,5	6 018,2	2,5	18109443,9	0,000834749
8	25841,0	6818,7	19 021,1	1,7	180900818,3	0,000180532
9	23321,8	104285,9	3 959,0	12,8	7836856,3	0,006458295

Оптимизацию температуры отжига праймеров/зондов проводили путём амплификации при разных значениях данного показателя. Для перехода в режим ПЦР в реальном времени к реакционной смеси добавляли по 0,5 мкл каждого зонда (ProbePsg2 и ProbeCff) в концентрации 20 пМ/мкл и проводили ПЦР при температуре отжига от 58 до 63 °С. Различные значения флуоресценции наблюдали при каждой используемой температуре отжига (рис. 21). Максимальное среднее значение флуоресценции (2144 RFU) наблюдали при 62,7°С для продукта гена *tlsp*, а 1058 RFU - при 61,2°С для продукта гена *efe*. В случае значений Ct цикла результаты несколько отличались: самые низкие средние значения порогового цикла были получены при температуре отжига 60,0°С для продуктов обоих генов (19,05 для *efe* и 18,55 для *tlsp*). Поэтому для дальнейших экспериментов была выбрана температура отжига 60,0°С.

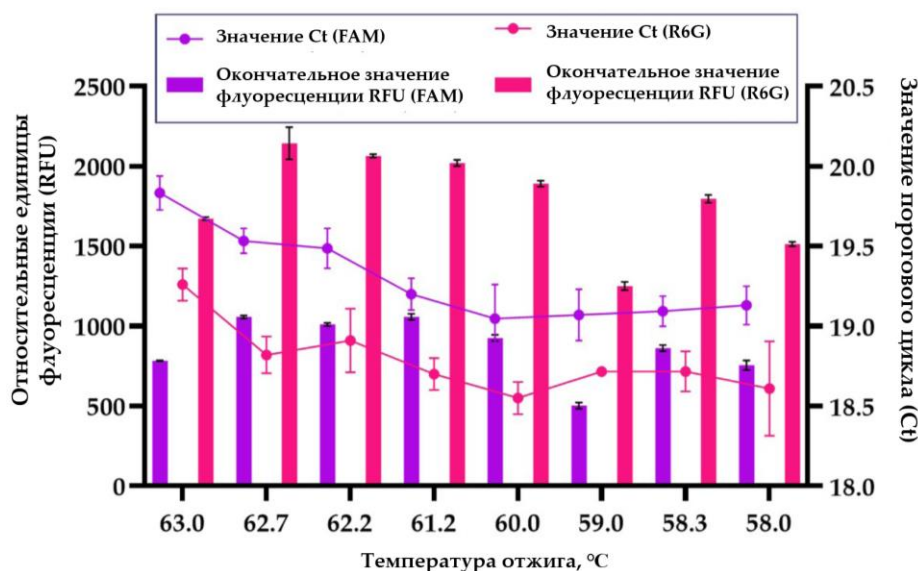


Рисунок 21. Влияние температуры отжига праймеров на значения порогового цикла (Ct) для каналов FAM (Psg) и R6G (Cff). Представлены средние значения со стандартными отклонениями для пяти независимых повторений

Специфичность мультиплексной ПЦР в реальном времени была протестирована с использованием изолятов бактерий перечисленных в прил. Е. Специфичность разработанных праймеров была проверена на 30 ранее идентифицированных целевых бактериях: 18 штаммах родственных видов (*P. syringae* pv. *pisi*, *P. syringae* pv. *aptata*, *P. savastanoi*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola*, *P. fuscovaginae*, *P. fluorescent*, *C. flaccumfaciens* pv. *betae*, *C. flaccumfaciens* pv. *oorti*, *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae*, *C. herbarum*, *C. citreum*, *C. albidum*, *C. luteum*, *C. pusillum*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*), штамме нецелевого патогена сои (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) и на 12 штаммах нецелевых бактерий, встречающихся в виде эпифитов на растениях (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Pectobacterium carotovorum*, *Pantoea agglomerans* и *Agrobacterium radiobacter*). Положительный результат ПЦР-амплификации был достигнут для всех анализируемых целевых штаммов – Psg или Cff (прил. Е). В ходе анализа только штамм *P. syringae* pv. *pisi* показал ложноположительную амплификацию с Psg-специфическим праймером/зондом (канал FAM). В праймерах Cff-специфической ПЦР (флуорофор R6G) штаммов с ложноположительной амплификацией не обнаружено. Те же штаммы были использованы для классического ПЦР-анализа с использованием ранее разработанных методов (Bereswill et al., 1994; Tegli et al.,

2002), и были получены неожиданные результаты. При этом расхождений в результатах классической ПЦР в сравнении с мультиплексной ПЦР в реальном времени на Cff не выявлено. Неспецифическая амплификация с ДНК *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* и *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* наблюдалась при классической ПЦР с праймерами гена *efe* (табл. 1). Протокол мультиплексной ПЦР в реальном времени не выявил ложноположительной амплификации ДНК нецелевых бактерий. В то же время при использовании классического протокола ПЦР (Bereswill et al., 1994) наблюдалась неспецифическая амплификация, приведшая к получению продуктов, отличающихся от целевого (650 п.н.) (табл. 1) у многих нецелевых штаммов, что вызвало проблемы при интерпретации результатов ПЦР-анализа. Это подтверждает необходимость использования ПЦР в реальном времени во избежание возможных ложноположительных результатов.

Чувствительность симплексной реакции оценивали на серийных разведениях геномной ДНК штаммов Psg (NCPPB 2411) и Cff (CFBP 3418); результаты представлены в табл. 12 и на рис. 22А.

Таблица 12. Анализ чувствительности симплексной и мультиплексной ПЦР в реальном времени на серийных разведениях ДНК Psg и Cff. Представлены средние значения порогового цикла \pm стандартного отклонения при трёхкратной повторности опыта

Содержание ДНК в пересчёте на реакцию	Симплексная ПЦР в реальном времени		Мультиплексная ПЦР в реальном времени	
	FAM (Psg NCPPB 2411)	R6G (Cff CFBP 3418)	FAM (Psg NCPPB 2411)	R6G (Cff CFBP 3418)
100 нг	17,41 \pm 0,05	15,74 \pm 0,31	18,39 \pm 0,18	15,86 \pm 0,12
10 нг	21,31 \pm 0,21	18,98 \pm 0,16	21,02 \pm 0,12	19,15 \pm 0,43
1 нг	24,86 \pm 0,34	22,49 \pm 0,22	24,31 \pm 0,19	22,72 \pm 0,22
0,1 нг	28,18 \pm 0,50	26,45 \pm 0,15	28,69 \pm 0,09	26,71 \pm 0,07
0,01 нг	31,3 \pm 0,08	29,72 \pm 0,25	31,2 \pm 0,15	28,79 \pm 0,23
Эффективность (%)	94,36	91,53	99,7	99,2
Наклон кривой	-3,465	-3,543	-3,329	-3,342
Значение Y	24,612	22,676	34,71	32,672

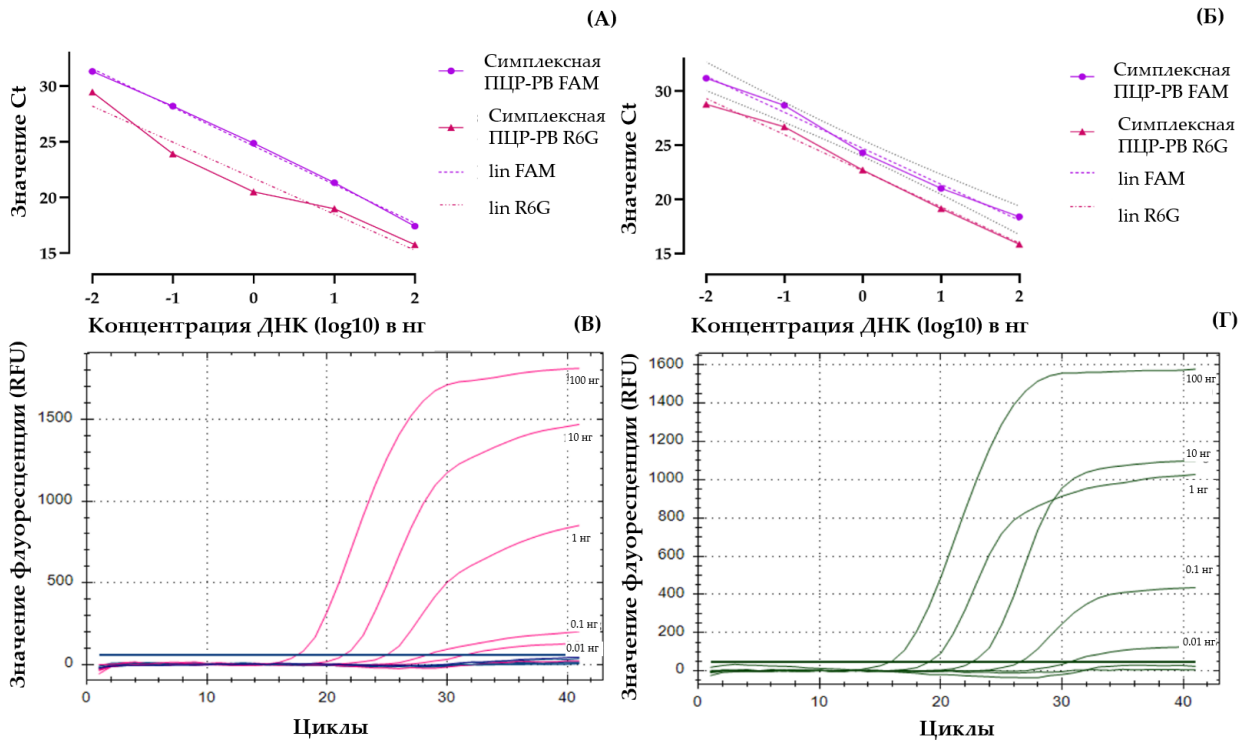


Рисунок 22. Чувствительность обнаружения ДНК методом симплексной (А) и мультиплексной ПЦР в реальном времени (Б, В, Г). Log₁₀ концентраций ДНК (нг) сравнивали с соответствующими значениями Ct в (А) и (Б). Кривые флуоресценции мультиплексной ПЦР в реальном времени показаны для Psg (В, FAM) и Cff (Г, R6G)

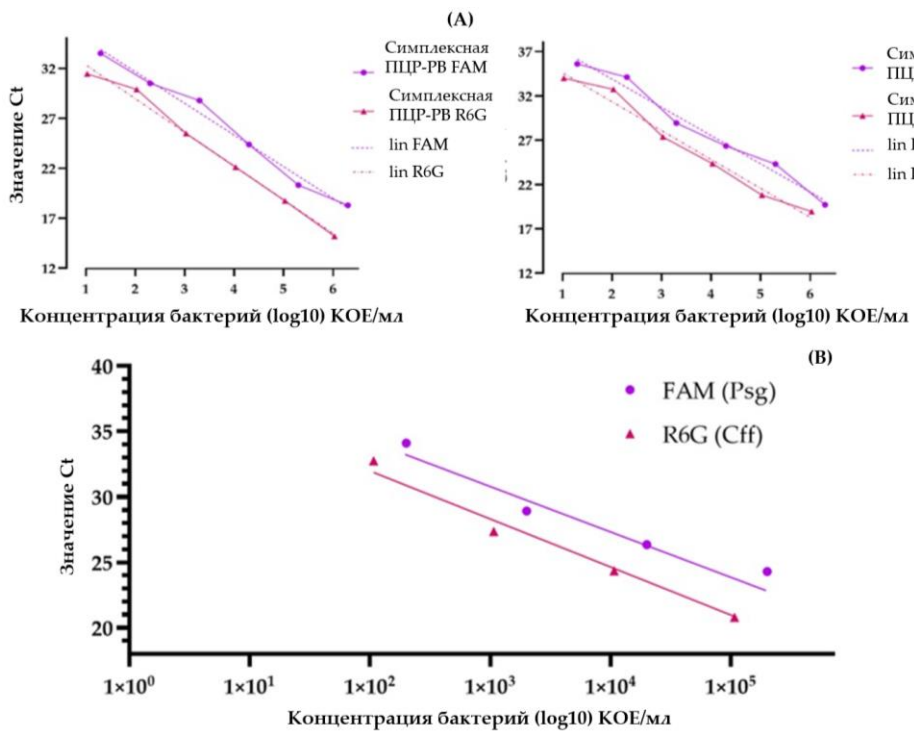


Рисунок 23. Чувствительность тест-системы при обнаружении Psg и Cff в симплексной (А) мультиплексной ПЦР в реальном времени (Б) и стандартная кривая (В) для мультиплексной ПЦР в реальном времени

Анализ обнаружения Psg показал последовательную амплификацию гена *efe* при концентрации ДНК 0,01 нг на реакцию или более. Чувствительность обнаружения Cff была примерно равна (но с более низкими значениями порогового цикла) чувствительности Psg (около 0,01 нг на реакцию). Рассчитанная эффективность реакции составила 94,36% для Psg и 91,53% - для Cff. Обнаружение Cff через ген *tlsp* показало более низкие значения порогового цикла, чем анализ обнаружения Psg.

Анализ чувствительности мультиплексной ПЦР в реальном времени показал, что предел обнаружения концентрации ДНК Psg и Cff составил не менее 0,01 нг на реакцию. Эффективность реакции была рассчитана как 99,7% для Psg и 99,2% - для Cff (табл. 12, рис. 22 Б-Г). Использование разработанных праймеров и зонда также показало хорошие результаты при использовании в качестве матрицы разведений суспензий бактерий (от 10^6 до 10^1 КОЕ/мл) штаммов Psg NCPPB 2411 и Cff CFBR 3418. Результаты, представленные на рис. 23А-Б указывают на незначительные различия при использовании каждого вида бактерий отдельно в качестве матрицы (симплекс) или после смешивания (мультиплекс).

Средние значения C_t симплексной ПЦР в реальном времени при концентрации 10^3 КОЕ/мл составили 28,7 и 25,5 цикла для Psg и Cff, тогда как для мультиплексной ПЦР в реальном времени значения в среднем составили 28,9 и 27,4 цикла, соответственно. Одновременная амплификация двух целевых генов незначительно увеличила значения пороговых циклов в мультиплексной ПЦР в реальном времени по сравнению с симплексной ПЦР в реальном времени.

Для моделирования анализа семян сои на наличие целевых организмов серийные разведения бактерий добавляли к лишённому патогенов экстракту семян сои, гомогенизированному в буфере. Тотальную ДНК выделяли и использовали для постановки ПЦР. Применённый протокол ПЦР позволил обнаружить целевые бактерии с концентрацией выше 100 КОЕ/мл (рис. 23В). Значения порогового цикла линейно коррелировали с концентрацией бактерий и позволили построить

стандартную кривую (рис. 23В). Эту кривую можно использовать для приблизительной количественной оценки присутствия бактерий в пробах.

Апробация разработанного протокола мультиплексной ПЦР в реальном времени была проведена с использованием коммерческих семян сои. Всего было протестировано 25 образцов семян, собранных в 2022 году из нескольких регионов России. Три образца продемонстрировали положительный сигнал при мультиплексной ПЦР в реальном времени. Положительный результат на Psg показан в пробе из Амурской области, а пробы из Тверской и Воронежской областей показали положительный результат на Cff. Те же образцы были проверены с использованием протоколов Bereswill et al. 1994 и Tegli et al. 2002, и результаты также были положительными. При анализе протоколом (Bereswill et al., 1994) помимо целевого продукта размером 650 п.н. наблюдалась неспецифическая амплификация нецелевых штаммов.

Таким образом, в рамках исследования был разработан протокол мультиплексной ПЦР в реальном времени с использованием зондов TaqMan для одновременного обнаружения патогенов сои *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* и *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Специфичность метода была подтверждена с использованием 25 штаммов бактерий-мишеней и 18 штаммов других бактерий, распространённых на семенах сои в качестве эпифитов. Было показано, что разработанная мультиплексная ПЦР в реальном времени обладает высокой чувствительностью - положительный результат был достигнут при концентрации 0,01 нг/мкл ДНК для обоих целевых организмов и при 100 КОЕ/мл бактерий - в гомогенате семян сои. Надёжность разработанной мультиплексной ПЦР в режиме реального времени была подтверждена параллельным анализом 25 коммерческих партий семян новым и ранее опубликованным протоколами ПЦР. Во всех тестах три партии семян были положительными, а 22 – отрицательными. Мультиплексная ПЦР в реальном времени может применяться в фитосанитарной диагностике семян для одновременного выявления возбудителей двух бактериальных патогенов сои.

3.6. Оценка устойчивости сортов сои к бактериальным болезням

Успех селекции на устойчивость во многом определяется наличием эффективных методов создания искусственного инфекционного фона и сведениями об агрессивности штаммов фитопатогенов. Данное направление в защите зернобобовых от бактериозов активно развивается в других странах (Monteil et al., 2016), но в России отсутствует информация об уровне устойчивости к бактериозам у используемых на производстве сортов сои. В рамках данного раздела сравнивали различные способы создания искусственного инфекционного фона и проводили скрининг коллекции сортов сои, выращиваемых на территории РФ, на устойчивость к Psg и Cff.

Сравнение способов инокуляции сои возбудителями бактериальных болезней. Симптомы, полученные в ходе инокуляции, соответствовали описанию фенотипических проявлений реакции растения на патогены (рис. 24А-Б). При заражении листьев Psg появлялся желтоватого цвета хлороз, к моменту учёта переходящий в некроз коричневатого цвета с изъязвлениями листовой пластинки. При заражении Cff наблюдали соломенного цвета хлороз, постепенно переходящий в такой же окраски некроз листовой пластинки.

На рис. 25 представлены данные о площади поражения листьев и затратах рабочего времени при инокуляции листьев различными методами. Максимальная площадь поражения как Psg, так и Cff листьев сои была получена при инокуляции при помощи аэрографа (15,6 и 12,7%, соответственно). Наименьшие значения получены при инокуляции листьев методом инфильтрации суспензии в мезофилл листа (1,54 и 1,67%, соответственно). Способ II (срез листа ножницами, смоченными суспензией) также показал максимальные значения зоны поражения листа (9,7 и 8,1%, соответственно). Причём, при способах I (инфильтрация суспензии в мезофилл листа) и III (инокуляция пинцетом и ватой, смоченными в суспензии) некроз был получен и в контрольном варианте, что связано с механическим давлением шприца и пинцета, приводящим к отмиранию тканей вокруг места инокуляции. Способ IV (введение суспензии в черешок пары примордиальных листьев) не привёл к появлению симптомов, что может быть связано с различиями проводящей системы сои и фасоли, для которой этот метод

применяется для скрининга сортов на устойчивость к Cff (Soltani et al., 2017).

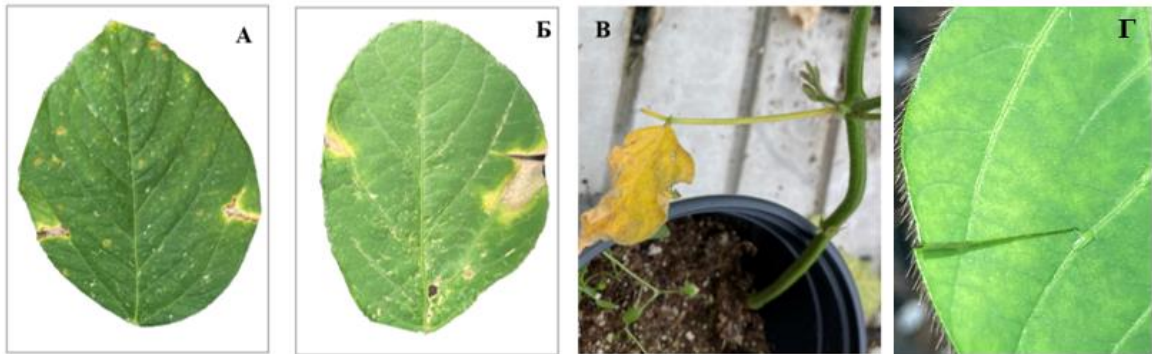


Рисунок 24. Реакция сортов сои на инокуляцию штаммами возбудителей бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости сои методом разрезания листа ножницами, смоченными в суспензии бактерии (А- инокуляция Psg, Б – инокуляция Cff, В – абортация тройчатого листа и черешка после инокуляции сорта Нордика штаммом Psg CFBP 2214 на 21 день, Г – контроль (вода))

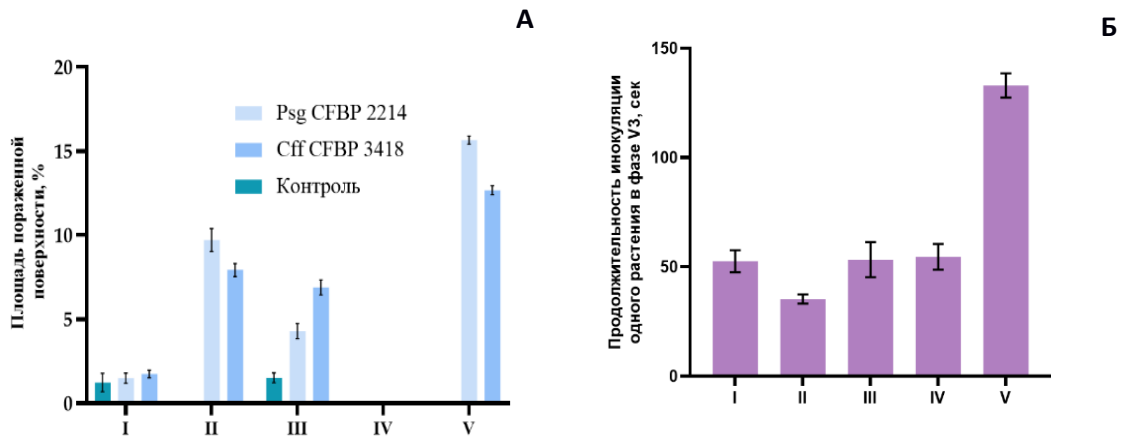


Рисунок 25. Сравнение различных способов создания инфекционного фона Psg и Cff на листьях сои. Площадь поражения поверхности листьев сои при искусственном заражении различными методами (А). Затраты времени для инокуляции листьев сои разными методами (В). I - инфильтрация суспензии в мезофилл листа; II - срез листа ножницами, смоченными суспензией; III - инокуляция пинцетом и ватой, смоченными в суспензии; IV - введение суспензии в черешок пары примордиальных листьев; V - инфильтрация при помощи аэрографа

По продолжительности времени, необходимого для инокуляции одного растения, наименьшее значение показателя было продемонстрировано в варианте II (срез листа ножницами, смоченными суспензией - 36,5 сек), наибольший – в варианте V (инфильтрация при помощи аэрографа - 133,4 сек). V вариант

инокуляции, хоть и являлся трудозатратным по сравнению с другими, но позволял создавать стабильный инфекционный фон с высокой степенью поражения листьев обеими бактериями. В дальнейшем для оценки устойчивости коллекции сортов сои к бактериозам использовали способ II, показавший хорошие результаты как по площади поражения, так и по затратам времени на инокуляцию растения.

Результаты искусственного заражения коллекции сортов тремя штаммами Psg и 3 – Cff показаны на рис. 26 и в табл. 13. В результате учёта поражаемости сортов сои выяснено, что все сорта поражаются всеми штаммами бактерий, однако существуют значительные различия в размере зоны поражения растений каждого конкретного сорта.

Сорта разделили на 4 группы по поражаемости каждым патогеном (табл. 13). По отношению к Psg первая наименее поражаемая группа (обозначение 1 в табл. 13; Тараканов, 2022б) была наибольшей по численности, и в неё вошли 23 сорта, во вторую – 9, в третью – 10, в четвертую – 3 сорта. У Cff картина распределения групп по поражаемости была следующей: первая группа – 22 сорта, вторая – 9, третья – 11, четвертая – 3 сорта.

Наименее поражаемыми Psg были растения сорта Соер 4, показавшие минимальный размер зоны поражения (в среднем 0,61 мм по всем трём штаммам). Самым восприимчивым оказался сорт Осмонь (в среднем 6,88 мм по всем трём штаммам). В случае с Cff наименее поражаемым был также сорт Соер 4 (в среднем 0,46 мм), а больше всех поражался сорт Нордика (в среднем ширина зоны с симптомами составила 6,23 мм).

Таким образом сорт Соер 4, как наименее поражаемый, рекомендуется для дальнейшего изучения и включения в селекционные программы по сое как источник устойчивости к бактериальному ожогу и ржаво-бурой бактериальной пятнистости. Сильнопоражаемые сорта Нордика и Осмонь рекомендуется использовать как наиболее восприимчивые при оценке вирулентности штаммов патогенов и на этапе проведения теста на патогенность при диагностике семян на наличие возбудителей бактериозов (EPPO, 2011).

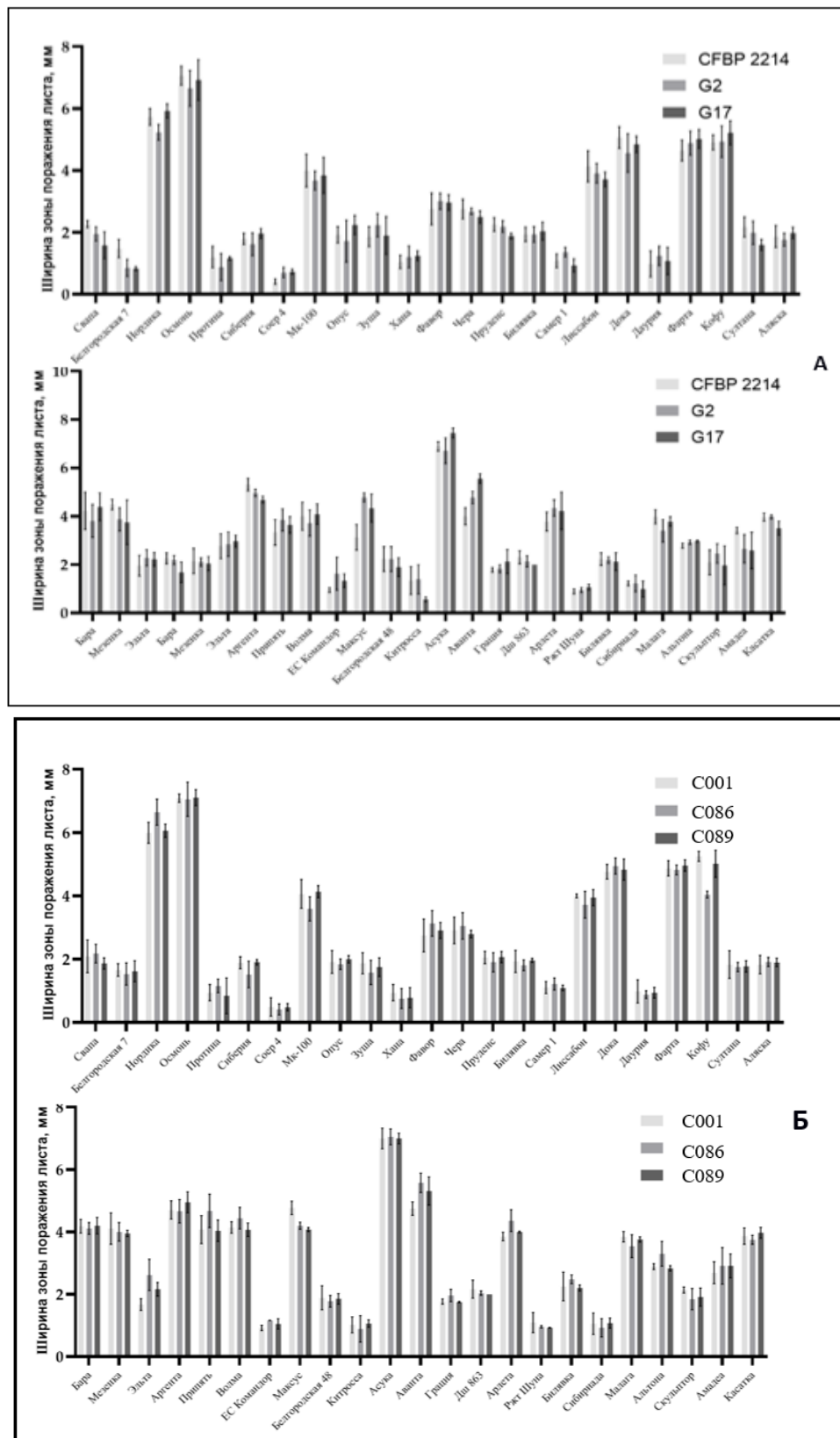


Рисунок 26. Значения ширины зоны поражения листьев сортов сои при инокуляции ножницами, смоченными в суспензии разных штаммов Psg (А) и Cff (Б)

Таблица 13. Степень поражаемости сортов сои возбудителями бактериального ожога (Psg) и ржаво-бурой бактериальной пятнистости (Cff)

Сорт	Psg		Cff	
	Буквенное обозначение статистической группы*	Группа поражаемости**	Буквенное обозначение статистической группы*	Группа поражаемости**
Аванта	h	3	dfg	3
Альтона	d	2	fgh	2
Аляска	c	1	mnp	1
Амадеа	d	2	kl	2
Аргента	h	3	op	3
Арлета	g	3	bc	3
Асука	j	4	s	4
Бара	c	2	lmno	3
Белгородская 48	c	1	bc	1
Белгородская 7	b	1	d	1
Билявка	c	1	c	2
Волма	efg	3	bc	3
Грация	c	1	ghi	1
Даурия	b	1	q	3
Дока	h	3	bc	3
Дш 863	c	1	lmnp	1
ЕС Командор	b	1	p	1
Зуша	c	1	b	1
Касатка	efg	2	fgh	2
Китросса	b	1	u	1
Кофу	h	3	dfg	3
Лиссабон	efg	3	q	2
Максус	fg	3	dfg	3
Малага	ef	2	j	2
Мезенка	c	2	hi	3
Мк-100	efg	3	klmn	2
Нордика	i	4	t	4
Опус	c	1	df	1
Осмось	j	4	u	4
Припять	e	2	nop	3
Протина	b	1	bc	1
Пруденс	c	1	dfgh	1
Ржт Шуна	b	1	i	1
Самер 1	b	1	klm	1
Свапа	c	1	fghi	1
Сиберия	c	1	dfg	1
Сибириада	b	1	k	1
Скульптор	c	1	j	1
Соер 4	a	1	a	1

Султана	c	1	dfgh	1
Фавор	d	2	j	2
Фарта	h	3	q	3
Хана	b	1	j	1
Чера	d	2	fgh	2
Эльта	d	1	q	1

Примечания: * - значения в строках, отмеченных разными буквами, указывают на значительную разницу по критерию Дункана при $p=0,05$; ** - группа поражаемости по распределению ширины зоны поражения листа с симптомами (1 – слабо поражаемая, 2 – средне поражаемая, 3 – сильно поражаемая, 4 – очень сильно поражаемая).

Отмечено, что все штаммы в пределах вида патогена давали почти одинаковые размеры зоны поражения листа. Это может указывать на однородность популяции патогена в России, как выявлено, например, для *Xanthomonas campestris* pv. *vitiensis* на салате (Barak et al., 2003). Однако в некоторых парах «штамм-сорт» размер зоны поражения статистически отличался от двух других штаммов того же патогена. Например, отличались штаммы Psg: CFBP 2214 на сорте Соер 4, G17 на сорте Китросса, все штаммы между собой - на сорте Аванта, а у Cff штаммы: C086 - на сорте Кофу, CFBP 3418 - на сортах Эльта и Максус. Данный факт может быть связан с наличием штаммоспецифичной реакции сорта на инокуляцию тем или иным штаммом.

Сорта Нордика и Опус после инокуляции Psg и сорт Максус после инокуляции Psg и Cff по происшествии 10 дней после учёта симптомов (на 21 день после инокуляции) продемонстрировали реакцию абортации заражённых тройчатых листьев (рис. 24В). Данная системная реакция может косвенно указывать на наличие реакции сверхчувствительности, описанную, к примеру для *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* в работе (Álvarez-Mejía et al., 2015). Механизм этого процесса заключается в том, что при несовместимом взаимодействии белок Avr распознается продуктом гена резистентности R, который запускает реакцию сверхчувствительности (СВЧ) и приводит к прерыванию заболевания. Возможно, данный механизм приводит к абортации листа и прерыванию болезней, вызванных Psg и Cff. Необходимо в дальнейшем провести подробное исследование,

описывающее истинный механизм данного феномена и обосновать возможность использования данных сортов как источников устойчивости с реакцией СВЧ.

3.7. Использование фагов в защите сои от бактериального ожога сои

Тренд последних лет в защите растений от бактериальных болезней – использование бактериофагов – специфических вирусов, поражающих бактерии (Kazantseva et al., 2021). К основным достоинствам применения фагов относят их высокую специфичность к бактерии-хозяину, безопасность в отношении человека и природных биотопов, а также дешевизну их производства (Holtappels et al., 2021). Для успешного применения данных вирусов в борьбе с бактериальными болезнями растений необходим тщательный отбор изолятов, биологическая характеристика высокоэффективных и стабильных коктейлей фаговых препаратов, тестирование их на патогенных бактериях в модельных и природных системах (Орынбаев, 2019). В литературе описано несколько фагов, эффективных в отношении Psg (Addy et al., 2016; Susianto et al., 2014), однако в этих публикациях отсутствуют анализы генома фагов и эффективности *in planta* в борьбе с бактериальным ожогом на растениях сои. В этом разделе мы проводили характеристику бактериофагов *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* и оценку эффективности их применения в защите сои от бактериального ожога.

Все изученные фаги были выделены из почвы под посевами сои в географически удалённых друг от друга регионах производства сои в европейской (Белгородская область, фаг P413) и азиатской (Амурская область, фаг P421; Приморский край, фаг P311) частях страны. Все три фага были выделены с использованием штамма Psg CFBR 2214 качестве хозяина и образовывали на бактериальном газоне схожие крупные бляшки (Ø7–8 мм) с гладкими границами (рис. 27А). Специфичность фагов Psg была протестирована в отношении ряда видов *Pseudomonas* spp. и других фитопатогенных бактерий. Фаги P421 и P311 инфицировали 13 штаммов Psg, а фаг P413 инфицировал десять протестированных штаммов Psg (табл. 14). Помимо Psg, фаги инфицировали некоторые родственные бактерии: *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*, *P. savastanoi* pv. *phaseolicola* и *P.*

savastanoi pv. *savastanoi*, и могут рассматриваться как ценные агенты биоконтроля широкого спектра патогенов, родственных *P. savastanoi*.

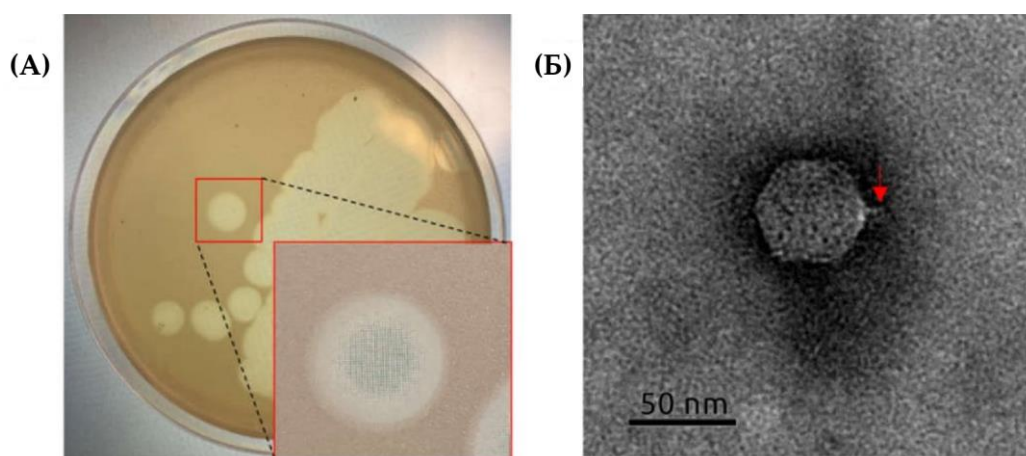


Рисунок 27. Форма бляшек фага P421 на 0,7% верхнем агаре YD со штаммом бактерии-хозяина CFBP 2214. Другие выбранные фаги имели ту же морфологию литических бляшек (А). Изображение фага P421 с помощью просвечивающей электронной микроскопии P421 (Б). Расположение хвоста указано красной стрелкой. Шкала равна 50 нм

Таблица 14. Спектр литической активности фагов в отношении штаммов *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* и родственных видов

Вид бактерии	Штамм; локация, хозяин и год выделения	Образование бляшки при взаимодействии с фагом		
		311	P421	413
Целевые штаммы				
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	G1	+	+	+
	G2	-	+	+
	G3	+	+	+
	G4	+	+	+
	G5	+	+	+
	G6	+	+	+
	G7	+	+	+
	G8	+	+	+
	G9	+	+	+
	G10	+	+	-
	G11	+	+	-
	G17	+	-	-
	CFBP ¹ 2214	+	+	+
Нецелевые штаммы				
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisii</i>	CFBP 2105	+	+	+

<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	CFBP 1429; Нидерланды, <i>Phaseolus vulgaris</i> , 1973	+	+	+
<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i>	NCPPB ² 21342; США, <i>Olea europaea</i> , 1962	+	+	+
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	DSM ³ 10604 (ATCC 19310, ICMP 3023, ICPB); Великобритания, <i>Syringa vulgaris</i> , 1972	-	-	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	РГАУ-ЗР ⁴ 2-04; Россия, <i>Beta vulgaris</i> , 2017	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>	РГАУ-ЗР 24; Россия, почва, 2017	-	-	-
<i>Pseudomonas asplenii</i>	DSM 7231; Япония, <i>Oryza sativa</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	РГАУ-ЗР grape ROOT 4; Россия, почва, 2012	-	-	-
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	CFBP 2534; США, <i>Phaseolus vulgaris</i> , 1986	-	-	-
<i>Xanthomonas glycines</i>	РГАУ-ЗР Xgly; Россия, <i>Glycine max</i> , 1960	-	-	-
<i>Xanthomonas phaseoli</i> v. <i>sojense</i>	РГАУ-ЗР Xphs; Россия, <i>Glycine max</i> , 1960	-	-	-
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	C001; Венгрия, <i>Phaseolus vulgaris</i> , 1957	-	-	-
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	NCPPB 528T; Великобритания, брюссельская капуста, <i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> , 1958	-	-	-
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Semia 5079, Semia 5080 и Semia 532 С из коммерческих инокулянтов Атува ⁵ и Хайкоут Супер	-	-	-

Примечание: «+» - лизис бактериальных клеток (образование бляшки), «-» - отсутствие лизиса бактериальных клеток (отсутствие образования бляшек). ¹: CFBP – CIRМ-CFBP (Международный центр микробных ресурсов; коллекция бактерий, ассоциированных с растениями, Франция). ²: NCPPB – Национальная коллекция фитопатогенных бактерий, Великобритания. ³: DSM-Институт Лейбница DSMZ - немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур. ⁴: РГАУ-ЗР – коллекция микроорганизмов кафедры защиты растений РГАУ – МСХА. ⁵: коммерческие инокулянты для обработки семян сои и стимуляции образования ризобиальных клубеньков; зарегистрированы в России как инокулянты Атува (ООО "Сингента") и Хайкоут Супер (ООО "БАСФ").

Фаги были авирулентны к штамму-азотфиксатору *Bradyrhizobium japonicum*, применяемому для обработки семян сои и, таким образом, были безопасны для обычных азотфиксаторов (Tarakanov et al., 2022a).

Изображения трех фагов с помощью просвечивающей электронной микроскопии (показаны на рис. 27Б) демонстрировали типичную морфологию подовируса С1 с изометрическим капсидом диаметром ~ 58 нм и тонким хвостом длиной ~ 12 нм.

Фаги почти полностью адсорбировались на клетках штамма-хозяина Psg CFBR 2214 за 4 мин (рис. 28А) при 28°C. Все фаги лизировали бактерии примерно за 100 мин, образуя 230 ± 9 частиц потомства на инфицированную бактериальную клетку (рис. 28Б). В течение 3 ч после инокуляции не наблюдалось устойчивых к фагам форм бактерий.

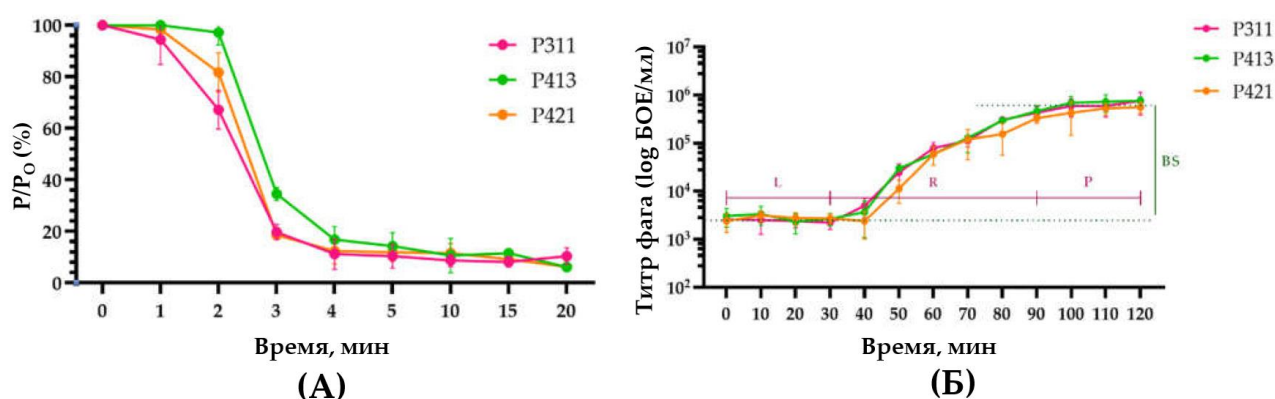


Рисунок 28. Кривые адсорбции (А) и одностадийного роста (В) фагов Р311 (розовая линия), Р413 (зеленая линия) и Р421 (оранжевая линия). *P. savastanoi* pv. *glycinea*. По оси ординат показано отношение текущего титра в каждый момент времени (Р) к исходному (P_0). L – латентная фаза; R– фаза высвобождения вириона; P– фаза плато; BS – размер вспышки титра фага

Геномная и филогенетическая характеристика фага Р421 была проведена в ИБХ им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН. Фаги *Pseudomonas* Р413 и Р421 (регистрационные номера GenBank #OM282085 и OM256450) имели двухцепочечные ДНК-геномы из 40 658 и 41 738 пар оснований, соответственно. Расчёты средней нуклеотидной идентичности среди 15 000 фагов, депонированных в базе данных GenBank по фагам по состоянию на октябрь 2021

года, выявили группу фагов *Pseudomonas*, кластеризующихся с P421 и принадлежащих к роду *Ghnavirus* подсемейства *Studiervirinae*, состоящую из T7-подобных фагов *sensu lato*. Значение средней нуклеотидной идентичности составляло примерно 63-92% от такового у фага P421. Филогенетический анализ с использованием конкатенированных выравненных белковых последовательностей основного капсидного белка, большой субъединицы терминазы, ДНК-полимеразы и РНК-полимеразы поместил фаг P421 вместе с другими фагами, содержащими *Autographiviridae Ghnavirus*, в монофилетическую группу.

Из-за высокой степени сходства между собой для дальнейшего изучения эффективности защитного действия в отношении Psg в экспериментах *in vitro* и в вегетационных экспериментах *in planta* был выбран фаг P421. Для оценки потенциала практического применения фагов, было проведено исследование для определения их устойчивости к различным факторам окружающей среды.

Анализ устойчивости фага Psg P421 к стрессовым факторам показал, что ультрафиолетовое облучение (280-315 нм) снижало жизнеспособность фага пропорционально периоду обработки (рис. 29А).

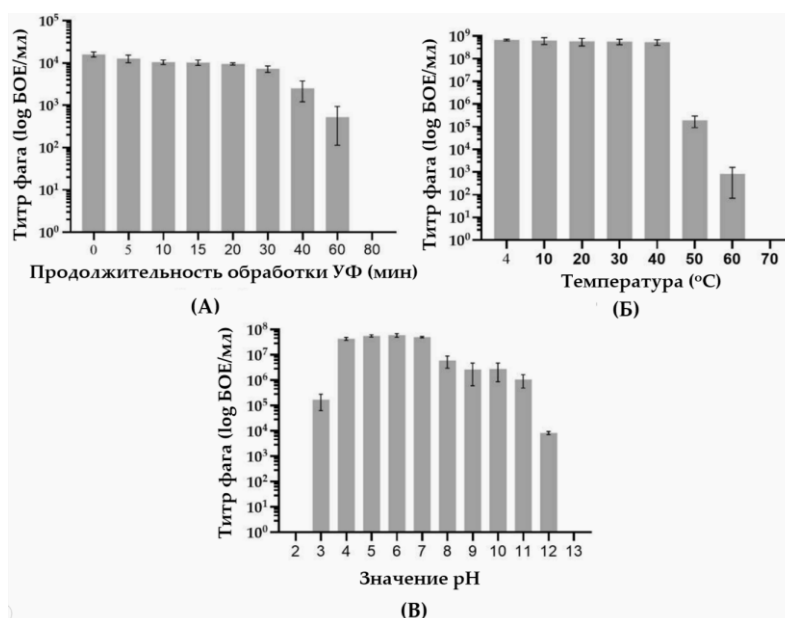


Рисунок 29. Выживаемость бактериофага *Pseudomonas* P421 при различных стрессовых факторах. Фаги обрабатывали ультрафиолетовым облучением от 5 до 80 мин (А), при температуре от 4 до 70°C в течение 1 ч (Б) и при рН от 2 до 13 в течение 1 ч (В)

Полное разрушение ультрафиолетом произошло в течение ~ 80 мин. Оценивали выживаемость фагов при температурах от 4 до 70°C. Жизнеспособность фага P421 значительно снижалась при температурах выше 40°C (рис. 29Б). В частности, суспензия фага с концентрацией 10^7 БОЕ/мл теряла 90% жизнеспособных частиц при 50°C в течение 1 часа.

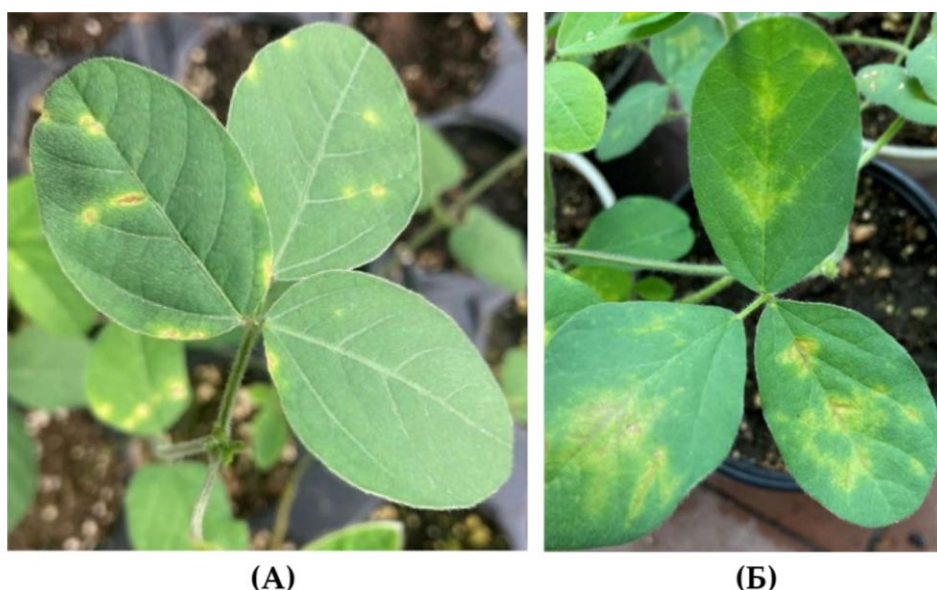


Рисунок 30. Симптомы бактериального ожога на листьях сои сорта Касатка через 35 дней после посева инокулированных семян с (А) / без (Б) обработки фагом

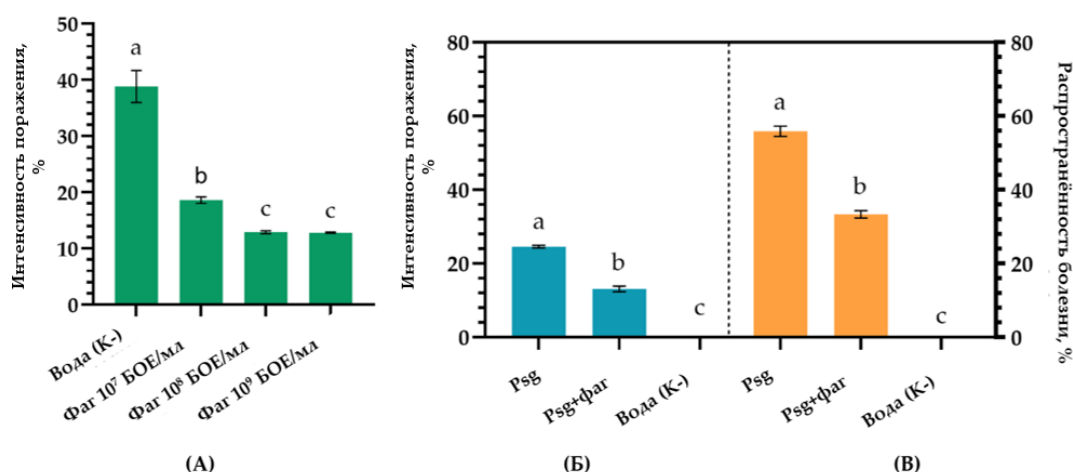


Рисунок 31. Интенсивность поражения и распространённость бактериального ожога сои, вызванного искусственной инокуляцией Psg, при обработке и без обработки фагом P421. (А): интенсивность поражения болезнью на инокулированных вегетирующих растениях; (Б): интенсивность поражения болезнью после инокуляции семян сои; (В): распространённость болезни после инокуляции семян сои

Оптимальная температура длительного хранения для фагов составила около 4°C. Фаг был стабилен в SM буфере при pH от 4 до 7 при 23°C в течение 1 ч (рис. 29B), но быстро терял жизнеспособность при pH 1-2 и pH 12-14.

Эффективность применения фага в борьбе с бактериальным ожогом на сое оценивали на заражённых семенах и вегетирующих растениях. Заражённые Psg листья сои обрабатывали фагом P421 в трех повторностях. Интенсивность поражения листьев измеряли с помощью программы LeafDoctor (Pethybridge et al., 2015) через 12 дней после обработки фагом ранее инфицированных растений. В результате обработки интенсивность поражения болезнью была ниже в два раза по сравнению с контролем, обработанным эквивалентным количеством воды (рис. 30). Наибольшая эффективность наблюдалась при концентрации фага 10^9 БОЕ/мл (52,0%), а интенсивность поражения снижалась почти в равной степени после обработки концентрациями фага 10^8 БОЕ/мл (37,6%) и 10^7 БОЕ/мл (34,3%).

Обработка заражённых Psg семян сои фагом P421 показала значительное снижение распространённости болезни на проростках. В контрольном варианте (при обработке водой) наблюдали быстрый рост интенсивности поражения болезнью (рис. 31). Из-за ежедневного полива растений дождеванием наблюдалось вторичное распространение инфекции аналогично вспышке болезни в полевых условиях. Биологическая эффективность обработки фагом составила 59,7% (по распространённости заболевания) или 55,0% (по интенсивности поражения заболеванием) в сравнении с контролем.

3.8. Использование фагов в защите сои от ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания

Выделение фагов Cff проводили с использованием штаммов C086-C091 (табл. 15) в качестве компонентов обогащающей культуры для выделения фага. В общей сложности было предпринято 22 попытки выделения фагов с использованием образцов почвы с полей Белгородской, Курской, Московской, Саратовской и Пензенской областей и Республики Карелия, речной воды из Курганской области, республик Татарстан и Башкортостан, сточных вод из Московской области и заражённого семенного материала. Фаги, инфицирующие штаммы Cff ($n = 10$),

были обнаружены только в образцах почвы. Основываясь на внешнем виде бляшек, морфологии частиц, выявленной с помощью электронной микроскопии, и диапазоне хозяев, выделенные фаги были почти идентичны. Поэтому для дальнейшего детального изучения был использован фаг под названием Аука, выделенный с поля близ села Средняя Елюзань Пензенской области (географические координаты места отбора проб 52°59'40" северной широты и 45°56'44" восточной долготы).

Таблица 15. Спектр литической активности фага Аука в отношении штаммов Cff и родственных штаммов

№	Номер штамма	Альтернативное (рабочее) название	Чувствительность к фагу Аука	№	Номер штамма	Альтернативное (рабочее) название	Чувствительность к фагу Аука
1	C001	VKM Ac-1923	+	23	C115	411DL	-
2	C034	SF20	-	24	C116	575DL	-
3	C035	SF21	-	25	C117	571DL	-
4	C036	SF22	-	26	C118	332DL	-
5	C037	SF23	-	27	C119	53223	-
6	C038	SF24	-	28	C120	53217	-
7	C039	SF25	-	29	C121	53256	-
8	C040	SF26	-	30	C122	144DL	-
9	C043	Curt3	-	31	C123	570DL	-
10	C086	F125-1	+	32	C129	53150	-
11	C087	F125-2	+	33	C130	400DL	+
12	C088	F125-3	+	34	C133	53258 = VKM Ac- 2884	-
13	C089	F30-1	+	35	C137	362	-
14	C090	F30-2	+	36	C138	429	-
15	C091	F30-3	+	37	C139	507	-
16	C106	52862 = VKM Ac-2861	-	38	C142	44	-
17	C108	414DL	-	39	C144	19	-
18	C109	557DL	-	40	<i>Brad yrhiz obiu m japon icum</i>	Semia 5080	-
19	C110	412DL	-	41		Semia 5079	-
20	C112	329DL	-	42		532 C	-
21	C113	415DL	-	43		MC09	-
22	C114	367DL	-				

Характеристику биологических свойств фага *Curtobacterium* Аука проводили путём оценки морфологии вирусных частиц, специфичности в отношении штаммов, продуцирования и стабильности фага и его генетической оценки.

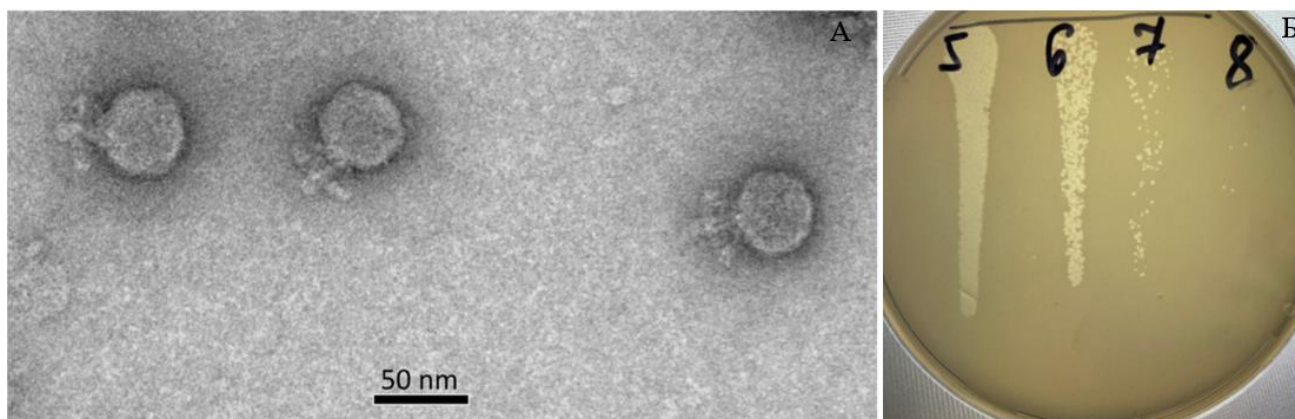


Рисунок 32. А: изображение фага *Curtobacterium* Аука при электронной микроскопии. Шкала масштаба равна 50 нм. Б: бляшки фага Аука на 0,7% верхнем агаре YD со штаммом бактерии-хозяина C089. Цифры 5, 6, 7 и 8 обозначают номера десятикратных разведений фаговой суспензии в SM буфере

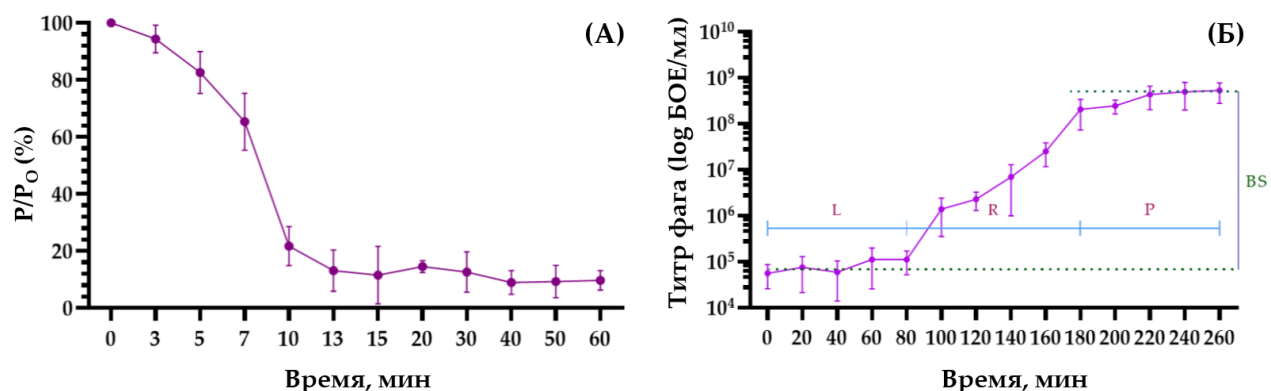


Рисунок 33. Кривая адсорбции (А) и кривая одностадийного роста (Б) бактериофага Аука. *C. flaccumfaciens* рv. *flaccumfaciens* C089 использовали в качестве бактерии-хозяина. Ось ординат показывает отношение текущего титра в каждый момент времени (P) к исходному (P₀), умноженному на 100%. L – латентная фаза; R – фаза высвобождения вириона; P – фаза плато; BS - размер вспышки титра

Анализ результатов просвечивающей электронной микроскопии (рис. 32А) показал, что вирионы фага Аука имеют подовирусную морфологию с изометрическим капсидом диаметром ~ 48 нм. Длина короткого хвоста составляла около 23 нм. Хвост окружён отростками длиной ~ 14 нм. Поэтому универсальная номенклатура, учитывающая морфологию фага (Kropinski et al., 2009), предлагала

название vB_CffP_Aука. Фаг образовывал маленькие бляшки ($\varnothing 1-2$ мм) с гладкими границами (рис. 32Б) на газоне бактерии-хозяина C089, выращенной на 0,7%-ном верхнем агаре YD.

Фаг Аука адсорбировался на клетках штамма-хозяина C089 Cff почти полностью (87%) за 13 мин (рис. 33А) при 26°C и лизировал бактерии за 80 мин, образуя 102 ± 4 частицы потомства на инфицированную бактериальную клетку (рис. 33Б). Ультрафиолетовое (280-315 нм) облучение снижало жизнеспособность фага пропорционально периоду обработки (рис. 34А). Полное уничтожение вирионов ультрафиолетом произошло в течение 5 ч. Оценивали выживаемость фага при температурах от 4 до 70°C. Жизнеспособность фага Аука значительно снижалась при температурах выше 60°C (рис. 34Б).

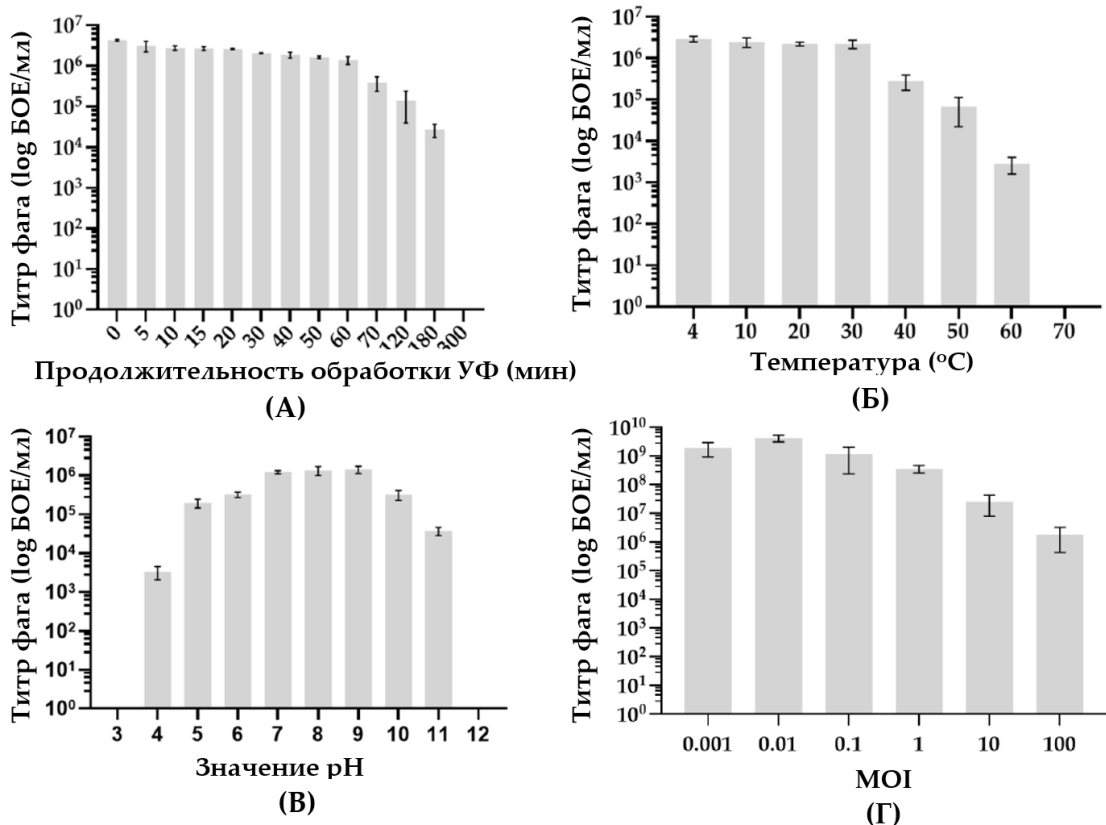


Рисунок 34. Выживаемость бактериофага *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* Аука при различных стрессовых факторах и оптимальная множественность заражения (MOI). Частицы фага обрабатывали УФ-облучением от 5 до 300 мин (А), температурой от 4 до 70°C в течение 1 ч (Б) и pH от 3 до 12 в течение 1 ч (B). Сравнение титра фагов после инкубации в течение 6 ч при пяти соотношениях MOI (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 и 100 БОЕ/КОЕ) в среде YD (Г)

В частности, суспензия фага с концентрацией 10^7 БОЕ/мл теряла 50% жизнеспособности при 60°C в течение 1 часа. Оптимальная температура для длительного хранения фагов составила около 4°C . Фаг был стабилен в SM-буфере с pH 5-10 при 26°C в течение 1 ч (рис. 34В), но быстро терял жизнеспособность при pH 3-4 и pH 11-12. На рис. 34Г показано, что оптимальный MOI фага Аука составил 0,01.

Диапазон хозяев фага Аука оказался сравнительно узок. Из 39 протестированных штаммов *Curtobacterium* sp. фаг был активен только против восьми (табл. 15). Примечательно, что фаг лизировал все шесть штаммов, выделенных в 2021 году из сортов сои (C086–C091), хотя образцы для выделения бактерий были доставлены из географически отдалённых регионов. Кроме того, фаг лизировал ещё два коллекционных штамма, а именно VKM Ac-2055 (C017) и 400DL (C130).

Все чувствительные штаммы бактерий давали положительный сигнал в ПЦР-тесте (Tegli et al., 2002), но несколько штаммов, которые также были положительны по этому критерию, включая типовой штамм Cff (C001), были устойчивы к фагу Аука. Это говорит о том, что данный фаг специфичен для некоторых групп штаммов патогена. Фаг оказался авирулентным ко всем протестированным штаммам, не относящимся к *Curtobacterium*, включая *Bradyrhizobium japonicum*, применяющимся для обработки семян сои. Таким образом, фаг Аука можно считать безопасным для азотфиксирующих бактерий, применяемым для инокуляции семян сои.

Согласно геномному анализу, фаг *Curtobacterium* Аука (регистрационный номер GenBank ON381767) представляет собой двухцепочечный ДНК-вирус. Филогенетическая характеристика фага показала, что он является представителем нового вирусного семейства или подсемейства, наиболее близкого к «φ29-подобным фагам» семейства *Salasmaviridae*. Предлагалось создание нового подсемейства фагов, содержащего роды *Anjalivirus*, новый род “*Aukavirus*” (названного по наименованию анализируемого фага), *Badaztecivirus* и *Dybvigivirus* (Евсеев, 2023).

Оценка эффективности применения фага Аука в борьбе с ржаво-бурой бактериальной пятнистостью и увяданием сои была проведена на инокулированных патогеном семенах и вегетирующих растениях.

Оценку эффективности применения фага на вегетирующих растениях проводили на заражённых Cff листьях путём обработки суспензией фага Аука в трёх повторностях. Интенсивность поражения болезнью оценивали с помощью программного обеспечения LeafDoctor через 12 дней после нанесения фага на ранее заражённые растения. Удалось визуально обнаружить разницу в степени поражения листьев сои. В частности, при обработке фагом Аука площадь поражения листьев была меньше (рис. 35Б) в сравнении с положительным контролем, обработанным водой (рис. 35В). На листьях без бактерий симптомы не проявлялись (рис. 35А).

В результате применения фага распространённость болезни снизилась на 32 и 41% (при применении через 1 ч после заражения и одновременно с заражением, соответственно) в сравнении с положительным контролем (рис. 36А). Инокуляция листьев аэрографом позволила добиться типичных симптомов Cff, проявившихся в возникновении хлороза и некроза листьев через 12 дней после обработки. Видимых механических повреждений от воздействия аэрографа не наблюдали. Стоит отметить, что наименьшая площадь поражения на поверхности листьев наблюдалась после применения препарата Косайд 2000 (3,14% от площади листа), в то время как применение фага привело к поражению 8,2 и 7,2% площади листа, соответственно. Применение фага после заражения имело меньший эффект в сравнении с одновременным применением бактерий и фага. Это можно объяснить развитием патогена в межклеточном пространстве, куда фаг не смог легко проникнуть. Поэтому, эффективная доставка фага требует в дальнейшем разработки препаративной формы, способной достигнуть фитопатогенных бактерий в поражённых тканях листа.

Оценка эффективности применения фага Аука на семенах, заражённых путём повреждения и инокуляции семян в вакууме в присутствии суспензии бактерии.

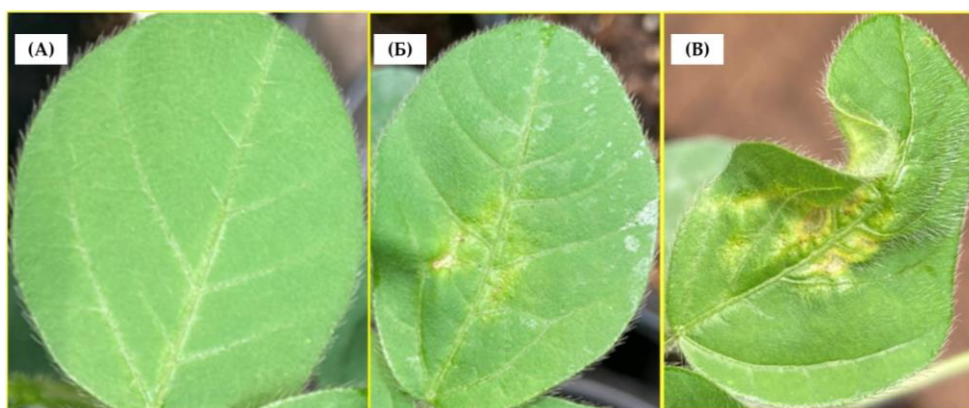


Рисунок 35. Симптомы Cff на листьях сои через 12 дней после заражения листьев аэрографом. (А) контроль без инокуляции (инфекция Cff); (Б) обработка фагом Аука; (В) положительный контроль (обработка заражённых листьев водой). Представлены типичные листья из вариантов

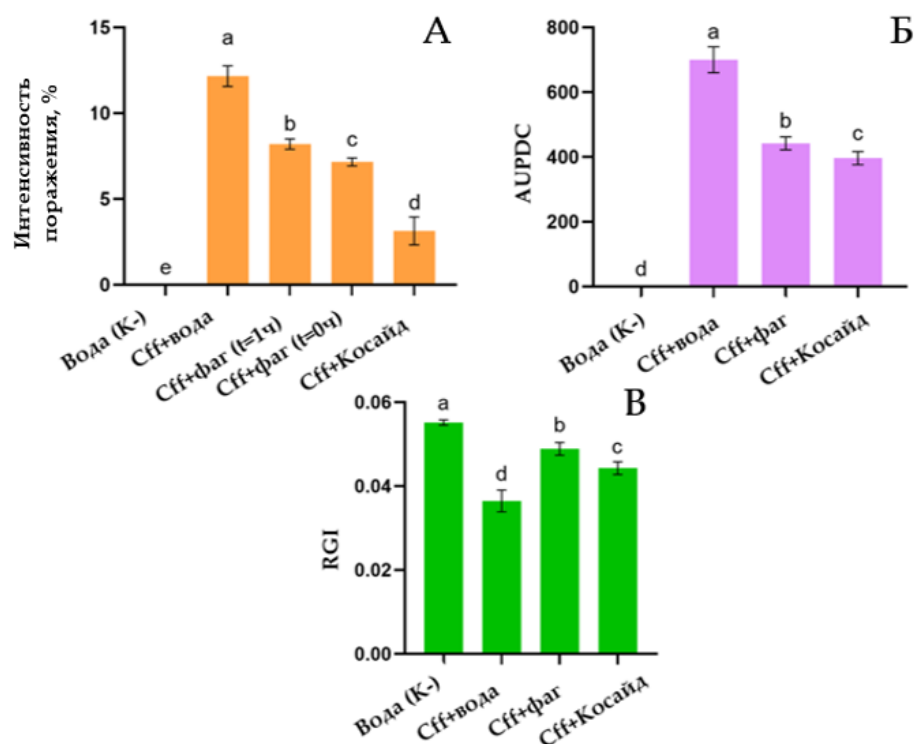


Рисунок 36. Влияние фага Аука и фунгицида Косайд 2000, ВДГ на интенсивность поражения листовой поверхности (А), площадь под кривой развития болезни (AUPDC) увядания (Б) и индекс относительного роста (RGI) (В) сои

Данный метод позволил получить симптомы типичные для Cff, проявившиеся в виде увядания и торможения роста проростков сои. Обработка семян сои, ранее заражённых Cff, фагом Аука продемонстрировала значительное снижение зараженности и интенсивности поражения проростков. Обработка водой в контрольном варианте привела к быстрому появлению симптомов со средним

значением AUPDC (площади под кривой прогрессирования заболевания) до 700 единиц (рис. 36Б). Биологическая эффективность обработки фагом составила 36,8% в сравнении с контролем. AUPDC после применения препарата Косайд был ниже, чем при обработке фагом (в среднем - 396 единиц для Косайда и 442 единицы для фага Аука).

Учитывая, что патоген продуцирует фитотоксичные гликопептиды (Schuster 1967), положительный контроль показал снижение RGI (индекса относительного роста), в то время как варианты с применением фага и обработки препаратом Косайд показали более высокие значения данного показателя (рис. 36В). Снижение RGI в случае обработки препаратом Косайд 2000 можно объяснить фитотоксическим действием гидроксида меди на проростки (Engelhardt et al., 2020). Этот бактерицид на основе меди оказывал большее воздействие на патоген, но снижал показатель относительного роста сои (Tarakanov et al., 2022b).

Таким образом, нами выделен и охарактеризован литический фаг Аука, инфицирующий штаммы возбудителя бактериальной пятнистости и увядания сои *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Было показано, что бактериофаг перспективен в качестве агента для борьбы с Cff на заражённых семенах и листьях сои.

3.9. Использование веществ растительного происхождения в защите сои от бактериальных болезней

Поиск новых экологически безопасных методов защиты растений от болезней является одним из пунктов Приоритетных направлений Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации (СНТР). В этом плане перспективным является использование т.н. веществ растительного происхождения, а именно эфирных масел и экстрактов, получаемых из растений. Они являются природоподобными и биodeградируемыми соединениями, проявляющими широкую биологическую активность, в том числе по отношению к фитопатогенным грибам, вирусам и бактериям. На данный момент недостаточно информации о действии эфирных масел и растительных экстрактов в отношении возбудителей бактериальных болезней сои. В связи с этим в рамках данного раздела

проводили скрининг *in vitro* активности эфирных масел и растительных экстрактов в отношении двух бактериальных патогенов сои и оценку эффективности применения этих веществ на искусственном инфекционном фоне на растениях.

Анализ результатов оценки антибактериальной активности эфирных масел in vitro показал, что чувствительность патогенов к веществам сильно варьировала и зависела от вида патогена и растения-источника (табл. 16). Значения диаметров зон подавления роста бактерий варьировали от 1,3 мм (масло мяты перечной в отношении Psg) до 9,3 мм (ЭМКК в отношении Psg). ЭМКК и ЭМ гвоздичного дерева показали самые высокие значения зон ингибирования (9,7 и 9,3 мм соответственно) для Psg. ЭМДО и ЭМ тимьяна обыкновенного демонстрировали самые высокие показатели зон ингибирования в отношении Cff. Было обнаружено, что только ЭМ руты душистой и пижмы обыкновенной не проявляли активности ни к одному штамму бактерий. В общей сложности 15 ЭМ (78,9%) проявляли антибактериальную активность в отношении Psg и 9 (47,4%) – в отношении Cff. Только 7 ЭМ (36,8%) были активны в отношении обоих видов патогенов.

Чувствительность бактерий к растительным экстрактам зависела от вида бактерии и растения-источника (табл. 16). Зоны ингибирования роста бактерий варьировали от 1,3 мм (экстракт козлятника лекарственного в отношении Psg) до 6,3 мм (ЭЭБТ в отношении Cff). Как в отношении Psg, так и Cff, ЭЭБТ показал самые высокие значения диаметров зон ингибирования среди РЭ (5,3 и 6,3 мм, соответственно). Биологическая активность проявлялась в отношении одного вида бактерий у РЭ бархата амурского, бадана толстолистного, перца стручкового, козлятника лекарственного, чистотела большого, шелковицы чёрной, спиреи иволистной, аира обыкновенного, Melissa лекарственной и бузины чёрной.

Шесть экстрактов продемонстрировали антибактериальную активность при анализе методом диффузии в агар (в общей сложности 15,8% из 38 экстрактов) в отношении Psg и 8 экстрактов — в отношении Cff (21,05%). В целом, среди протестированных растений, этанольные экстракты оказывали большее антибактериальное действие чем водные.

Таблица 16. Антибактериальная активность эфирных масел, растительных экстрактов, антибиотиков и эталонного фунгицида в отношении штаммов *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* и *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

ЭМ/РЭ/ гентамиин/ тирам	Штамм	Диаметр зоны ингибирования роста бактерии на среде Кинга Б (среднее±стандартное отклонение), мм					
		штаммы Psg			штаммы Cff		
		CFBP 2214	G2	G17	CFBP 3418	C086	C089
гентамицин		22,7±0,5 ^e	21,7±0,5 ^e	22,7±0,5 ^e	20,7±0,5 ^e	20,7±0,5 ^e	20,3±0,5 ^e
тирам		4,3±0,5 ^c	4,3±0,5 ^c	4,3±0,5 ^c	6,3±0,5 ^d	6,3±0,5 ^d	6,3±0,5 ^d
Эфирные масла							
Коричник китайский		9,7±0,5 ^d	9,0±0 ^d	9,7±0,5 ^d	2,0±0 ^b	2,3±0,5 ^b	2,0±0 ^b
Тимьян обыкновенный		2,7±0,5 ^b	2,7±0,5 ^b	2,7±0,5 ^b	5,7±0,5 ^c	5,7±0,5 ^c	5,7±0,5 ^c
Душица обыкновенная		2,0±0,8 ^b	2,0±0,8 ^b	2,0±0,8 ^b	8,3±0,5 ^c _d	8,3±0,5 ^c _d	8,0±0 ^{cd}
Мята перечная		1,3±0,5 ^b	1,3±0,5 ^b	1,3±0,5 ^b	4,7±0,5 ^b	4,0±0,8 ^b	4,7±0,5 ^b
Чеснок посевной		0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	3,7±0,5 ^c	3,7±0,5 ^c	3,7±0,5 ^c
Аир обыкновенный		5,7±0,5 ^c	6,0±0 ^c	5,7±0,5 ^c	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
Мята длиннолистная		2,7±0,5 ^b	2,7±0,5 ^b	2,7±0,5 ^b	4,3±0,5 ^b	4,7±0,5 ^b	4,3±0,5 ^b
Лайм настоящий		6,0±0 ^d	6,0±0 ^d	6,0±0 ^d	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
Гвоздичное дерево		9,3±0,5 ^d	9,0±0,5 ^d	9,3±0,5 ^d	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
Кардамон настоящий		6,0±0,8 ^c	6,0±0,8 ^c	6,0±0,8 ^c	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
Мандарин красный		6,3±0,5 ^c	6,0±0 ^c	6,3±0,5 ^c	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
Анис обыкновенный		5,3±0,5 ^c	5,3±0,5 ^c	5,3±0,5 ^c	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
Лаванда узколистная		2,3±0,5 ^b	2,3±0,5 ^b	2,3±0,5 ^b	5,3±0,5 ^c	5,3±0,5 ^c	5,3±0,5 ^d
Рута душистая		0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
Пижма обыкновенная		0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
Розмарин лекарственный		3,3±0,5 ^b	3,0±0,8 ^b	2,3±0,6 ^b	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
Тысячелистник обыкновенный		3,0±0 ^b	4,0±0,8 ^b	2,7±0,6 ^b	3,3±0,5 ^b	3,0±1,0 ^b	3,0±0 ^b
Фенхель обыкновенный		5,3±0,5 ^d	5,7±0,5 ^d	6,3±0,6 ^d	0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a
Шалфей лекарственный		0±0 ^a	0±0 ^a	0±0 ^a	4,3±0,5 ^b	4,0±0 ^b	4,3±0,5 ^b
Экстракты							
Бархат амурский	Э	2,0±0 ^b	1,7±0,5 ^b	1,7±0,5 ^b	1,7±0,5 ^b	1,7±0,5 ^b	1,7±0,5 ^c

Примечание: значения в столбцах, отмеченные разными буквами, имеют существенную разницу по критерию Тьюки, $p = 0,05$. Растворители для экстрактов: Э – 96% этанол, В-вода.

Зона ингибирования при применении стандартного антибиотика гентамицина на разных штаммах Psg и Cff также варьировала. Например, среди штаммов Psg выделялся штамм G2, который был менее чувствителен к гентамицину (21,7 мм в диаметре), а среди штаммов Cff - C086 с диаметром зоны ингибирования 22,7 мм. Это может указывать на дифференциацию штаммов по чувствительности к антибиотику. В то же время тирам показал большую зону ингибирования в отношении Cff, чем к Psg ($6,3 \pm 0,5$ мм и $4,3 \pm 0,5$ мм соответственно), в то время как антибиотик гентамицин - наоборот ($Psg = 22,7 \pm 0,5 < Cff = 20,7 \pm 0,5$).

Впоследствии у всех ЭМ и РЭ, которые проявляли эффект по крайней мере по отношению к одному штамму, определяли значения МИК и МБК. Штаммы Psg G2 и Cff C086 использовали в качестве целевых штаммов. Результаты анализа роста бактерий выраженного в титре после инкубации в жидкой среде, содержащей различные концентрации ЭМ/РЭ, представлены на рис. 37. Предварительные эксперименты показали, что присутствие Твин 20 и ДМСО в жидкой среде в концентрациях, содержащихся в тестируемых ЭМ и РЭ, не влияло на рост бактерий. Только ДМСО в высоких концентрациях выше 50 000 ppm оказывал небольшое негативное влияние на рост бактерий.

Антибактериальная активность тестируемых веществ представлена в табл. 17, в которой указаны минимальные ингибирующие концентрации, вызывающие торможение роста (МИК), и минимальные бактерицидные концентрации (МБК).

Большинство протестированных эфирных масел вызывали значительное подавление роста бактерий. Наиболее активными ЭМ с наименьшими значениями МИК были ЭМКК — 200 ppm, ЭМ тимьяна обыкновенного — 800 ppm для Psg и ЭМДО — 200 ppm для Cff. Хотя значения МИК не отличались для наиболее эффективных ЭМ и тирама для Psg (200 ppm), они были ниже для Cff (тирам — 400 ppm, ЭМДО — 200 ppm). Значения МБК для этих веществ демонстрировали

аналогичную закономерность. Самые низкие значения были у ЭМКК — 280 ppm, тимьяна обыкновенного — 1440 ppm для Psg и ЭМДО — 360 ppm для Cff.

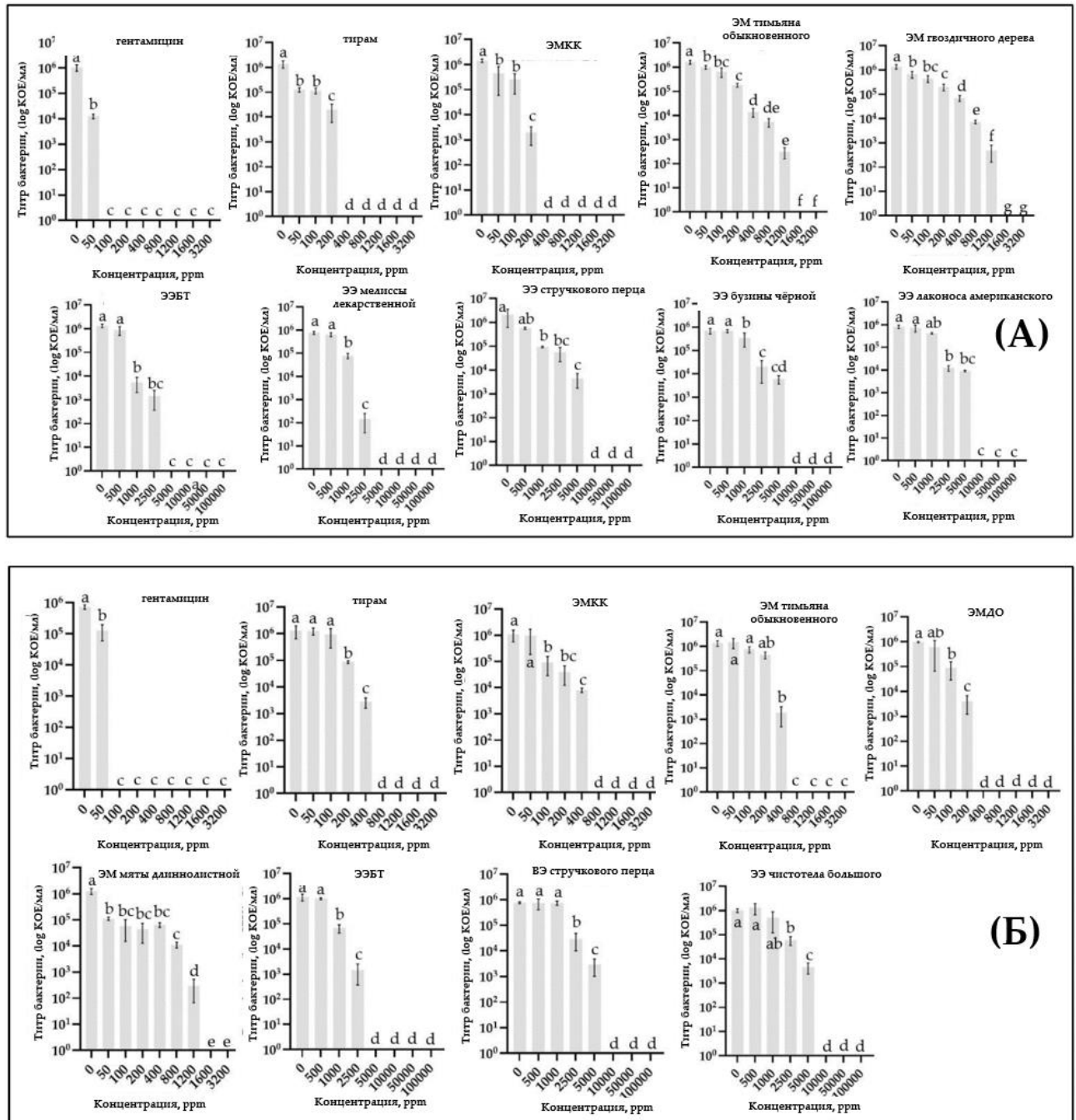


Рисунок 37. Влияние различных концентраций эфирных масел и растительных экстрактов на рост штамма *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* G2 (А) и штамма *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* C086 (Б), измеренное путём подсчёта колоний на агаровой среде после культивирования в жидкой среде.

ЭМ - эфирное масло, ЭЭ- этанольный экстракт, ВЭ – водный экстракт. На графиках показаны только варианты с МБК <1600 ppm для эфирных масел и <10000 ppm для растительных экстрактов

Таблица 17. Значения минимальных ингибирующих концентраций и минимальных бактерицидных концентраций, рассчитанные для каждой пары вещество-бактерия. ЭЭ – этанольный экстракт, ВЭ – водный экстракт

ЭМ/РЭ/ стандартный антибиотик или фунгицид	Бактерия (штамм)			
	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i> (G2)		<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfa ciens</i> (C086)	
	МИК, ppm	МБК, ppm	МИК, ppm	МБК, ppm
гентамицин	50	80	50	100
тирам	200	360	400	720
Эфирные масла				
Коричник китайский	200	280	400	560
Тимьян обыкновенный	1200	1440	400	720
Душица обыкновенная	1600	3200	200	280
Мята длиннолистная	1600	2560	1200	1520
Мята перечная	1600	3200	1600	3200
Гвоздичное дерево	1200	1600	ND	ND
Лаванда узколистная	1600	3200	1600	3200
Тысячелистник обыкновенный	1600	2880	1600	3200
Чеснок посевной	ND	ND	>3200	>3200
Аир обыкновенный	>3200	>3200	ND	ND
Лайм настоящий	>3200	>3200	ND	ND
Кардамон настоящий	>3200	>3200	ND	ND
Мандарин красный	>3200	>3200	ND	ND
Анис обыкновенный	>3200	>3200	ND	ND
Фенхель обыкновенный	>3200	>3200	ND	ND
Шалфей лекарственный	ND	ND	>3200	>3200
Экстракты				
ЭЭ Бадана толстолистного (ЭЭБТ)	1000	4000	2500	5000
ЭЭ Мелиссы лекарственной	2500	5000	ND	ND
ЭЭ Перца стручкового	5000	9000	ND	ND
ЭЭ Бузины чёрной	5000	10000	ND	ND
ЭЭ Лаконос американский	5000	10000	ND	ND
ВЭ Перца стручкового	10000	50000	5000	9000
ВЭ Козлятника лекарственного	10000	50000	10000	50000
ЭЭ Полыни горькой	10000	50000	ND	ND
ЭЭ Бархата амурского	50000	100000	50000	>100000
ЭЭ Шиповника повислового	100000	>100000	ND	ND

ЭЭ Чистотела большого	ND	ND	5000	10000
ЭЭ Шелковицы чёрной	ND	ND	50000	>100000
ВЭ Спиреи иволистной	ND	ND	100000	>100000
ЭЭ Аира обыкновенного	ND	ND	100000	>100000

Среди РЭ самые низкие значения МИК были определены для ЭЭБТ — 1000 ppm и Melissa лекарственной — 2500 ppm для Psg, а для Cff: ЭЭБТ— 2500 ppm и перца стручкового (водный) - 5000 ppm. Наиболее активными РЭ, согласно значениям МБК, были одни и те же вещества. В частности, для ЭЭБТ этот показатель составил 4000 ppm, для Melissa лекарственной — 5000 ppm, для Psg; для Cff: ЭЭБТ— 5000 ppm и ВЭ перца стручкового - 9000 ppm. Стандартный антибиотик гентамицин показал самые низкие значения МИК и МБК для обеих бактерий по сравнению с другими препаратами (МБК = 80 ppm для Psg и 100 ppm для Cff). Таким образом, хотя РЭ и проявляли антибактериальную активность в отношении исследуемых бактерий, эти концентрации были намного выше, чем у ЭМ, гентамицина и тирама (~ в 3-15, 20-50 и 5-10 раз соответственно).

Фитотоксичность эфирных масел и растительных экстрактов определяли путём обработки семян и вегетирующих растений сои растворами веществ с разными концентрациями.

Для определения оптимальных концентраций ЭМ и РЭ для обработки растений сои в тестах на фитотоксичность были отобраны 2 ЭМ (ЭМКК для Psg и ЭМДО для Cff) и 1 РЭ (ЭЭБТ для обеих бактерий), которые показывали самые низкие значения МБК. Предварительное исследование показало, что поверхностно-активные вещества Твин 20 и ДМСО, используемые для растворения ЭМ и РЭ, были фитотоксичными только при повышенных концентрациях. Твин 20 не влиял на всхожесть семян, но вызывал ожоги во время обработки листьев только при концентрации выше 10% в рабочем растворе, а ДМСО снижал всхожесть семян при концентрации 50% и вызывал ожоги при концентрации 20% (Tarakanov et al., 2022c). Влияние градации концентраций ЭМ и РЭ на всхожесть семян и длину корней проростков сои представлено на рис. 38.

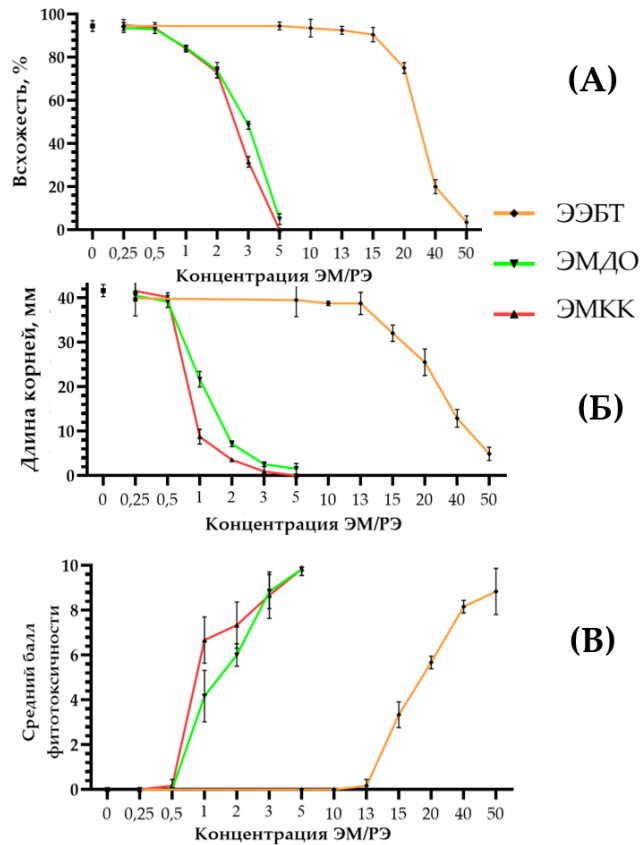


Рисунок 38. Фитотоксичность этанольного экстракта бадана толстолистного (ЭЭБТ), эфирного масла душицы обыкновенной (ЭМДО) и эфирного масла китайской корицы (ЭМКК) на семенах и листьях сои. Значения всхожести (А) и длины корней (Б) проростков сои, обработанных различными концентрациями ЭМ и ЭЭБТ, на 8 день. Средний балл интегрального значения фитотоксичности ЭМ и ЭЭБТ на листьях сои рассчитывали через 72 часа после обработки (В)

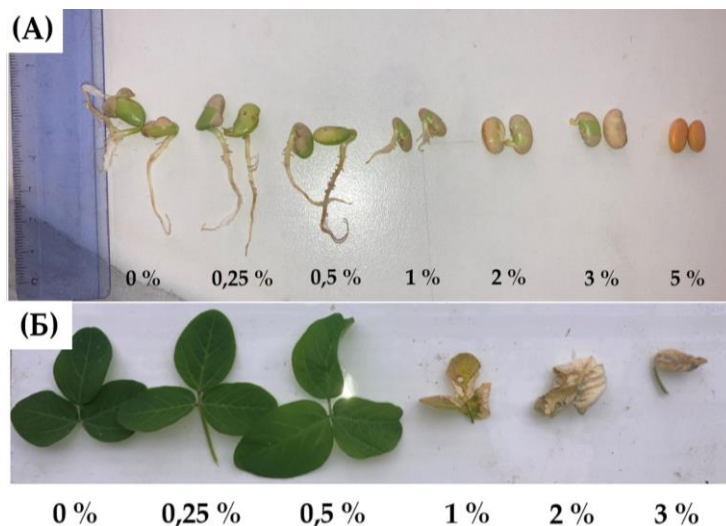


Рисунок 39. Фитотоксичность в отношении проростков сои при замачивании семян в водном растворе (А) и обработке листьев сои (Б) различными концентрациями ЭМ коричника китайского. Показаны по 2 типичных проростка (через 8 дней после обработки) и 1 тройчатый лист (на 7 день после обработки) каждого варианта

Сравнивая средние значения всхожести и длины корней при различных концентрациях с контролем, обработанным водой, мы оценивали фитотоксичность (рис. 39).

У обоих ЭМ порог фитотоксичной концентрации в семенах был выше 0,5%. Хотя при такой концентрации и наблюдается небольшое снижение всхожести и длины корней для некоторых соединений, эти значения не являются статистически значимыми и не отличаются от контроля, обработанного водой. В случае с ЭЭБТ наблюдалась несколько иная ситуация: фитотоксические концентрации начинались со значений выше 13%. Например, при прорастании статистически значимое снижение происходило только при концентрации вещества в рабочем растворе 20% (рис. 38А). Влияние того же экстракта на длину корней проростков сои показало, что порог фитотоксичности начинался с 15% (рис. 38Б).

Фитотоксичность в отношении листьев сои проверяли путём опрыскивания растворами с различными концентрациями ЭМ и РЭ. Во всех случаях наблюдали дозозависимый рост фитотоксичности с увеличением концентрации д.в. в растворе. Для обоих ЭМ безопасный порог фитотоксичности по аналогии с семенами составлял 0,5% (рис. 39В). Только при использовании ЭМКК на отдельных растениях наблюдали признаки небольшой потери тургора в некоторых листьях, которые исчезали через 5-6 дней. Для ЭЭБТ максимальная концентрация рабочего раствора, при которой симптомы фитотоксичности не были заметны, также составила 13% (рис. 39).

Оценку эффективности применения эфирных масел и растительных экстрактов в борьбе с Psg и Cff проводили путём обработки предварительно заражённых семян и вегетирующих растений сои.

Листья сои, заражённые Psg и Cff, обрабатывали ЭМ и РЭ в трех повторностях. Интенсивность поражения листьев измеряли с помощью программы Leaf Doctor через 12 дней после обработки ранее инфицированных растений (рис. 40).

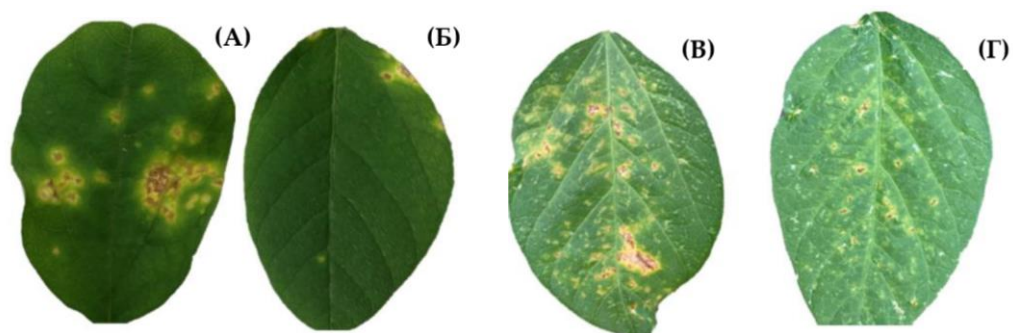


Рисунок 40. Симптомы бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости на листьях сои через 12 дней после инокуляции аэрографом. (А) – положительный контроль (обработка инфицированных Psg листьев водой); (Б) – обработка ЭМКК (заражение Psg); (В) положительный контроль (обработка заражённых Cff листьев водой); (Г) обработка ЭМДО (заражение Cff). Представлены типичные листья из вариантов

В эксперименте с Psg интенсивность поражения болезнью была ниже на 60,5-80,6% по сравнению с контролем, обработанным водой (рис. 41А). Наибольшая эффективность наблюдалась при обработке ЭМКК (80,6%); обработка ЭЭБТ уступала (60,5%) как обработке ЭМКК, так и стандартному препарату Косайд 2000 (эффективность 69,05%). В контрольном варианте эксперимента с Cff средняя площадь зоны поражения листьев, хотя и уступала Psg, была на высоком уровне (9,5% и 20,15%, соответственно). Интенсивность поражения болезнью на обработанных растениях была снижена на 47,0–77,5% по сравнению с контролем (рис. 41Б). Наибольшую эффективность наблюдали при обработке ЭМДО (77,5%), а ЭЭБТ и Косайд 2000 показали примерно одинаковую эффективность (48,8 и 47,0%, соответственно).

Обработка семян сои, искусственно заражённых Psg, в опытных вариантах показала значительное снижение распространенности и интенсивности поражения болезнью проростков. В контрольном варианте (с использованием воды) наблюдали быстрый рост интенсивности поражения (рис. 41В). Из-за ежедневного полива растений дождеванием наблюдалась вторичная инфекция со степенью интенсивности поражения, аналогичной вспышке в полевых условиях. Биологическая эффективность обработки ЭМКК составила 77,4% (распространённость болезни) или 86,9% (интенсивность поражения болезнью) в сравнении с контролем, в то время как обработка ЭЭБТ снижала интенсивность

поражения и распространённость болезни более чем в 2 раза, но уступала обработке ЭМКК. Обработка ТМТД значительно снизила как интенсивность поражения (эффективность 88,7%), так и распространённость (эффективность 92,8%) болезни.

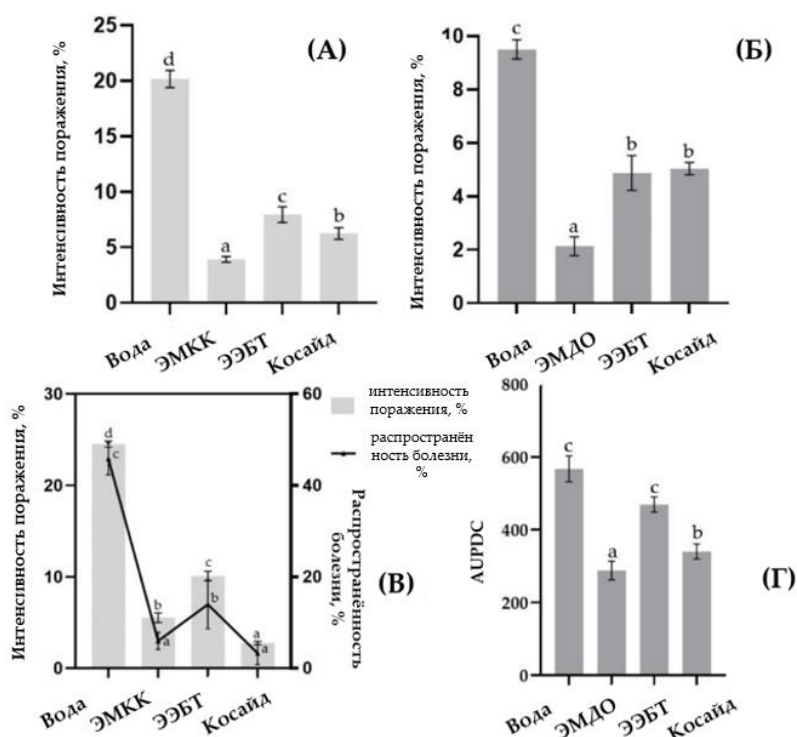


Рисунок 41. Бактериальный ожог (А, В) и бактериальная пятнистость и увядание (Б, Г) сои, вызванные искусственной инокуляцией Psg и Cff при обработке ЭМ и РЭ. (А): интенсивность поражения (% площади поражённых листьев) на вегетирующих растениях, инокулированных Psg или (Б) Cff; (В): интенсивность поражения (% площади поражённых листьев) (левая вертикальная шкала, столбцы) и распространённость болезни, % (правая вертикальная шкала, линия), после инокуляция семян сои Psg; (Г): значения AUPDC после инокуляции семян сои Cff

В контрольном варианте с заражением семян Cff наблюдались симптомы увядания и пожелтения листьев сои со средним значением AUPDC = 633 единицы (рис. 41Г). В целом, эффективность обработок ЭМ и РЭ была ниже, чем в эксперименте с Psg. Так, биологическая эффективность обработки ЭМДО составила 54,6% по сравнению с контролем, в то время как обработка ЭЭБТ снизила AUPDC всего на 25,9%. Обработка семян ТМТД также не показала высокого биологического эффекта; эффективность составила 46,3%.

Идентификация химического состава эфирных масел и растительного экстракта методами ГХ-МС и ГХ-ПВД показала, что ЭМКК, ЭМДО и ЭЭБТ

содержали суммарно 58 соединений (прил. Ж). Двадцать два соединения были идентифицированы из ЭЭБТ, 18 - из ЭМКК и 24 - из ЭМДО, что составляет 90,63%, 99,68% и 99,49% идентифицированных соединений, соответственно, для каждого ЭМ/РЭ. В ЭЭБТ наиболее распространёнными соединениями были уксусная кислота (27,85%), 5-метил-3-метилендигидро-2 (3Н)-фуранон (20,32%) и эвгенол (10,94%) (прил. 3). Наиболее распространёнными соединениями в ЭМКК были коричный альдегид (84,25%), диметилацеталь коричневого альдегида (3,36%) и о-метоксициновый альдегид (6,91%) (прил. Ж), а ЭМДО содержал карвакрол (62,32%), цимен (19,85%) и тимол (3,52%) (прил. Ж). Выход экстракта из бадана толстолистного составил 4,22%, а ЭМДО - 1,69% от воздушно-сухой массы растений.

Таким образом, результаты исследования показали, что из 19 эфирных масел и 19 растительных экстрактов высокую антибактериальную активность в отношении Psg проявили эфирные масла коричника китайского, в отношении Cff - душицы обыкновенной и этанольный экстракт бадана толстолистного (в отношении обоих видов бактерий). Эксперимент на растениях по искусственному заражению двумя возбудителями бактериальных болезней показал, что эти вещества в нефитотоксичных концентрациях способны снижать вредоносность Psg и Cff при обработке как инфицированных семян, так и листьев. Эти результаты позволяют предположить, что эфирные масла и растительные экстракты потенциально могут быть использованы в качестве альтернативы традиционным химическим фунгицидам и антибиотикам в борьбе с бактериальным ожогом и бактериальной пятнистостью и увяданием сои. Однако, прежде чем начать применение представленных ЭМ и РЭ в качестве веществ растительного происхождения для борьбы с фитопатогенными бактериями, необходимо оценить потенциальные побочные эффекты на нецелевые организмы, подобрать эффективную и стабильную препаративную форму и провести полевые регистрационные испытания.

3.10. Использование обогащенных медью наночастиц хитозана для борьбы с бактериальными болезнями сои

Применение наночастиц хитозана для борьбы с патогенами человека, животных и растений стало тенденцией последних лет. Наночастицы хитозана действуют как стимуляторы роста растений и противомикробные агенты в отношении фитопатогенных микроорганизмов (Kong et al., 2010). Информация об антибактериальной активности обогащённых медью наночастиц хитозана и немодифицированного хитозана против Psg скудна. В статье (Bugalia et al., 2017) было показано, что Cu-хитозановые наночастицы обладают высокой антибактериальной активностью в отношении Psg в условиях *in vitro* при концентрациях 400 ppm и 1000 ppm соответственно. Информация об эффективности хитозана и наночастиц хитозана с Cu^{2+} в отношении Cff отсутствует. В рамках данного раздела проводили определение антибактериальной активности гидролизата хитозана и наночастиц хитозана с медью в отношении Psg и Cff и определение их эффективности при обработке семян и вегетирующих растений сои, искусственно заражённых возбудителями бактериозов.

Получение гидролизата хитозана с основной фракцией (ММ 39 кДа, СД 90%, индекс полидисперсности - 2,4) проводили с использованием высокомолекулярного хитозана (ММ 1040 кДа, DD 85%) кислотным гидролизом в присутствии азотной кислоты.

Получение наночастиц хитозана проводили с использованием основной фракции ГХ (ММ 39 кДа), которую фракционировали с учетом растворимости, диализовали против дистиллированной воды и лиофилизировали. Наночастицы были получены методом ионотропного гелеобразования в кислых условиях (рН 4,0). Образование НЧХ произошло из-за взаимодействия положительно заряженных аминогрупп хитозана с ТПФ, который имеет фосфатные группы с отрицательным зарядом. В отличие от оригинальной методики (Qi et al., 2004) использовали низкомолекулярный хитозан; так можно было использовать более концентрированный раствор хитозана с более крупными образовавшимися частицами.

В нашей работе образцы НЧХ и ГХ имели одинаковую концентрацию хитозана 5 мг/мл. Размеры НЧХ cf и Cu^{2+} НЧХ cf составляли 30-60 нм. Мы предположили, что при расширении масштабов технологии образования наночастиц для сельскохозяйственного использования нецелесообразно выделять фракцию наночастиц из реакционной смеси. Поэтому тесты биологической эффективности проводились с использованием неочищенных препаратов на основе наночастиц, которые представляли собой смесь наночастиц и несвязанного полимера/ Cu^{2+} , но для краткости мы продолжали использовать сокращения НЧХ или Cu^{2+} НЧХ для образцов, содержащих наночастицы.

Первичную антибактериальную активность образцов хитозана тестировали методом диффузии в агар в отношении трех штаммов Psg и трех штаммов Cff (Tarakanov et al., 2021). Показано, что патогены обладали различной чувствительностью к хитозану, которая зависела от штамма, типа образца и дозы (рис. 42). Анализируемые вещества проявляли более сильное антибактериальное действие в отношении штаммов Psg, а штаммы Cff были менее восприимчивыми. Cu^{2+} НЧХ были наиболее эффективными при всех проанализированных концентрациях; диаметр зоны ингибирования 100% суспензии Cu^{2+} НЧХ (5 мг/мл хитозана и 0,83 мг/мл меди) составлял 27 мм для Psg и около 15 мм для Cff (рис. 43). Хотя ГХ и CuSO_4 не проявляли сильной антибактериальной активности (рис. 43), средний диаметр зоны ингибирования Cu^{2+} ГХ (комбинация ГХ и CuSO_4) на штаммах Psg составлял около 5 мм.

Низкая эффективность раствора CuSO_4 может быть объяснена его низкой концентрацией. Низкая концентрация CuSO_4 , использованная в опыте обусловлена необходимостью выравнивания вариантов опыта по количеству действующих веществ. Мы предполагаем, что низкий эффект ГХ обусловлен трудностью диффузии полимерных молекул хитозана в питательной среде при нейтральном pH, аналогичные данные представлены в статье (Konovalova et al., 2019). Наиболее вероятно, что добавление сульфата меди к ГХ привело к образованию более компактных комплексов хитозана с медью, что увеличило диффузию в агар. Для Cu^{2+} ГХ, НЧХ и Cu^{2+} НЧХ наблюдалась дозозависимая динамика увеличения зоны

подавления роста бактерий. У других исследователей наночастицы меди на основе хитозана, полученные методом химического восстановления, эффективно ингибировали рост *X. axonopodis* pv. *punicae* в концентрации 1000 ppm (Chidanandappa et al., 2020), что согласуется с нашими данными (Tarakanov et al., 2023b).

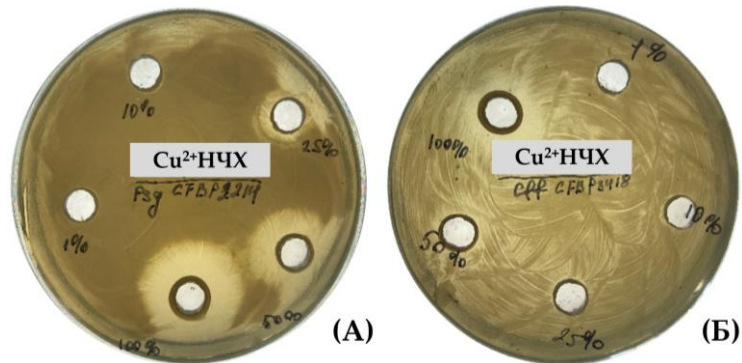


Рисунок 42. Первичное тестирование антибактериальных свойств наночастиц хитозана, обогащённых медью (Cu^{2+} НЧХ) в отношении штаммов Psg и Cff методом диффузии в агар. А: ингибирование роста *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* CFBP 2214; Б: ингибирование роста *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* CFBP 3418

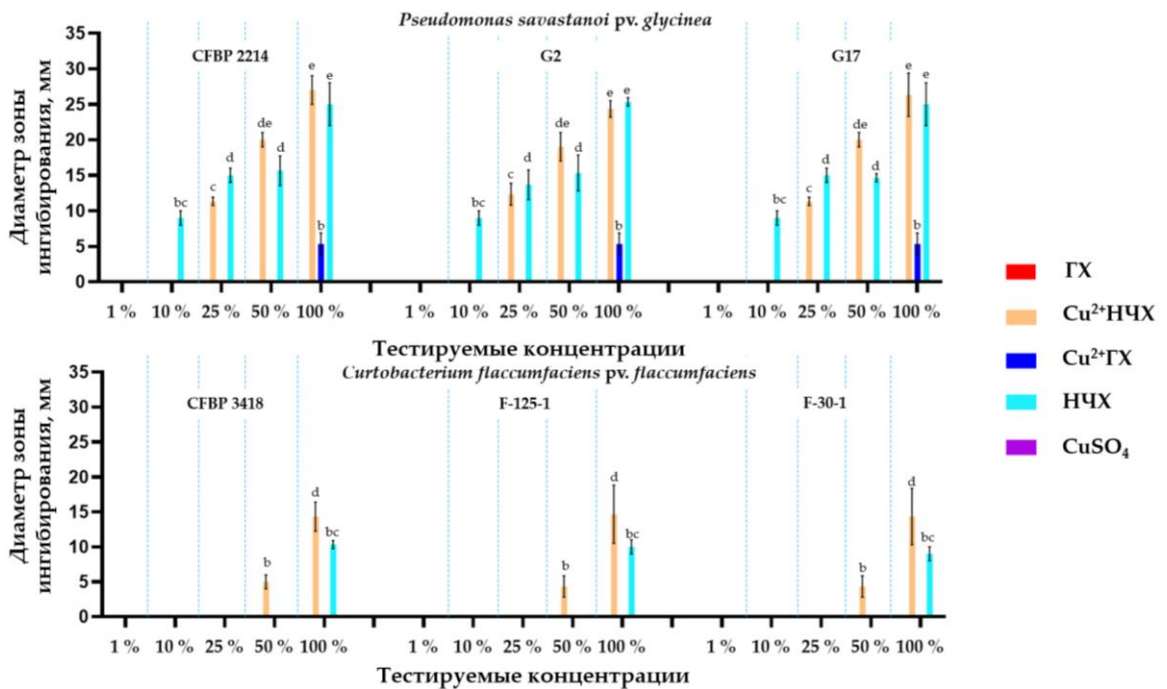


Рисунок 43. Диаметры зон ингибирования для испытываемых веществ в зависимости от концентрации растворов на разных штаммах Psg и Cff в тесте на диффузию в агаре

Результаты определения значений МИК и МБК образцов хитозана приведены в табл. 18. Было обнаружено, что включение меди в наночастицы приводило к снижению МИК и МБК как по отношению к сульфату меди, так и к НЧХ. Добавление ионов меди к гидролизату хитозана ($\text{Cu}^{2+}\text{ГХ}$) усилило его антибактериальную активность, но она была ниже по сравнению с $\text{Cu}^{2+}\text{НЧХ}$.

Таблица 18. Минимальные ингибирующие и бактерицидные концентрации образцов хитозана и CuSO_4 в отношении штаммов Psg и Cff

Образцы	Минимальные ингибирующие (МИК) и бактерицидные (МБК) концентрации образцов, мкг/мл (хитозан/медь)											
	штаммы Psg						штаммы Cff					
	CFBP 2214	G2	G17	CFBP 2214	G2	G17	CFBP 3418	C086	C089	CFBP 3418	C086	C089
	МИК			МБК			МИК			МБК		
ГХ	156/-	156/-	156/-	625/-	625/-	625/-	78/-	78/-	78/-	312/-	312/-	312/-
$\text{Cu}^{2+}\text{ГХ}$	78/13	78/13	78/13	78/13	78/13	39/6	19/3	19/3	19/3	312/52	312/52	0.321/52
НЧХ	39/-	39/-	39/-	156/-	156/-	156/-	39/-	39/-	39/-	156/-	156/-	156/-
$\text{Cu}^{2+}\text{НЧХ}$	19/3	19/3	19/3	78/13	78/13	78/13	19/3	19/3	19/3	78/13	78/13	78/13
CuSO_4	-/6	-/13	-/3	-/13	-/26	-/13	-/13	-/13	-/13	-/52	-/52	-/52

В литературе представлено мало работ, посвящённых изучению эффективности наночастиц хитозана, насыщенных медью, в отношении фитопатогенных бактерий, поэтому мы также рассмотрели те работы, в которых изучалась антибактериальная активность в отношении условно-патогенных бактерий человека. Du et al. исследовали наночастицы на основе хитозана, насыщенных ионами Cu^{2+} , полученных методом ионотропного гелеобразования. В отношении бактерий *E. coli*, *S. choleraesuis* и *S. aureus* было показано, что антибактериальная активность таких наночастиц была значительно выше по сравнению с активностью наночастиц хитозана и ионов Cu^{2+} . Кроме того, грамотрицательные бактерии были более чувствительны, чем грамположительные (Du et al., 2009). Также была изучена антибактериальная активность наночастиц CuO , Cu_2O и Cu^0 , полученных с использованием восстановителей. Для наночастиц CuO бактерицидная концентрация в отношении *Ralstonia solanacearum*, вызывающей бактериальное увядание пасленовых, составляла 250 мкг/мл (Chen et

al., 2019). Значения МБК для наночастиц CuO составляли 100 мкг/мл для *S. aureus*, 250 мкг/мл для *E. coli* и 5000 мкг/мл для *P. aeruginosa* в (Ren et al., 2009). Эти данные согласуются с нашими результатами.

Было обнаружено, что ГХ был менее активен по сравнению с НЧХ. Вероятно, это было связано с тем, что в среде Кинга Б с рН 7,0–7,2, используемой в этом тесте, снижается протонирование аминогрупп, ответственных за проявление антибактериальной активности (Kong et al., 2010). Считается, что одним из механизмов действия хитозана является его способность образовывать плёнки вокруг бактериальных клеток, однако в нашей работе ГХ содержал основную фракцию с низкой молекулярной массой, которая снижает пленкообразующую способность. Наночастицы хитозана проявляли более высокую антибактериальную активность, чем хитозан, вероятно, из-за их более высоких значений отношения поверхности к объему и поверхностной энергии (Kong et al., 2010). О более высокой активности наночастиц хитозана по сравнению с хитозаном ранее сообщали Qi et al. (Qi et al., 2004).

Из результатов тестов CuSO₄ и Cu²⁺ГХ очевидно, что штаммы CFBP 2214 и G17 (Psg) обладали большей чувствительностью к меди, чем штамм G2. Этот факт может быть косвенным показателем разнообразия штаммов, включая чувствительность к бактерицидам. Данные МИК ГХ показывают, что штаммы Cff были более чувствительны к хитозану (78 мг/мл) по сравнению с Psg (156 мкг/мл). Одной из возможных причин этих различий является различная структура клеточной стенки бактерий. Например, в работе (No et al., 2002), в которой испытывали четыре грамотрицательных бактерии (*Escherichia coli*, *P. fluorescens*, *Salmonella typhimurium* и *Vibrio parahaemolyticus*) и семь грамположительных бактерий (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus megaterium*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* и *L. bulgaricus*), было показано, что грамположительные бактерии более чувствительны к хитозану.

Скорость гибели клеток является другим важным параметром, определяющим эффективность антибактериальных средств. Данный показатель описывается кривыми времени летального действия. На рис. 44 показаны кривые

времени летального действия для штаммов Psg CFBR 2214 и Cff CFBR 3418.

Эксперимент проводили для определения продолжительности времени воздействия, при котором происходит полная потеря жизнеспособности клеток. В случае с Psg Cu^{2+} НЧХ вызывали полную гибель клеток в течение первого часа культивирования. Cu^{2+} ГХ действовали в течение 2 ч; для других образцов 100%-ная гибель была достигнута через 24 ч воздействия. Действие всех образцов на штаммы Cff было достигнуто через 2 ч, за исключением НЧХ и ГХ, которые вызывали 100% гибель через 24 ч. Жизнеспособность клеток практически не изменялась в присутствии воды. Аналогичная кинетика действия НЧХ была продемонстрирована ранее, где полное уничтожение *B. subtilis* и *S. aureus* было достигнуто в течение 4 часов (Dash et al., 2019).

Почти во всех используемых нами вариантах гибель 50% клеток происходила в течение 30 мин. Таким образом, Cu^{2+} НЧХ проявляли быстрый бактерицидный эффект, вызывая полную гибель бактерий в жидкой питательной среде в течение 1 ч клеток Psg и 2 ч для Cff. Коллективом Christena с соавторами также обнаружено, что наночастицы меди оказывают бактерицидное действие на *S. aureus* в концентрации 2хМИК и на *P. aeruginosa* в концентрации 1хМИК. В этой же работе через четыре часа после обработки наночастицами меди наблюдали пятикратное логарифмическое снижение КОЕ *Staphylococcus*, а для *Pseudomonas* было продемонстрировано трёхкратное снижение КОЕ (Christena et al., 2015). Таким образом, определение кривых времени летального действия показывало, что Cu^{2+} НЧХ обладают большим потенциалом для борьбы с бактериальными патогенами из-за их высокой скорости гибели клеток по сравнению с действием исходных форм хитозана и меди.

Тест на фитотоксичность образцов хитозана при концентрациях 0,25, 50, 75 и 100% исходных растворов (согласно табл. 3) проводили для определения предельных концентраций образцов для обработки семян и вегетирующих растений. Влияние концентраций образцов на всхожесть семян и длину корней проростков сои показано на рис. 45А-Б. Фитотоксичность образцов при различных концентрациях определяли по средним значениям всхожести и длины корня.

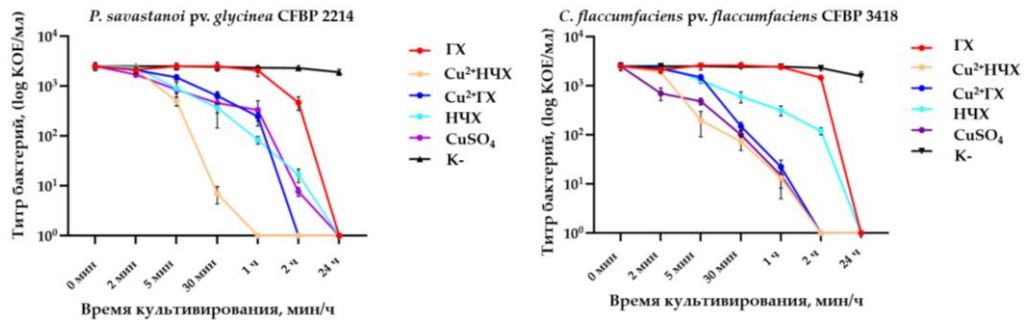


Рисунок 44. Кривые времени летального действия образцов хитозана и CuSO_4 в отношении клеток *Psg* CFBP 2214 и *Cff* CFBP 3418. Во всех анализах использовали концентрацию 1хМБК

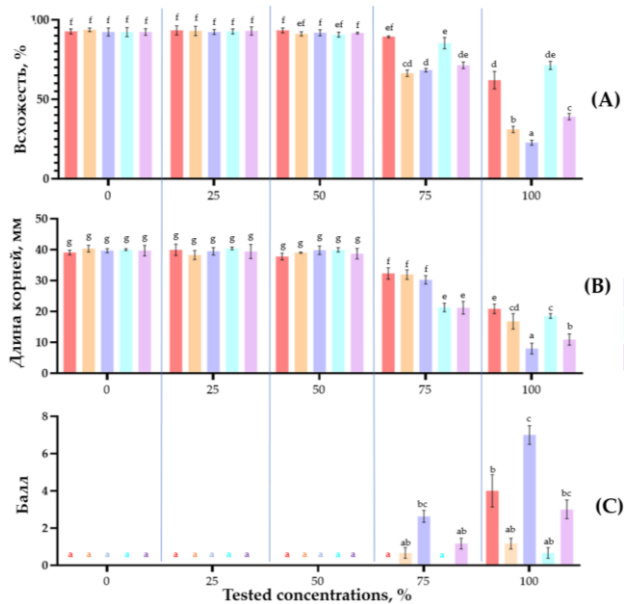


Рисунок 45. Фитотоксичность образцов хитозана на листьях и семенах сои. Показатели всхожести (А) и длины корней (В) семян сои после обработки образцов различными концентрациями через 8 дней после обработки. Средний балл интегрального значения фитотоксичности на листьях сои для образцов хитозана измеряли через 72 ч после обработки (С)

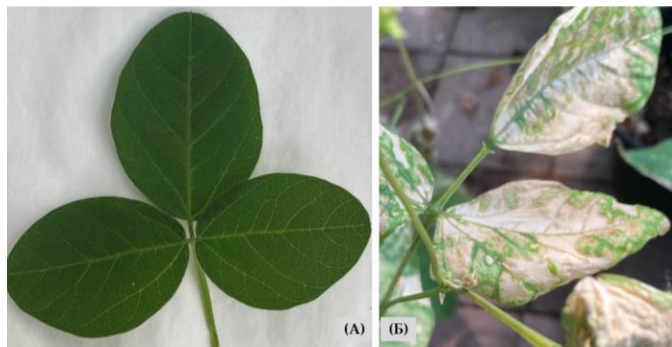


Рисунок 46. Отсутствие фитотоксичности при обработке водой (А) и фитотоксичность 100% раствора Cu^{2+} ГХ (Б) через 72 ч после опрыскивания листьев сои. Представлены типичные для каждого варианта листья

Полученные значения сравнивали с контролем, обработанным водой. Для всех образцов фитотоксический эффект наблюдался при концентрациях выше 50% исходных растворов, соответствующих 2,5 мг/мл хитозана и 0,42 мг/мл CuSO_4 .

При 50% концентрации образцов (2,5 мг/мл хитозана и 0,42 мг/мл CuSO_4) наблюдалось незначительное снижение всхожести и длины корней. При обработке в начальных концентрациях (100%; 5 мг/мл хитозана и 0,83 мг/мл CuSO_4), Cu^{2+} ГХ сильнее всего снижали всхожесть семян, а НЧХ оказывали наименьшее фитотоксическое действие. Cu^{2+} ГХ оказывал наиболее токсичное воздействие на длину корней, а ГХ был наименее токсичным по этому показателю. Важно, что включение меди в наночастицы повышало их антибактериальную активность и снижало фитотоксичность меди.

Фитотоксичность веществ на вегетирующих растениях сои проверяли путём опрыскивания образцов в различных концентрациях. Для всех образцов было определено дозозависимое увеличение фитотоксичности с увеличением концентрации.

Как и в случае с семенами, порог безопасных нефитотоксичных концентраций для обработки листьев составлял 50% от исходных растворов (2,5 мг/мл хитозана и 0,42 мг/мл CuSO_4) для всех проанализированных образцов (рис. 45В). Наибольшей фитотоксичностью обладал Cu^{2+} ГХ; при обработке 100% раствором (5 мг/мл хитозана, 0,83 мг/мл CuSO_4) наблюдались симптомы фитотоксичности в виде поражения листьев, при этом средний балл фитотоксичности достигал 7,0, что соответствовало очень сильному повреждению листьев (рис. 45Г и рис. 46).

Высокая фитотоксичность ГХ, вероятно, была обусловлена присутствием солей в виде нитрата аммония и NO_3^- в качестве противоионов на аминогруппах хитозана. Фитотоксичность меди в Cu^{2+} НЧХ была значительно ниже по сравнению с Cu^{2+} ГХ и CuSO_4 . Вероятно, это связано с медленным высвобождением меди из наночастиц по сравнению с раствором CuSO_4 . Это подтверждено в исследовании (Young et al., 2014). В то же время металлические частицы без хитозана проявляли

фитотоксические свойства, как и в работе Stampoulis с соавторами, где обработка наночастицами меди (Cu^0) в концентрации 1 мг/мл приводила к снижению биомассы растений цуккини на 90% по сравнению с необработанными контрольными растениями (Stampoulis et al., 2009). В отличие от этого, Shende с соавторами обнаружили, что обработка голубинового горошка (*Cajanus cajan*) раствором наночастиц меди в концентрации 20 ppm приводила к увеличению высоты растений, длины корней, массы в свежем и сухом виде и индекса продуктивности растений (Shende et al., 2017). Это могло быть связано как с более низкой концентрацией меди, так и с менее токсичным методом получения частиц с использованием растительных экстрактов.

Для соблюдения принципа единого различия были проведены дальнейшие исследования по борьбе с бактериальными болезнями сои применением образцов хитозана с использованием 50% растворов (2,5 мг/мл хитозана и 0,42 мг/мл CuSO_4), которые не выявили статистически значимых показателей фитотоксичности на растениях сои.

Определение эффективности применения наночастиц хитозана в борьбе с бактериальными болезнями сои проводили на листьях и семенах, предварительно инокулированных суспензиями Psg и Cff.

Образцы с хитозаном снижали интенсивность поражения листьев Psg на 15-71% по сравнению с контрольными вариантами, обработанными водой (рис. 47А-Б, 48). Опрыскивание Cu^{2+} НЧХ привело к уменьшению интенсивности поражения на 71% по сравнению с контролем, в то время как обработка Cu^{2+} ГХ способствовало снижению интенсивности поражения только на 50%. Обработка CuSO_4 , ГХ и НЧХ не приводила к значительному уменьшению интенсивности поражения (на 15-20%) по сравнению с контролем.

Средняя интенсивность поражения заболеванием в контрольной группе, инфицированной Cff, была ниже, чем в группе, инфицированной Psg, но оставалась на высоком уровне (9,2% и 18,5% соответственно). Наибольшая эффективность наблюдалась при обработке Cu^{2+} НЧХ (уменьшение интенсивности поражения на

51,3%), в то время как эффективность других образцов варьировала от 17,8 до 26,9% по сравнению с контролем (рис. 47В).

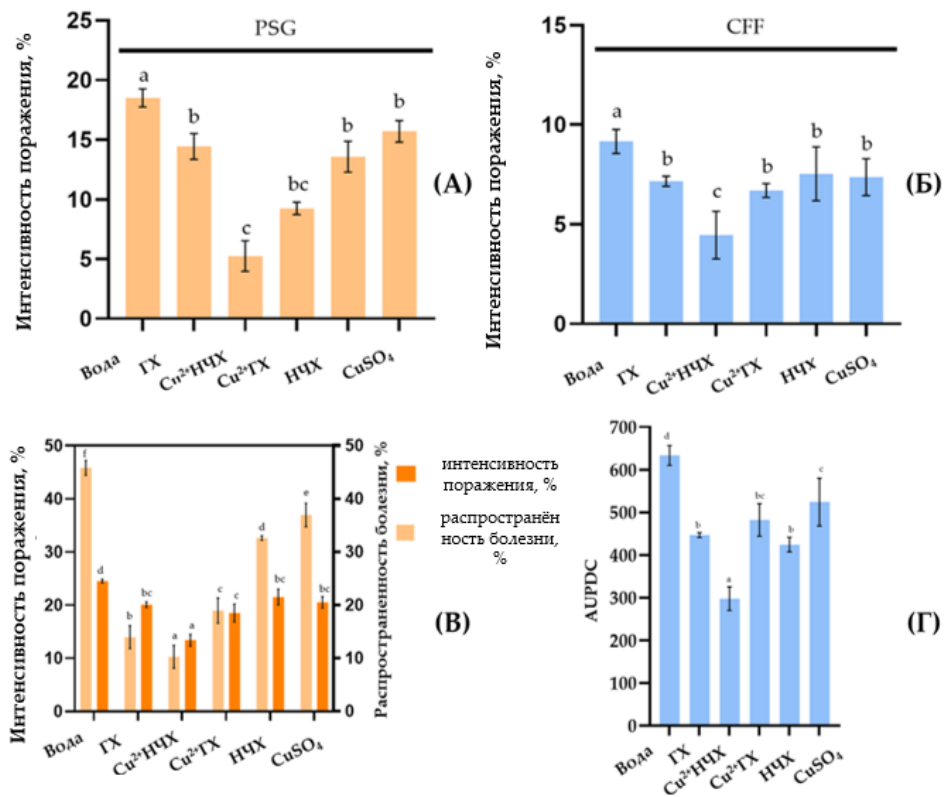


Рисунок 47. Бактериальный ожог (А, В) и ржаво-бурая бактериальная пятнистость и увядание (Б, Г) сои, вызванные искусственной инокуляцией Psg и Cff после обработки образцами хитозана. (А, Б): интенсивность поражения болезнью инокулированных вегетирующих растений; (В): интенсивность поражения болезнью и распространённость после инокуляции семян сои Psg; (Г): значения AUPDC после инокуляции семян сои Cff и обработке образцами хитозана

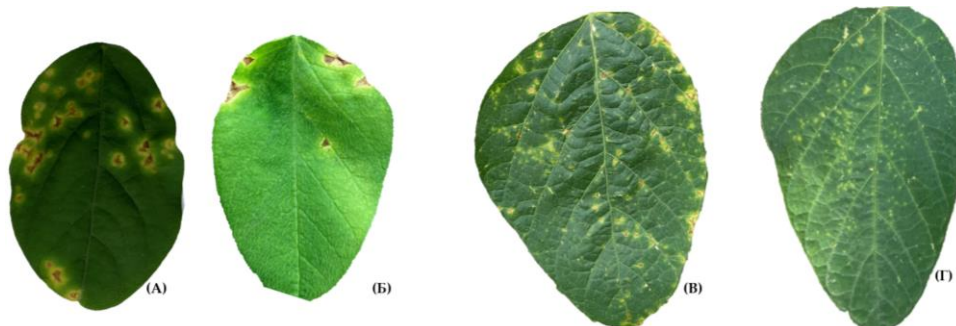


Рисунок 48. Симптомы Psg и Cff на листьях сои через 12 дней после инокуляции аэрографом. (А) обработка заражённых листьев водой (положительный контроль; Psg-инфекция); (Б) обработка Cu²⁺НЧХ (инфекция Psg); (В) обработка водой заражённых листьев (положительный контроль; инфекция Cff); (Г) обработка Cu²⁺НЧХ (инфекция Cff). Представлены типичные листья по вариантам

Обработка семян сои, предварительно заражённых Psg, с использованием образцов хитозана показала значительное снижение частоты заражения проростков и интенсивности поражения болезнью. В случае растений, обработанных водой, наблюдалось быстрый рост интенсивности поражения болезнью (рис. 47В). При ежедневном поливе дождеванием у растений возникала вторичная инфекция, сходная со вспышкой заболевания в полевых условиях.

Биологическая эффективность обработки семян Cu^{2+} НЧХ в отношении Psg составила 77% (по распространённости болезни) или 45,3% (по интенсивности поражения) по сравнению с контролем. Обработка Cu^{2+} ГХ снижала интенсивность поражения болезнью примерно в 1,3 раза и распространённость более чем в 2 раза. Наименее эффективными были обработки растворами CuSO_4 и НЧХ. Их эффективность по интенсивности поражения болезнью составила 19,3%, а в отношении распространённости болезни - 16,3%.

У растений, взошедших из заражённой Cff контрольной группы семян, проявлялись симптомы увядания и пожелтения листьев сои со средним показателем AUPDC = 609 единиц (рис. 47Г). В целом, эффективность обработки всеми образцами была ниже для Cff, чем для Psg. Обработка Cu^{2+} НЧХ показала наилучший результат с биологической эффективностью 53% в сравнении с контролем, а НЧХ снижали AUPDC только на 33%. Обработка семян CuSO_4 продемонстрировала слабый биологический эффект на уровне 17%.

Эффективность обработки растений наночастицами хитозана обогащёнными медью сильно зависит от таких факторов как концентрация активных веществ и тип патогена. В работе Swati с соавторами обработка растений сои раствором наночастиц хитозана, обогащённых медью в концентрации 0,02–0,12% снижала развитие пустульного бактериоза на 50,0–33,3% и 55,3–34,0% в вегетационном опыте и в полевых условиях, соответственно (Swati et al., 2022). Изучали также эффективность наночастиц на основе меди и хитозана при обработке растений банана в отношении *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. При концентрации 0,2 мг/мл была показана высокая эффективность, которая составила 73% по сравнению с необработанным контролем (Kumar et al., 2022).

Таким образом, был проведён синтез различных образцов хитозана (гидролизата хитозана; гидролизата хитозана с медью; наночастиц хитозана и обогащённых медью наночастиц хитозана) и показана высокая антибактериальная активность обогащённых медью наночастиц хитозана в отношении Psg и Cff. В процессе изучения антибактериальных свойств образцов на фоне искусственного заражения двумя основными бактериальными заболеваниями сои было обнаружено, что обработка раствором Cu^{2+} НЧХ семян и листьев, которые ранее были заражены бактериальными патогенами, является эффективным средством снижения развития данных болезней на сое. Исследованные образцы потенциально могут быть использованы в качестве элемента технологии защиты сои от болезней бактериальной этиологии. Однако следует оценить потенциальные побочные эффекты на нецелевые организмы и провести полевые испытания.

3.11. Скрининг фунгицидов для борьбы с бактериальными болезнями на сое

Обработка растений фунгицидами является основным и наиболее распространённым методом борьбы с болезнями (Павлюшин и др., 2015). В качестве профилактики появления болезней проводится обработка семян, а при появлении болезней во время вегетации – опрыскивание растений (Долженко и др., 2021). На данный момент ассортимент фунгицидов для борьбы с бактериальными болезнями сои в России недостаточен (см. раздел 1.10). Одним из путей решения этой проблемы является проведение скрининга представленных на рынке фунгицидов и известных в других странах веществ на предмет антибактериального действия в отношении возбудителей бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости. В данном разделе являлся проводили скрининг антибактериального действия фунгицидов в отношении возбудителей бактериальных патогенов сои (прил. Д).

Фитотоксичность фунгицидов определяли путём обработки ими семян и вегетирующих растений сои. Фитотоксичность 18 испытанных фунгицидов для семян оценивали по снижению скорости прорастания и длины корней. Результаты представлены на рис. 49А-Б.

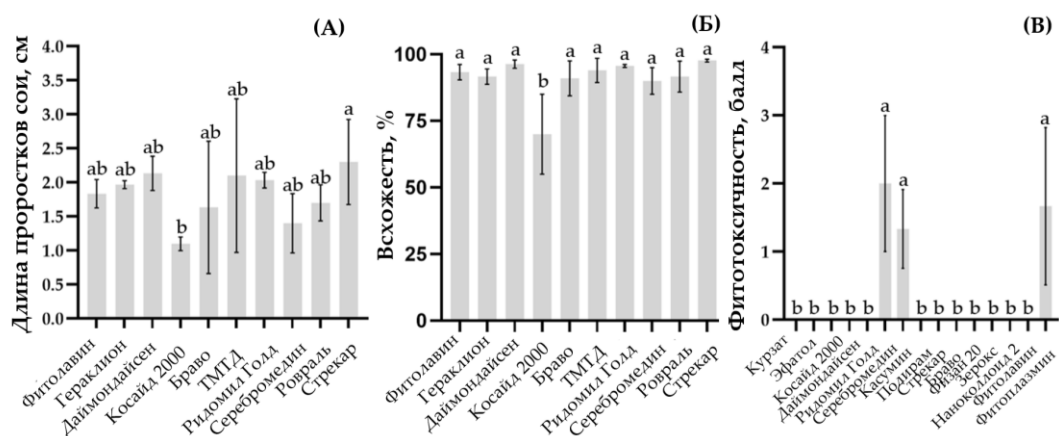


Рисунок 49. Длина проростков сои (А), лабораторная всхожесть семян (Б) и средний балл фитотоксичности (В) после обработки фунгицидами

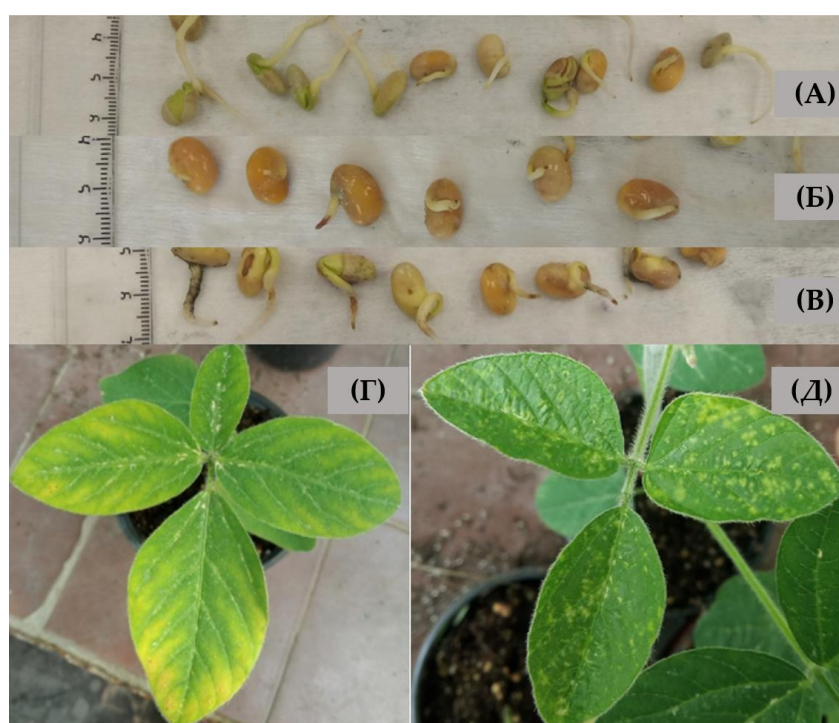


Рисунок 50. Симптомы фитотоксического действия фунгицидов, применённых для обработки семян (А-В) и вегетирующих растений сои (Г-Д). А - Стрекар (без фитотоксического действия), Б - Косайд 2000; В-Г - Серебромедин; Д – Фитоплазмин

Согласно полученным данным, минимальные значения как длины корней проростков, так и скорости прорастания наблюдались в вариантах, обработанных препаратом Косайд 2000 и Серебромедин, но статистически значимая разница наблюдалась только при обработке препаратом Косайд 2000. При фолитарном применении фитотоксичность, проявляющаяся в хлорозе листьев, была отмечена

после обработки препаратами Серебромедин, Касумин и Фитоплазмин (рис. 49В, 50).

Аналогичные результаты по фитотоксичности этих фунгицидов были получены ранее на других растениях: для касугамицина - на яблоне (Adaskaveg et al., 2011), для гидрохлорида меди (Косайд 2000 и др.) - на многих культурах (Arunakumara et al., 2013), а у макролидного тилозинового комплекса (Фитоплазмин) - на капусте (Джалилов, Ха, 2014). Остальные фунгициды не проявили значительного фитотоксического действия независимо от способа применения.

Антибактериальную активность in vitro определяли для 14 фунгицидов, при этом препараты Серебромедин, Касумин, Косайд 2000 и Фитоплазмин не были протестированы, так как они оказывали фитотоксическое действие на прорастающие семена и/или листья (в результате тестирования на предыдущем этапе). Все испытанные фунгициды обладали статистически значимым антибактериальным эффектом в отношении штаммов Psg и Cff, однако они существенно различались по значениям МБК (табл. 19). Наибольшие значения этого показателя показали препараты Стрекар и Нанокolloид 2 (средние значения МБК 3,5 и 2,5%, соответственно), а наибольшую антибактериальную активность - Даймодайсен, Полирам и Физан 20 (средние значения МБК = 0,002, 0,005 и 0,09 %, соответственно).

Непараметрическая корреляция между реакцией Psg и Cff на испытываемые фунгициды была высокой и достоверной (ранговая корреляция Спирмена = 0,87, гамма-корреляция = 0,72 и тау-корреляция Кендалла = 0,71; все значимы при $p < 0,05$). Несмотря на это, факторный анализ выявил три основных фактора, ответственных за 59,2%, 28% и 8,9% вариаций данных, и сгруппировал препараты в 4 класса: 1) первый класс со значимым главным эффектом 1-го фактора (варианты Курзат; Эфатол; Ридомил Голд; Физан 20; Гераклион; Даймондайсен; и ТМТД), 2) второй класс - с основным эффектом 2-го фактора (варианты Фитолавин и Нанокolloид 2), 3) третий класс - с основным 3-м фактором (Стрекар, Зерокс и Ровраль) и 4) четвёртый класс - с основным эффектом 4-го фактора (вариант

Полирам). Разница в МБК в отношении двух патогенов находилась в диапазоне от 1 (одинаково) до 10 раз. Наибольшая разница между МБК фунгицидов в отношении Psg и Cff была обнаружена для Полирама (0,001 против 0,01, соответственно).

Антибактериальный эффект тетраметил-тиурам-дисульфида (тирама) хорошо известен (Kaars et al., 1959; Akerström et al., 1962). Однако опубликованные исследования бактерицидной активности тирама указывают на различную чувствительность бактерий, в частности, грамотрицательных видов (Long et al., 2017).

Таблица 19. Значения минимальных бактерицидных концентраций (МБК) испытанных фунгицидов в отношении эталонных штаммов Psg (CFBP 2214) и Cff (CFBP 3418)

№	Фунгицид	Psg (CFBP 2214)		Cff (CFBP 3418)		Специфичность бактерицидного эффекта
		МБК, % препарата в растворе *	Статистические группы**	МБК, % препарата в растворе *	Статистические группы**	
1	ТМТД	0,78	H	0,39	G	2,00
2	Физан 20	0,15	E	0,05	B	3,00
3	Фитолавин	0,78	H	0,78	I	1,00
4	Стрекар	5,0	M	2,0	K	2,50
5	Курзат	0,049	BC	0,15	D	3,06
6	Зерокс	1,5	J	0,5	H	3,00
7	Нанокolloид 2	2,5	L	2,5	L	1,00
8	Браво	0,5	C	2,5	E	5,00
9	Гераклион	0,31	F	0,1	C	3,10
10	Даймондайсен	0,003	A	0,001	A	3,00
11	Ридомил Голд	0,1	D	0,1	C	1,00
12	Ровраль	1,25	I	0,4	G	3,13
13	Эфатол	0,31	F	0,3	F	1,03
14	Полирам	0,001	A	0,01	A	10,00

Примечание: * - концентрация рабочего раствора, % по действующему веществу; ** - значения в строках, отмеченных разными буквами, указывают на значимое различие при использовании критерия Дункана ($p = 0,05$).

Механизм действия тирама заключается в способности вызывать окислительный стресс, связанный с синтезом свободных радикалов кислорода,

гидроксила и перекиси водорода, что приводит к повреждению мембран и гибели бактериальных клеток (Cui et al., 2019).

Биологическую эффективность фунгицидов определяли на семенах и вегетирующих растениях сои, инокулированных возбудителями бактериозов. Для этого фунгициды, испытанные *in vitro*, были проранжированы по значениям МБК, и для дальнейшего изучения были отобраны по три фунгицида с наименьшим значением МБК для обоих патогенов: Даймондайсен, Полирам и Физан 20. Фунгициды, применяемые для обработки семян, также были ранжированы по МБК, и для дальнейших исследований были отобраны три препарата, показавших наименьшее значение: ТМТД, Даймондайсен и Ридомил Голд.

Эффективность обработки препаратами оценивали на заражённых семенах и листьях. Распространённость бактериального ожога при обработке семян сои снижалась во всех вариантах, однако статистически достоверную разницу наблюдали только в варианте с применением ТМТД. Препарат подавлял распространённость болезни на 21-й день после инокуляции на 39% по сравнению с контрольным вариантом (рис. 51А). Разница в интенсивности поражения болезнью для всех вариантов была статистически незначимой. Это можно объяснить несистемным действием тирама и выживаемостью патогенов, находящихся под оболочкой семян (Murthy et al., 1976).

В опыте с обработкой зараженных *Cff* семян значения AUDPC ржаво-бурой бактериальной пятнистости/увядания сои для всех вариантов были ниже, чем в контрольном варианте на 95%-ном уровне значимости. Наименьшие значения интенсивности поражения болезнью были получены в вариантах с применением препаратов ТМТД и Ридомил Голд (значения AUDPC ниже контроля на 43,0 и 66,2% соответственно) (рис. 51Б).

В отношении листовой инфекции *Psg* оценивали три фунгицида: Даймондайсен, Полирам, Физан 20. Обработка всеми фунгицидами снижала распространённость бактериального ожога (рис. 52А, 53А-Б). Наиболее эффективным оказался Физан 20 – наблюдали снижение симптомов заболевания на 54,5% по сравнению с контролем. Далее по эффективности следовали обработки

препаратами Даймондайсен (снижение на 45,5%) и Полирам (снижение на 36,4%). Интенсивность поражения болезнью на растениях статистически достоверно снижалась только после обработки препаратом Даймондайсен (снижение на 65,9%) (рис. 52А).

Результаты опытов по борьбе с Cff на листьях показали, что все препараты снижали распространённость и интенсивность поражения ржаво-бурой бактериальной пятнистостью и увяданием сои при обработке заражённых листьев сои.

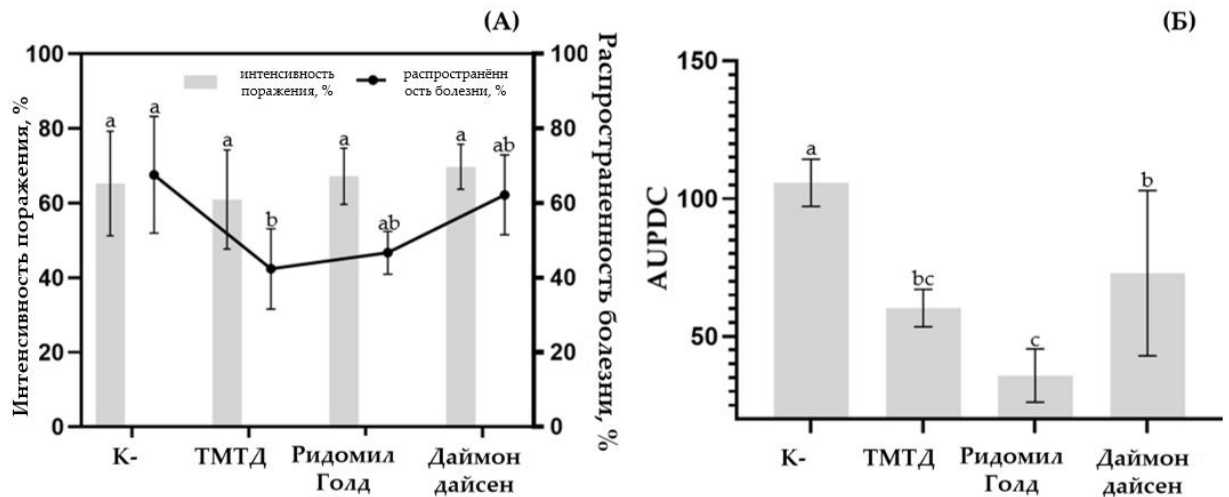


Рисунок 51. Интенсивность поражения и распространённость бактериального ожога (Psg) (А) и AUDPC ржаво-бурой бактериальной пятнистости/увядания (Cff) (Б) сои при обработке зараженных семян различными фунгицидами

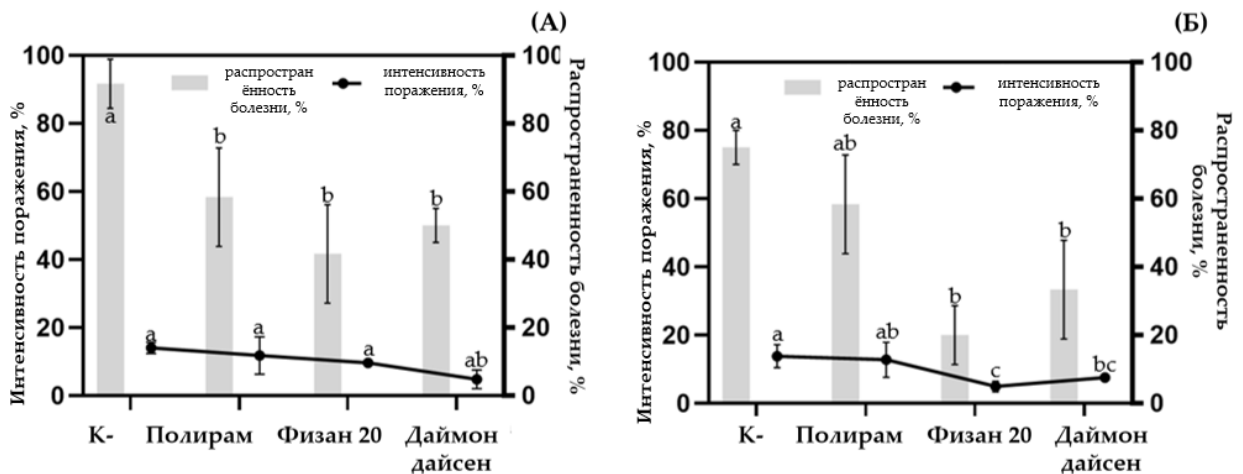


Рисунок 52. Интенсивность поражения и распространённость Psg (А) и Cff (Б) на 12-й день после инокуляции вегетирующих растений

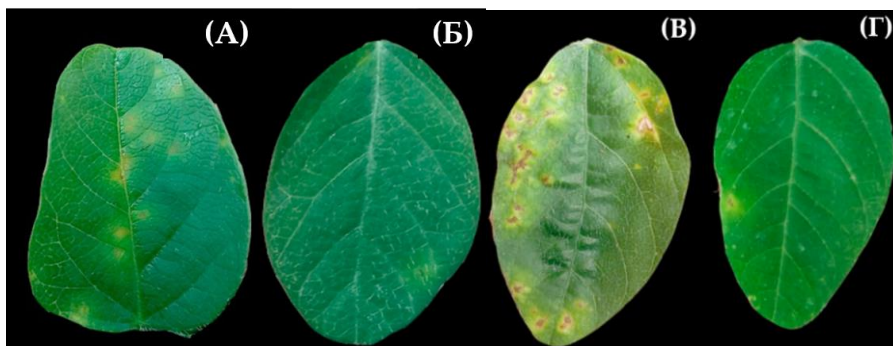


Рисунок 53. Различия в интенсивности поражения листьев сои, вызванных Psg (А, Б) и Cff (В, Г) при обработке различными фунгицидами: А - контроль (вода), Б - Даймондайсен, В - контроль (вода); Г - Даймондайсен

По влиянию на распространённость болезни наиболее эффективной оказалась обработка фунгицидом Физан 20 (снижение распространённости болезни на 45,4% по сравнению с контролем) и Даймондайсен (64,4%) (рис. 53В, Г). По интенсивности поражения болезнью наиболее эффективным оказался Физан 20 (снижение на 77,8% в сравнении с отрицательным контролем).

Протестированные фунгициды обладали антибактериальным действием в отношении штаммов Psg и Cff. Для борьбы с этими патогенами приемлемую эффективность показали обработки по следующей схеме: для борьбы с бактериальным ожогом (Psg) на семенах - ТМТД (7,0 л/т), а на вегетирующих растениях – Даймондайсен (1,6 кг/га) или Физан 20 (0,14 л/га). Для борьбы с бактериальной пятнистостью и увяданием (Cff) сои на семенах высокую эффективность показал препарат Ридомил Голд (2 кг/т), а на вегетирующих растениях – Физан 20. Физан 20 (д.в. четвертичные аммониевые соединения) показал такую же высокую эффективность, как и известные фунгициды (манкоцеб и др.), применяемые для борьбы с болезнями на вегетирующих растениях. Это свидетельствует о высоком потенциале этого нового класса фунгицидов для борьбы с бактериальными болезнями растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема поиска мер диагностики и борьбы с бактериальными болезнями сои является актуальной задачей, особенно в связи с постоянным расширением посевов культуры в России и необходимостью интенсификации её производства. В результате проведённой работы показано, что бактериальные болезни являются одним из значимых компонентов патоконплекса болезней сои. Важным аспектом проблемы является включение некоторых возбудителей бактериозов сои в списки карантинных объектов в странах – импортерах Российской с.-х. продукции.

Согласно концепции интегрированной защиты растений, биологические особенности вредного организма должны быть основой при проведении защитных мероприятий. Анализ биологических свойств штаммов Psg показал малую генетическую вариабельность и однородность расового состава. Изучение биологических свойств Cff показало, что существует внутривидовая дифференциация штаммов по ряду биологических свойств. Выявлено что штаммы, выделенные с сорных растений, были генетически близки к ряду штаммов, выделенных с сои. Данный факт также показывает необходимость дальнейшего углубленного изучения путей циркуляции патогенов в природе.

В связи с тем, что семена являются основным источником инфекции при бактериозах сои, одной из главных задач является разработка высокочувствительных и достоверных методов диагностики заражённости семян. Использование разработанной нами мультиплексной системы диагностики патогенов методом ПЦР-РВ в семенах при проведении фитосанитарной экспертизы должно способствовать уменьшению передачи бактериальных патогенов сои с семенами.

Ограниченность ассортимента бактерицидов делает актуальным поиск новых мер защиты с использованием бактериофагов, растительных экстрактов, эфирных масел, комплексов наночастиц хитозана и меди и некоторых фунгицидов для протравливания семян и обработки вегетирующих растений. Полученные нами данные указывают на перспективность их использования в будущем при защите сои от бактериальных болезней.

При всём разнообразии приёмов защиты в центре системы интегрированной защиты растений должно быть использование устойчивых или слабовосприимчивых сортов. Нами были протестированы методы создания инфекционного фона и выделено несколько сортов как потенциальных источников устойчивости. Однако перечень устойчивых сортов, безусловно, не исчерпывается выявленными нами, и работа должна быть продолжена. Полученные нами данные дают основание считать создание устойчивых сортов сои весьма перспективным направлением в защите сои от бактериальных болезней.

Проведённые нами исследования позволили сделать следующие **выводы**:

1. Из 87 образцов семян и листьев сои из регионов России в период с 2019 по 2022 год выделены 12 штаммов возбудителя бактериального ожога сои. Выделенные штаммы показали разную степень агрессивности при инокуляции растений сои, их генотипирование показало, что они обладают низкой генетической вариабельностью. Анализ расового состава популяции патогена показал, что все штаммы относятся к расе 4, доминирующей во всём мире.

2. Из 56 образцов культурных и сорных растений из разных регионов России с 2018 по 2022 год выделены 33 штамма возбудителя ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания сои. Обнаружение Cff на сое является первым подтверждённым случаем заражения данной культуры на территории России. Штаммы различались по степени вирулентности на растениях сои и фасоли. Филогенетический анализ по гену аланинсинтазы показал, что штаммы, выделенные с сои кластеризовывались со штаммами из сорных растений. При анализе чувствительности к дигидроксиду меди выявлено, что один штамм обладал повышенной устойчивостью к нему.

3. Разработанная система мультиплексной диагностики Psg и Cff позволяет диагностировать наличие патогенов при их концентрации в семенном экстракте не менее 10^2 КОЕ/мл. Система была проверена на обширной коллекции штаммов патогенов и близкородственных видов, показала эффективность, близкую к 100% и специфичность в отношении целевых видов.

4. Анализ восприимчивости 47 сортов сои к бактериальным болезням

показал, что наименее восприимчивым является сорт Соер 4. Способ инокуляции листьев сои срезом листа ножницами, смоченными в суспензии бактерий, является наиболее оптимальным для использования по проявлению симптомов и затратам рабочего времени.

5. Из образцов почвы, на которой выращивалась соя, выделено 3 изолята бактериофагов Psg. Характеристика методами электронной микроскопии, полногеномного секвенирования и анализ биологических свойств позволил отнести их к семейству *Autographiviridae*. Обработка фагом P421 семян сои, заражённых Psg, показала биологическую эффективность 59,7% по распространённости и 55,0% по интенсивности поражения, а в случае с заражёнными вегетирующими растениями – 52,0% по интенсивности поражения.

6. Из образца почвы выделен изолят бактериофага Cff Аука. Характеристика методами полногеномного секвенирования и электронной микроскопии позволила отнести бактериофаг к семейству *Salasmaviridae*. Обработка фагом Аука вегетирующих растений сои показала биологическую эффективность по интенсивности поражения – 41,0%, а в случае с заражёнными Cff семенами – 36,8% по площади кривой прогрессирования (AUPDC) болезни.

7. Анализ антибактериальной активности 19 эфирных масел и 19 растительных экстрактов показал, что наибольшей активностью в отношении штаммов Psg и Cff и отсутствием фитотоксичности на растениях сои обладают эфирные масла коричника китайского и душицы обыкновенной и этанольный экстракт бадана толстолистного. Биологическая эффективность применения эфирного масла коричника китайского на искусственном фоне Psg и Cff на семенах и вегетирующих растениях сои варьировала от 47,0 до 80,6% в зависимости от экстракта или эфирного масла, патогена и способа применения.

8. Показано, что комплекс наночастиц хитозана с медью обладает повышенной антибактериальной активностью в отношении штаммов Psg и Cff и менее фитотоксичен в отношении семян и вегетирующих растений сои по сравнению с исходными формами. Биологическая эффективность применения комплекса наночастиц хитозана и меди на искусственном инфекционном фоне

бактериозов сои составила 51,3 – 77,0% в зависимости от патогена.

9. Высокую антибактериальную активность и биологическую эффективность в борьбе с бактериозами сои показали следующие фунгициды: в борьбе с бактериальным ожогом (Psg) на семенах – ТМТД, ВСК (7,0 л/т), а на вегетирующих растениях – Даймондайсен, СП (1,6 кг/га) или Физан 20, ВРК (0,14 л/га), в борьбе с бактериальной пятнистостью и увяданием (Cff) сои на семенах - Ридомил Голд, ВДГ (2 кг/т), а на вегетирующих растениях – Даймондайсен, СП. Выявлена антибактериальная активность в отношении бактериозов сои нового класса фунгицидов с д.в. четвертичные аммониевые соединения.

Исходя из результатов диссертационного исследования, можно сделать следующие **практические рекомендации**:

1. Селекционным учреждениям при выведении устойчивых сортов сои к бактериозам в качестве перспективного источника генов устойчивости рекомендуется использовать сорт Соер 4, а для создания искусственного инфекционного фона бактериального ожога сои - штаммы расы 4 *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.

2. Фитосанитарным лабораториям для производительной, высокочувствительной экспертизы семенного материала сои на зараженность бактериозами рекомендуется использовать предложенную мультиплексную систему на основе метода ПЦР в реальном времени (Tarakanov et al., 2023; DOI 10.1590/1519-6984.275505).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Psg	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>
Cff	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>
ОП ₆₀₀	оптическая плотность при 600 нм
NCBI	National Center for Biotechnology Information, Национальный центр биотехнологической информации США
ПЦР	полимеразная цепная реакция
dNTP	дезоксинуклеозидтрифосфаты
п.н.	пары нуклеотидов
U (u)	(unit) единица
BLAST	(Basic Local Alignment Search Tool) семейство компьютерных программ, служащих для поиска сходных аминокислотных или нуклеотидных последовательностей
ЭМ	эфирное масло
РЭ	растительный экстракт
ЭМКК	эфирное масло коричника китайского
ЭМКК	эфирное масло коричника китайского
ЭМДО	эфирное масло душицы обыкновенной
ЭЭБТ	этанольный экстракт бадана толстолистного
ДМСО	диметилсульфоксид
МИК	минимальная ингибирующая концентрация
МБК	минимальная бактерицидная концентрация
ppm	(parts per million) миллионная доля
МСД	масс-спектрометрический детектор
ПВД	пламенно-ионизационный детектор
д.в.	действующее вещество (ва)
ГХ	гидролизат хитозана
Cu ²⁺ ГХ	комплекс гидролизат хитозана с медью
НЧХ	наночастицы хитозана
Cu ²⁺ НЧХ	комплекс наночастиц хитозана и меди
CuSO ₄	сульфат меди (II)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутовец Е. С. Иммунологическая оценка сортов сои экологического испытания в Приморском НИИСХ / Е. С. Бутовец, Л. М. Лукьянчук // Наука и молодежь: фундаментальные и прикладные проблемы в области селекции и генетики сельскохозяйственных культур : Материалы международной школы-конференции молодых ученых, зерноград, 07–10 ноября 2017 года / ФГБУН «Аграрный научный центр «Донской»; Редакторы: А.В. Алабушев, А.В. Гуреева, П.И. Костылев, А.А. Донцова, Д.М. Марченко, А.С. Попов, В.В. Ковтунов. – Зерноград: АО «Книга», 2017. – С. 91-95.
2. Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. - М: Издание официальное. - 2023. - 924 с.
3. Джалилов Ф.С., Нгок Ха В.Т. Защита капусты от болезней в период вегетации // Картофель и овощи. – 2014. – №. 1. – С. 20-23.
4. Долженко, В. И. Защита растений: настоящее и будущее / В. И. Долженко // Плодородие. – 2018. – № 1(100). – С. 24-26.
5. Долженко В.И., Сухорученко Г. И., Лаптиев А. Б. Развитие химического метода защиты растений в России // Защита и карантин растений. – 2021. – №. 4. – С. 3-13.
6. Евсеев П.В. Биоинформатические подходы к таксономической классификации бактериофагов: дис. ... канд. биол. наук: 25.00.15. - Моск. гос. университет, Москва, 2023 - 246 с.
7. Заостровных В.И., Кадуров А.А., Дубовицкая Л.К., Рязанова О.А. Мониторинг видового состава болезней сои в различных зонах соеяния // Дальневосточный аграрный вестник. – 2018. – №. 4(48). – С. 51-67.
8. Игнатов А.Н., Панычева Ю.С., Воронина, Гресис В.О., Пакина Е.Н. Ожог листьев и гниль корнеплодов сахарной свёклы, вызванные *Pseudomonas syringae* pv. *artata* в Российской Федерации // Сахар. – 2018. – №7. – С. 14-17.

9. Коробейников А.С., Ашмарина Л. Ф. Оценка селекционного материала сои на комплексную устойчивость к фитопатогенам // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2021. – Т. 9. – №. 203. – С. 5-9.
10. Краснова М.В. Бактериозы сои и меры борьбы с ними: автореферат дис. ... кандидата биологических наук. - Кишиневский сельскохозяйственный институт. Кишинев, 1963. - 26 с.
11. Курилова Д.А. Лабораторная оценка эффективности фунгицидов против семенной инфекции сои // Масличные культуры. – 2021. – №. 2 (186). – С. 81-87.
12. Лазарев А.М., Мысник Е.Н., Варицев Ю.А. [и др.] Ареалы и зоны вредоносности основных бактериозов растений на территории России и сопредельных стран // Вестник защиты растений. – 2017. – №. 1 (91). – С. 52-55.
13. Лазарев, А. М. Ареал и зона вредоносности бактериальной угловатой пятнистости (бактериального ожога) сои / А. М. Лазарев, В. А. Коробов, Н. С. Волосатова // Пути повышения эффективности использования генетических ресурсов зернобобовых в селекции : Тезисы докладов Международной научной конференции, Санкт-Петербург, 01–03 ноября 2016 года / Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России), Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР). – Санкт-Петербург: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова", 2016. – С. 72-74.
14. Лаптиева А.Б. Риски в защите растений, их содержание и координация / А.Б. Лаптиева, В.К. Мальцев // Фундаментальные и прикладные аспекты продовольственной безопасности: Сборник материалов научных трудов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Большие Вяземы, 21 ноября 2023 г. / Коллектив авторов, под редакцией М.Г. Барышева, 2023 – 317 с.
15. Матвеева Е.В. Серологический метод определения бактериозов сои. / Е.В. Матвеева, Н.А. Острогская // Тез. докл. Всесоюзного симпозиума по

бактериальным болезням растений / Коллектив авторов, под редакцией К.И. Бельтюкова, Киев: Наукова думка, – 1966. – С. 53-54.

16. Nakata. Бактериальная пятнистость сои (*Bacterium glycineum* Coe var. japonicum (Takimoto)). Альбом болезней растений (на японском языке). 1934-1950.

17. Никитина К. В., Корсаков Н. И. Бактериозы сои // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 1978. – № 62. – С. 13.

18. Никитина А.И. Опасные болезни сои на Дальнем Востоке // Защита растений от вредителей и болезней. – 1962. – №. 7. – С. 37-40.

19. Овчинникова А.М., Полтайчук В.И. Болезни семян сои на Дальнем Востоке СССР и методы их фитопатологического анализа // Бюллетень всесоюзного института защиты растений – 1980. – №. 48. – С. 41-45.

20. Орынбаев А.Т. Усовершенствование приёмов защиты капусты от сосудистого бактериоза: дис. ... канд. биол. наук: 06.01.07 – Рос. гос. агр. унив., Москва, 2019 – 150 с.

21. Павлюшин В. А., Долженко В. И., Шпанев А. М. [и др.] Интегрированная защита озимой пшеницы // Защита и карантин растений. – 2015. – №. 5. – С. 38-71.

22. Подкина Д.В., Никитина К.В., Белехова К.А., Андреева Л.Т. Бактериальные болезни сои в Краснодарском регионе // Бюллетень Института растениеводства имени Н.И. Вавилова. – 1980. – №. 97. – С. 70-73.

23. Саенко Г. М. Фитосанитарный мониторинг основных болезней сои в Краснодарском крае // Масличные культуры. – 2019. – №. 3(179). – С. 106-113.

24. Саенко Г. М., Мустафина М. А. Фитосанитарное обследование сои в Центральном Черноземье // Известия Нижневолжского агроуниверситетского комплекса: Наука и высшее профессиональное образование. – 2021. – №. 2(62). – С. 175-185.

25. Санаров А.Г., Торопова Е.Ю. Эффективность препаратов против семенных фитопатогенов сои // Защита растений от вредных организмов, Краснодар, 21–25 июня 2021 года / Материалы X международной научно-

практической конференции, посвященной 100-летию Кубанского государственного аграрного университета. – Краснодар: Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, 2021. – С. 326-329.

26. Солотчина Г.Ф., Пехтерева Э.Ш. Видовой состав возбудителей бактериозов сои в Приморском крае // Тезисы докладов Всесоюзного симпозиума по бактериальным болезням растений (ред. К.И. Бельтюкова). Киев: Наукова думка, 1966. – С. 51-52.

27. Такимото С. Бактериальная пятнистость сои // Бесогайзаси. – 1921. – № 54. – С. 237-241.

28. Тараканов Р.И. Оценка устойчивости сортов сои к бактериальным болезням на искусственном инфекционном фоне // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2022а. – № 5. – С. 92-107.

29. Тараканов Р.И. Устойчивость сортов сои к бактериальному ожогу и ржаво-бурой бактериальной пятнистости // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022622561 от 19.10.2022б.

30. Тараканов Р., Игнатъева И., Джалилов Ф. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in soybean seeds using PCR assay // Инновационные технологии в сельском хозяйстве: Сборник материалов Международной научно-практической конференции, Орёл, 23–24 марта 2022 года. – Орёл: Всероссийский научно-исследовательский институт селекции плодовых культур. – 2022в. – С. 14.

31. Тараканов, Р.И., Игнатъева И.М., Белошапкина О.О., Чебаненко С.И., Каратаева О.Г., Джалилов Ф.С. Выявление возбудителя бактериального ожога сои *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* в семенах методом ПЦР // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2024а. – № 1. – С. 41-52.

32. Тараканов Р.И., Белошапкина О.О., Чебаненко С.И., Савоськина О.А., Каратаева О.Г., Хоружий Л.И., Джалилов Ф.С.У. Генетическая коллекция штаммов возбудителя бактериального ожога сои *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2024620680 от 13.02.2024. Заявка № 2022622520 от 08.02.2024б.

33. Терещенко Б.А. Семядольный бактериоз сои // Защита растений. – 1977. – №. 9. – С. 18-19.
34. Тишкова А.Г., Золотарева Е.В. Болезни и вредители сои в Хабаровском крае // Защита и карантин растений. – 2017. – №. 5. – С. 27-28.
35. Abdel-Naime W.A., Fahim J.R., Fouad M.A., Kamel M.S. Antibacterial, antifungal, and GC–MS studies of *Melissa officinalis* // South African Journal of Botany. –2019. – V. 124. – P. 228-234.
36. Abeysinghe P.D. Antibacterial activity of some medicinal Mangroves against antibiotic resistant pathogenic bacteria // Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2010. – Vol. 72. – №. 2. – P. 167-172.
37. Abo-Moch F., Mavridis A., Rudolph K. Determination of races of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* occurring in Europe // Journal of Phytopathology. – 1995. – Vol. 143. – P. 1-5.
38. Adams M. Bacteriophages / M. Adams. – StatPearls Publishing, 1959. – P. 620.
39. Adaskaveg J.E., Förster H., Wade M.L. Effectiveness of kasugamycin against *Erwinia amylovora* and its potential use for managing fire blight of pear // Plant Disease. – 2011. – Vol. 95. – № 4. – P. 448-454.
40. Addy H.S., Wahyuni W.S. Nucleic acid and protein profile of bacteriophages that infect *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*, bacterial blight on soybean // Agriculture Science Procedia. – 2016. – Vol. 9. – P. 475–481.
41. Agbavor C., Mirza B.S., Wait A. The effects of phyllosphere bacteria on plant physiology and growth of soybean infected with *Pseudomonas syringae* // Plants. – 2022. – Vol. 7. – №.11. – P. 2634.
42. Ahangaran A., Mohammadi G.M., Habibi M.K., Shahraeen N., Khezri S. Rapid diagnosis of soybean mosaic virus N soybean by tissue-print immunoassay and DIBA in comparison to other serological methods // Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences. – 2006. – Vol. 71. – №. 3. – P. 1207-1212.

43. Akerström S., Lindahl P.B. A convenient method for determination of tetramethylthiuram disulphide // *Acta chemica scandinavica* – 1962. – Vol. 16. – №3. – P. 1206-1211.
44. Allen D.J. An annotated list of diseases of common bean in Eastern and Southern Africa / D.J. Allen. – *Phytopathological papers* 34, CAB International, Wallingford, UK, 1995. – P. 42.
45. Altundag S., Aslim B., Ozturk S. In vitro antimicrobial activities of essential oils from *Origanum minutiflorum* and *Sideritis erytrantha* subsp *erytrantha* on phytopathogenic bacteria // *Journal of essential oil research*. – 2011. – Vol. 23. – №. 1. – P. 4-8.
46. Alvarez E. New Assays for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in soybean seed // *Plant disease*. –1995. – Vol. 79. – №.1. – P. 12.
47. Álvarez-Mejía C., Rodríguez-Ríos D., Hernández-Guzmán G., López-Ramírez V., Valenzuela-Soto H., Marsch R. Characterization of the HrpZ gene from *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* M2 // *Brazilian journal of microbiology* –2015. – Vol. 46. – P. 929–936.
48. Anaele A.O., Bishnoi U.R. Effects of tillage, weed control method and row spacing on soybean yield and certain soil properties // *Soil and tillage research*. – 1992. – Vol. 23. – №. 4. – P. 333-340.
49. Arnold D.L., Lovell H.C., Jackson R.W., Mansfield J.W. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: from ‘has bean’ to supermodel // *Molecular plant pathology*. – 2011. – Vol. 12. – No. 7. – P. 617-627.
50. Arunakumara K.K.I.U., Walpola B.C., Yoon M.H. Alleviation of phytotoxicity of copper on agricultural plants // *Journal of korean society of applied biological chemistry* – 2013. – Vol. 56. – P. 505–517.
51. Ashfield T., Bocian A., Held D., Henk A.D., Marek L.F., Danesh D., Peñuela S., Meksem K., Lightfoot D.A., Young N.D., Shoemaker R.C., Innes R.W. Genetic and physical localization of the soybean Rpg1-b disease resistance gene reveals a complex locus containing several tightly linked families of NBS-LRR genes // *Molecular plant microbe interactions* – 2003. – Vol. 16. – №. 9. – P. 817-826.

52. Aysan Y., Horuz S. Plant pathogenic bacteria control through seed application / Y. Aysan, S. Horuz. – CRC Press, USA, 2015. – P. 332. – ISBN 978-1-4822-4053-5.
53. Baharum S.N., Bunawan H., Ghani M.A., Mustapha W.A.W., Noor N.M. Analysis of the chemical composition of the essential oil of *Polygonum minus* Huds. using two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry (GC-TOF MS) // *Molecules*. – 2010. – Vol. 15. – P. 7006–7015.
54. Balouiri M., Sadiki M., Ibsouda S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review // *Journal of pharmaceutical analysis*. – 2016. – Vol. 6. – No. 2. – P. 71-79.
55. Barak J.D., Gilbertson R.L. Genetic diversity of *Xanthomonas campestris* pv. *vitiensis*, the causal agent of bacterial leafspot of lettuce // *Phytopathology*. – 2003. – Vol. 93. – No. 5. – P. 596-603.
56. Basave G., Rajashekar K., Doddagoudar S. R., Vijaykumar K., Channabasavanna., Ravi A. S. M. V. Influence of seed treatment with fungicides on seed quality of chickpea cv. GBM 2 // *International journal of current microbiology applied science* – 2020. – Vol. 9. – № 1. – 602-609.
57. Basu P.K. In vitro soil temperature tolerance and field overwintering of soybean bacterial blight pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* // *Canadian plant disease survey*. – 1986. – Vol. 66. – P. 15-17.
58. Basu P.K. Predominance of race 4 of the soybean bacterial blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in eastern Ontario // *Canadian plant disease survey* – 1984. – Vol. 64. – P. 37-38.
59. Baysal G.F., Kurowski C., Li R.; Ling K.-S.; Miller S. Developing hygiene protocols against mechanically transmitted pathogens in greenhouse tomato production systems // *Acta horticulturae*. – 2015. – Vol. 1069. – P. 275–280.
60. Benkeblia N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) // *LWT - Food science and technology*. – 2004. – Vol. 37. – №. 2. – P. 263-268.

61. Bereswill S., Bugert P., Völksch B., Ullrich M., Bender C.L., Geider K. Identification and relatedness of coronatine-producing *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR analysis and sequence determination of the amplification products // *Applied and environmental microbiology*. – 1994. – Vol. 60. – №. 8. – P. 2924-2930.
62. Bernkop-Schnürch A., Dünnhaupt S. Chitosan-based drug delivery systems // *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. – 2012. – Vol. 81. – №. 3. – P. 463-469.
63. Birge E.A. Bacterial and bacteriophage genetics – 4th edition – Springer: New York, USA, 2000. – P. 559. – ISBN 978-1-4757-3260-3.
64. Bogatsevska N. Application of vacuum and infiltration method of detecting *Pseudomonas syringae* pathovar *glycinea* Coerper Young et al. in plant tissue // *Rasteniiev"D Nauki*. – 1990. – Vol. 27. – P. 102-105.
65. Bracale M. F., Soares R. M. Resistance of soybean cultivars to bacterial tan spot, caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* // *Book. IX Jornada Acadêmica da Embrapa Soja – Resumos expandidos*. – Londrina, Brasil : Embrapa Soja, 2014. – P. 103.
66. Brooks D.M., Bender C.L., Kunkel B.N. The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana* // *Molecular plant pathology*. – 2005. – Vol. 6. – №. 6. – P. 629-639.
67. Budiman A., Aulifa D., Kusuma A., Sulastri A. Antibacterial and antioxidant activity of black mulberry (*Morus nigra* L.) extract for acne treatment // *Pharmacognosy journal*. – 2017. – Vol. 9. – №. 5. – P. 611-614
68. Bugalia S., Choudhary M., Joshi A., Saharan V. Assessment of Cu- Chitosan nanoparticles for its antibacterial activity against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* // *International journal of current microbiology and applied sciences*. – 2017. – Vol. 6. – P. 1335–1350.
69. Bultreys A. Siderophore Uses in *Pseudomonas syringae* identification / Bultreys A., Gheysen I. // In: Fatmi, M., et al. *Pseudomonas syringae* pathovars and

related pathogens – Identification, epidemiology and genomics – Dordrecht, Netherlands: Springer, 2008. – P. 21–35.

70. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review // *International journal of food microbiology*. – 2004. – Vol. 94. – №. 3. – P. 223-253.

71. Buttner C., McAuliffe O., Ross R.P., Hill C., O'Mahony J., Coffey A. Bacteriophages and bacterial plant diseases // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 34.

72. Calzolari A., and Mazzucchi U. Rilevamento di *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* nel seme dissoia // *Informatore Phytopathologica*. – 1990. – Vol. 2. – P. 47-49.

73. Calzolari A., Tomesani M., Mazzucchi U. Comparison of immunofluorescence staining and indirect isolation for the detection of *Corynebacterium flaccumfaciens* in bean seeds // *EPPO bulletin*. – 1987. – Vol. 17. – P. 157–163.

74. Carlson R.R., Vidaver A.K. Taxonomy of *Corynebacterium* plant pathogens, including a new pathogen of wheat, based on polyacrylamide gel electrophoresis of cellular proteins // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 1982. – Vol. 32. – №. 3. – P. 315-326.

75. Cazorla F.M., Arrebola E., Sesma A., Pérez-García A., Codina J.C., Murillo J., de Vicente A. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* strains isolated from mango is encoded mainly by plasmids // *Phytopathology*. – 2002. – Vol. 92. – №. 8. – P. 909-916.

76. Chase A.B., Arevalo P., Polz M.F., Berlemont R., Martiny J.B.H. Evidence for ecological flexibility in the cosmopolitan genus *Curtobacterium* // *Frontiers in microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1874.

77. Chassagne F., Samarakoon T., Porras G., Lyles J.T., Dettweiler M., Marquez L., Salam A.M., Shabih S., Farrokhi D.R., Quave C.L. A Systematic review of plants with antibacterial activities: a taxonomic and phylogenetic perspective // *Frontiers in pharmacology*. – 2020. – Vol. 11. – P. 586548.

78. Chavarro C.A., Lopez G.C.A., Lenne J.M. Characteristics and pathogenicity of *Corynebacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Dows causal agent of

bacterial wilt of *Zornia* spp. and its effect on production of *Z. glabra* CIAT 7847 and *Phaseolus vulgaris* // *Acta agronomica*. – 1985. – Vol. 35. – P. 64-79.

79. Chen G., Khojasteh M., Taheri-Dehkordi A., Taghavi S.M., Rahimi T., Osdaghi E. Complete genome sequencing provides novel insight into the virulence repertoires and phylogenetic position of dry beans pathogen *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* // *Phytopathology*. – 2021. – Vol. 111. – №. 2. – P. 268-280.

80. Chen J., Mao S., Xu Z., Ding W. Various antibacterial mechanisms of biosynthesized copper oxide nanoparticles against soilborne *Ralstonia solanacearum* // *RSC advances*. – 2019. – Vol. 9. – №. 7. – P. 3788-3799.

81. Chidanandappa N.V.B. Green synthesis of chitosan-based copper nanoparticles and their bio-efficacy against bacterial blight of pomegranate // *International journal of current microbiology and applied science* – 2020. – Vol. 9. – P. 1298–1305.

82. Chincinska I.A. Leaf infiltration in plant science: old method, new possibilities // *Plant methods*. – 2021. – Vol. 17. – P. 83.

83. Chouhan S., Sharma K., Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives // *Medicines*. – 2017. – Vol. 4. – №. 3. – P. 58.

84. Christena L.R., Mangalagowri V., Pradheeba P., Ahmed K.B.A., Shalini B.I.S., Vidyalakshmi M., Anbazhagan V., Subramanian N.S. Copper nanoparticles as an efflux pump inhibitor to tackle drug resistant bacteria // *RSC advances*. – 2015. – Vol. 5. – P. 12899–12909.

85. Civerolo E.L., Keil H.L. Inhibition of bacterial spot of peach foliage by *Xanthomonas pruni* bacteriophage // *Phytopathology*. – 1969. – Vol. 59. – P. 1966–1967.

86. CLSI Document M07-A10. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. approved standard. 10th ed. / Wayne, USA Clinical and laboratory standards institute, 2015. – P. 88.

87. Cobb B.D., Clarkson J.M. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods // *Nucleic acids research*. – 1994. – Vol. 22. – №. 18. – P. 3801-3805.

88. Coerper F. M. Bacterial blight of soybean // Journal of agricultural research – 1919. – Vol. 1. – P. 179-194.
89. Collins M.D., Jones D. Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. Nov // microbiology. – 1983. – Vol. 129. – №. 11. – P. 3545-3548.
90. Copping L.G., Duke S.O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents // Pest management science. – 2007. – Vol. 63. – №. 6. – P. 524-554.
91. Corrêa B.O., Schafer J.T., Moura A.B. Spectrum of biocontrol bacteria to control leaf, root and vascular diseases of dry bean // Biological control. – 2014. – Vol. 72. – P. 71-75.
92. Cross J.E. Kennedy, B.W., Lambert, J.W., Cooper, R.L. Pathogenic races of the bacterial blight pathogen of Soybeans, *Pseudomonas glycinea* // Plant disease reporter. – 1966. – Vol. 50. – P. 557-560.
93. Cross, J. E., B. W. Kennedy. Variability in pathogenicity in *Pseudomonas glycinea* // Phytopathology. – 1964. – Vol. 54. – P. 890-891.
94. Cui H., Chen X., Bai M., Han D., Lin L., Dong M. Multipathway Antibacterial Mechanism of a Nanoparticle-Supported Artemisinin Promoted by Nitrogen Plasma Treatment // ACS applied materials & interfaces. – 2019. – Vol. 11. – №. 50. – P. 47299-47310.
95. Cuong H.N., Tung H.T., Minh N.C., Van Hoa N., Phuong P.T.D. Trung T.S. Antibacterial activity of chitosan from squid pens (*Loligo chinensis*) against *Erwinia carotovora* from soft rot postharvest tomato fruit // Journal of polymer materials – 2017. – Vol. 34. – P. 319–330.
96. Dash S., Kumar M., Pareek N. Enhanced antibacterial potential of berberine via synergism with chitosan nanoparticles // Material today proceedings – 2019. – Vol. 31. – P. 640–645.

97. Demeke T., Ratnayaka I., Holigroski M., Phan A. Assessment of DNA extraction methods for pcr testing of discontinued or unapproved biotech events in single seeds of canola, flax and soybean // Food control. – 2012. – Vol. 24. – P. 44–49.
98. Deuner C.C., Magela R.S., Zacaroni A.B., Figueira A.R., Camera J.N. Sensitivity of the method of obtaining bacterial cells and PCR for detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds // Summa phytopathologica. – 2012. – Vol. 38. – P. 48–53.
99. do Prado F.G., Pagnoncelli M.G.B., de Melo Pereira G.V., Karp S.G., Soccol C.R. Fermented soy products and their potential health benefits: a review // Microorganisms. – 2022. – Vol. 10. – №. 8. – P. 1606.
100. Dowson W.J. On the generic name of the gram-positive bacterial plant pathogens // Transactions of the british mycological society. – 1942. – Vol. 25. – №. 3. – P. 311-314.
101. Du W.-L., Niu S.-S., Xu Y.-L., Xu Z.-R., Fan C.-L. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions // Carbohydrate polymers. – 2009. – Vol. 75. – №. 3. – P. 385-389.
102. Dunleavy J.M. Bacterial tan spot, a new foliar disease of soybeans // Crop science. – 1983. – Vol. 23. – P. 473–476.
103. Dunleavy J.M. Yield losses in soybeans caused by bacterial tan spot // Plant disease. – 1984. – Vol. 68. – №. 1. – P. 774.
104. Dunleavy J.M., Weber C.R., Chamberlain D.W., A source of bacterial blight resistance for soybeans // Iowa academy science proceedings – 1960. – Vol. 67. – P. 120-125.
105. El Hadrami A., Adam L.R., El Hadrami I., Daayf F. Chitosan in plant protection // Marine drugs. – 2010. – Vol. 8. – P. 968–987.
106. Engelhardt M., Lima F., Martins G., Vasques I., Silva A., Oliveira J., Cassa Louzada Dos Reis R., Guilherme L., Marques J. Copper phytotoxicity in agricultural crops cultivated in tropical soils. semin // Ciências agrárias. – 2020. – Vol. 41. – P. 2883.
107. EPPO. Normes OEPP EPPO standards diagnostics diagnostic // EPPO bulletin. – 2011. – Vol. 41. – P. 315-319.

108. Estefani R.C.C., Filho R.J.M., Uesugi C.H. Tratamentos térmico e químico de sementes de feijoeiro: eficiência na erradicação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e efeitos na qualidade fisiológica das sementes // *Fitopatologia brasileira*. – 2007. – Vol. 32. – P. 434–438.
109. Evseev P., Lukianova A., Tarakanov R., Tokmakova A., Shneider M., Ignatov A., Miroshnikov K. *Curtobacterium* spp. and *Curtobacterium flaccumfaciens*: phylogeny, genomics-based taxonomy, pathogenicity, and diagnostics // *Current issues in molecular biology*. – 2022. – Vol. 44. – №. 2. – P. 889-927.
110. FAO. World Food and Agriculture—Statistical yearbook – Rome, Italy: FAO, 2021. – P. 368. ISBN. 978-92-5-134332-6
111. Farhatullah D., Stayton M., Groose R., Khan M. Genetic analysis of race-specificity of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* // *Pakistan journal of botany*. – 2011. – Vol. 43. – P. 7–13.
112. Fatmi M., Walcott R.R., Schaad N.W. Detection of plant-pathogenic bacteria in seed and other planting material, Second Edition. *Bacteriology – Pennsylvania, USA: APS Press*, 2017. – P. 360. – ISBN: 978-0890545393.
113. Fett W.F., Sequeira L. Further characterization of the physiologic races of *Pseudomonas glycinea* // *Canadian journal of botany*. – P. 1981. – Vol. 59. – №. 3. – P. 283-287.
114. Flores J.B., García J.O., Becheleni F.R.C., Espinoza A.V., Wong-Corral F.J., Rueda-Puente E.O. Effect of essential oils in the control of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants // *Biotecnica*. – 2018. – Vol. 20. – №. 3. – P. 96-101.
115. Flores O., Retamales J., Núñez M., León M., Salinas P., Besoain X, Yañez C., Bastías R. Characterization of bacteriophages against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* with potential use as natural antimicrobials in kiwifruit plants // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 29. – Vol. 8. – № 7. – P. 974.
116. Foerster S., Unemo M., Hathaway L.J., Low N., Althaus C.L. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for in vitro evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae* // *BMC microbiology*. – 2016. – Vol. 16. – P. 1–11.

117. França Orlanda J.F., Nascimento A.R. Chemical composition and antibacterial activity of *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) volatile oils, from São Luís, Maranhão, Brazil // *South African journal of botany*. – 2015. – Vol. 99. – P. 103-106.
118. Gardan L., Bollet C., Ghorrah M.A., Grimont F., Grimont P.A.D., DNA relatedness among the pathovar strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. *International Journal of systematic bacteriology*. – 1992. – Vol. 42. – № 4. – P. 606-612.
119. Gardan L., Shafik H., Belouin S., Broch R., Grimont F., Grimont P.A. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov. (ex Sutic and Dowson 1959) // *International journal of systematic bacteriology*. – 1999. – Vol. 49. – P. 469-478.
120. Geng S. Quality-Control Programs for Seedborne Pathogens // *Plant disease*. – 1983. – V. 67. – P. 236.
121. Gnanamanickam S.S., Ward E.W.B. Bacterial blight of soybeans: a new race of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and variations in systemic symptoms // *Canadian journal of plant pathology*. – 1982. – Vol. 4. – P. 73-78.
122. Gonçalves R.M., Balbi-Peña M.I., Soman J.M., Maringoni A.C., Taghouti G., Fischer-Le Saux M., Portier P. Genetic diversity of *Curtobacterium flaccumfaciens* revealed by multilocus sequence analysis // *European journal of plant pathology*. – 2019. – Vol. 154. – P. 189–202.
123. Gonçalves R.M., Schipanski C.A., Kogushi L., Soman J.M., Sakate R.K., Silva Junior T.A.F., Maringoni A.C. Alternative hosts of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, causal agent of bean bacterial wilt // *European journal of plant pathology*. – 2017. – Vol. 148. – P. 357–365.
124. Gonelimali F.D., Lin J., Miao W., Xuan J., Charles F., Chen M., Hatab S.R. Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1639.

125. Goto M., Hikota T., Nakajima M., Takikawa Y., Tsuyumu S. Occurrence and properties of copper-resistance in plant pathogenic bacteria // Japanese journal of phytopathology. – 1994. – Vol. 60. – P. 147–153.
126. Grothues D., Rudolph K. Macrorestriction analysis of plant pathogenic *Pseudomonas* species and pathovars // FEMS microbiology letters. – 1991. – Vol. 79. – №. 1. – P. 83–88.
127. Guimaraes P.M., Palmano S., Smith J.J., Grossi de Sá M.F., Saddler G.S. Development of a PCR test for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* // Antonie van leeuwenhoek. – 2001. – Vol. 80. – №. 1. – P. 1-10.
128. Gull I., Saeed M., Shaukat H., Aslam S.M., Samra Z.Q., Athar A.M. Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria // Annals of clinical microbiology and antimicrobials. – 2012. – Vol. 11. – №. 1. – P. 8.
129. Harding M., Nadworny P., Buziak B., Omar A., Daniels G., Feng J. Improved methods for treatment of phytopathogenic biofilms: metallic compounds as anti-bacterial coatings and fungicide tank-mix partners // Molecules. – 2019. – Vol. 24. – №. 12. – P. 2312.
130. Harris-Baldwin A., Gudmestad N.C. Identification of phytopathogenic coryneform bacteria using the Biolog automated microbial identification system // Plant disease. – 1996. – V. 80. – P. 874–878.
131. Harveson R.M. Managing dry bean bacterial diseases in Nebraska with new copper-alternative chemicals // Plant health progress. – 2019. – Vol. 20. – P. 14–19.
132. Harveson R.M., Schwartz H.F., Mazzucchi U. Bacterial diseases of dry edible beans in the central high plains // Plant health progress. – 2007. – Vol. 8. – №. 1.
133. Harveson R.M., Schwartz H.F., Urrea C.A., Yonts C.D. Bacterial wilt of dry-edible beans in the central high plains of the U.S.: past, present, and future // Plant disease. – 2015. – V. 99. – P. 1665–1677.
134. Harveson R.M., Schwartz H.F., Vidaver A.K., Lambrecht P.A., Otto K.L. New outbreaks of bacterial wilt of dry bean in nebraska observed from field infections // Plant disease. – 2006. – Vol. 90. – №. 5. – P. 681.

135. Hedges F. A bacterial wilt of bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. // *Science*. – 1922. – Vol. 55. – P. 433-434.
136. Heinrich M. The identification of medicinal plants. a handbook of the morphology of botanicals in commerce; applequist, W., Ed.; American Botanical Council – Austin, USA: Univ. Missouri botanical garden Press, 2007. – P. 209. ISBN: 978-0965555517.
137. Holeva M.C., Morán F., Scuderi G., González A., López M.M., Llop P. Development of a real-time PCR method for the specific detection of the novel pear pathogen *Erwinia uzenensis* // *PLoS One*. – 2019. – Vol. 14. – №. 7. – P. e0219487.
138. Holtappels D., Fortuna K., Lavigne R., Wagemans J. The future of phage biocontrol in integrated plant protection for sustainable crop production // *Current opinion in biotechnology*. – 2021. – Vol. 68. – P. 60-71.
139. Hosseini B., Voegelé R.T., Link T.I. Diagnosis of soybean diseases caused by fungal and oomycete pathogens: existing methods and new developments // *Journal of fungi*. – 2023. – Vol. 9. – №. 5. – P. 587.
140. Hrubanova M.B., Ales H., Viktor V., Eliska B., Radka K., Vojtech T. Antimicrobial polyhydroxybutyrate submicron fiber mat loaded with extract of *Hypericum perforatum* // *Journal of plant biotechnology*. – 2022. – Vol. 49. – №. 3. – P. 257-270.
141. Hsieh T.F., Huang H.C., Erickson R.S. Biological control of bacterial wilt of bean using a bacterial endophyte, *Pantoea agglomerans* // *Journal of phytopathology*. – 2005. – Vol. 153. – P. 608–614.
142. Hsieh T.-F., Huang H.-C., Mündel H.-H., Scott R. A rapid indoor technique for screening common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for resistance to bacterial wilt [*Curtobacterium Flaccumfaciens* Pv. *Curtobacterium flaccumfaciens* (Hedges) Collins and Jones] // *Revista mexicana fitopatología*. – 2003. – Vol. 3. – P. 364–369.
143. Huang H.C., Erickson R.S., Balasubramanian P.M., Hsieh T.F., Conner R.L. Resurgence of bacterial wilt of common bean in North America // *Canadian journal of plant pathology*. – 2009. – Vol. 31. – P. 290–300.

144. Huang H.C., Erickson R.S., Yanke L.J., Chelle C.D., Mündel H.-H. First Report of the Purple Variant of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, Causal agent of bacterial wilt of bean, in Canada // *Plant disease*. – 2006. – Vol. 90. – №. 9. – P. 1262.
145. Huang J., Yao C., Sun Y., Ji Q., Deng X. Virulence-related regulatory network of *Pseudomonas syringae* // *Computational and structural biotechnology journal*. – 2022. – Vol. 20. – P. 6259-6270.
146. Huynh T.V., Dahlbeck D., Staskawicz B.J. Bacterial blight of soybean: regulation of a pathogen gene determining host cultivar specificity // *Science*. – 1989. – Vol. 245. – №. 4924. – P. 1374-1377.
147. Ignjatov M., Milošević M., Nikolić Z., Vujaković M., Petrović D. Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* isolates from Vojvodina // *Phytopathology polonica*. – 2007. – Vol. 45. – P. 43–54.
148. Ignjatov M., Vidić M., Milošević M., Balaž J., Petrović D., Nikolić Z., Vujaković M. Race Identification of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* on commercial soybean varieties in Serbia // *Zaštita bilja*. – 2008. – Vol. 59. – P. 59–67.
149. Islam M., Masum S., Rayhan K., Haque Z. Antibacterial activity of crab-chitosan against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* // *Journal of advanced science research*. – 2011. – Vol. 2. – P. 63–66.
150. ISTA. International rules for seed testing // *Seed science technology*. – 1999. Vol. 27. – P. 178.
151. Jagtap G. P., Dhopte S.B., Dey Utpal. Survey, surveillance and cultural characteristics of bacterial blight of soybean // *African journal of agricultural research*. – 2012. – Vol. 7. – №. 32. – P. 4559-4563.
152. Javanmard A., Asadzadeh N., Sarhadi F. DNA Polymorphism of bovine pituitary-specific transcription factor and leptin gene between iranian *bos indicus* and *bos taurus* cattle // *American journal of agricultural and biological sciences*. – 2010. – Vol. 5. – №. 3. – P. 282-285.
153. Johnson A.G., Coerper F.M. A bacterial blight of soybean // *Phytopathology*. – 1917. – Vol. 7. – P. 65.

154. Jones L.A., Saha S., Collmer A., Smart C.D., Lindeberg M. Genome-assisted development of a diagnostic protocol for distinguishing high virulence *Pseudomonas syringae* pv. tomato strains // *Plant disease*. – 2015. – Vol. 99. – №. 4. – P. 527-534.
155. Júnior T.A.F.S., Negrão D.R., Itako A.T., Soman J.M., Maringoni A.C. Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in soil and bean crop debris // *Journal of plant pathology*. – 2012. – Vol. 94. – №. 2. – P. 331-337.
156. Kaars Sijpesteijn A., Janssen M.J. On the mode of action of dialkyldithiocarbamates on moulds and bacteria // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 1959. – Vol. 25. – P. 422–438.
157. Katoh K., Standley D.M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability // *Molecular biology and evolution*. – 2013. – Vol. 30. – №. 4. – P. 772-780.
158. Kazantseva O.A., Buzikov R.M., Pilipchuk T.A., Valentovich L.N., Kazantsev A.N., Kalamiyets E.I., Shadrin A.M. The Bacteriophage Pf-10—a component of the biopesticide “Multiphage” used to control agricultural crop diseases caused by *Pseudomonas syringae* // *Viruses*. – 2021. – Vol. 14. – №. 1. – P. 42.
159. Keen N.T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions // *Annual review of genetics*. – 1990. – Vol. 24. – P. 447-463.
160. Kennedy, B. W., S. M. Alcorn. Estimates of U.S. crop losses to procaryote plant pathogens // *Plant disease*. – 1980. – Vol. 64. – P. 674-676.
161. Khameneh B., Iranshahy M., Soheili V., Fazly Bazzaz B.S. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint // *Antimicrobial resistant infections control*. – 2019. – Vol. 8. – P. 118.
162. Khanjari A. Bahonar A. Noori N. Siahkalmahaleh M.R. Rezaeigolestani M. Asgarian Z. Khanjari J. In vitro antibacterial activity of *Pimpinella anisum* essential oil and its influence on microbial, chemical, and sensorial properties of minced beef during refrigerated storage // *Journal of food safety*. – 2019. – Vol. 39. – P. e12626.
163. Kharbanda P. D., Bernier C. C. Effectiveness of seed and foliar application of fungicides to control ascochyta blight of fababeans // *Canadian journal of plant science*. – 1979. – Vol. 59. – P. 661-666.

164. Kimmelshue C., Goggi A.S., Cademartiri R. The use of biological seed coatings based on bacteriophages and polymers against *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* in maize seeds // *Scientific reports*. – 2019. – Vol. 9. – P. 17950.
165. Kiss T., Cank K.B., Orbán-Gyapai O., Liktor-Busa E., Zomborszki Z.P., Rutkowska S., Pučka I., Németh A., Csupor D. Phytochemical and pharmacological investigation of *Spiraea chamaedryfolia*: a contribution to the chemotaxonomy of *Spiraea* genus // *BMC research notes*. – 2017. – Vol. 10. – P. 762.
166. Klement Z. Two new bacteriophages for bacterial pathogens of the bean // *Nature*. – 1957. – Vol. 180. – P. 41–42.
167. Koffi-Nevry R., Kouassi K.C., Nanga Z.Y., Koussémon M., Loukou G.Y. Antibacterial activity of two bell pepper extracts: *Capsicum annuum* L. and *Capsicum frutescens* // *International journal of food properties*. – 2012. – Vol. 15. – P. 961–971.
168. Kong M., Chen X.G., Xing K., Park H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state-of-the-art review // *International journal of food microbiology*. – 2010. – Vol. 144. – №. 1. – P. 51-63.
169. Konovalova M., Shagdarova B., Zubov V., Svirshchevskaya E. Express analysis of chitosan and its derivatives by gel electrophoresis // *Programmed chemical applied*. – 2019. – Vol. 24. – P. 84–95.
170. Krasnova M.V. The effect of some physical factors on the causal agents of bacterioses in soybean seeds // *Journal microbiology*. – 1963. – Vol. 25. – P. 50-52.
171. Kropinski A.M., Prangishvili D., Lavigne R. Position paper: the creation of a rational scheme for the nomenclature of viruses of Bacteria and Archaea // *Environmental microbiology*. – 2009. – Vol. 11. – №. 11. – P. 2775-2777.
172. Kucharek T.B. A bacterial leafspot of soybean caused by a new race of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* // *Soil and crop science society of Florida*. – 1985. – Vol. 44. – P. 174—177.
173. Kůdela V., Šafránková I., Krejzar V., Korba J. First report of *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* on oleander in the Czech Republic // *Plant protection science*. – 2005. – Vol. 41. – №. 1. – P. 33-37.

174. Kumagai H., Kawai Yu., Sawano R., Kurihara H., Yamazaki K., Inoue N. Antimicrobial substances from rhizomes of the giant knotweed *Polygonum sachalinense* against the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp // *Piscicida zeitschrift für naturforschung*. – 2005. – Vol. 60. – №.1-2. – P. 39-44.
175. Kumar N.V., Basavegowda V.R., Murthy A.N., Lokesh S. Synthesis and characterization of copper-chitosan based nanofungicide and its induced defense responses in *Fusarium wilt* of banana // *Inorganic and nano-metal chemistry*. – 2022. – P. 1–9.
176. Kumar S.S., Akram, A., Ahmed T.S.F., Jaabir M.S.M. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of the ethanolic extract of *Acorus calamus* rhizome // *Oriental journal of chemistry*. – 2010. – Vol. 26. – P. 223–227.
177. Lamichhane J.R., Osdaghi E., Behlau F., Köhl J., Jones J.B., Aubertot J.N. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review // *Agronomy for sustainable development*. – 2018b. – Vol. 38. – P. 28.
178. Lapis D.B. The role of spider mites on infection of soybean with *Pseudomonas glycinea* Coerper // *Philippine phytopathology*. – 1972. – Vol. 8. – P. 66-71.
179. Laurence J.A. Effects of ozone on infection of soybean by *Pseudomonas glycinea* // *Phytopathology*. – 1978. – Vol. 68. – №. 3. – P. 441.
180. Leben C. Bacterial blight of soybean: seedling disease control // *Phytopathology*. – 1975. – Vol. 65. – №. 8. – P. 844-847.
181. Lehman S.G. Studies on the bacterial pustule disease of soybean // *Phytopathology*. – 1929. – Vol. 19. – № 1.– P. 96.
182. Lelliott R.A., Billing E., Hayword A.C. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonads* // *Journal of applied bacteriology*. – 1966. – Vol. 29. – P. 470–489.
183. Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation // *Nucleic acids research*. – 2021. – Vol. 49. – №. 1. – P. W293-W296.

184. Li L., Yuan L., Shi Y., Xie X., Chai A., Wang Q., Li B. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas amygdali* pv. *lachrymans* NM002: Insights into its potential virulence genes and putative invasion determinants // *Genomics*. – 2019. – Vol. 111. – №. 6. – P. 1493-1503.
185. Liu Y., Xu Y., Song Q., Wang F., Sun L., Liu L., Yang X., Yi J., Bao Y., Ma H. Anti-Biofilm Activities from *Bergenia crassifolia* leaves against *Streptococcus mutans* // *Frontiers in microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1738.
186. Lo Cantore P., Shanmugaiah V., Iacobellis N.S. Antibacterial activity of essential oil components and their potential use in seed disinfection // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2009. – Vol. 57. – №. 20. – P. 9454-9461.
187. Long M., Barton-Willis P., Staskawicz B.J., Dahlbeck D., Keen N.T. Further studies on the relationship between glyceollin accumulation and the resistance of soybean leaves to *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* // *Phytopathology*. – 1985. – Vol. 75. – P. 235-239.
188. Lukianova A.A., Evseev P.V., Stakheev A.A., Kotova I.B., Zavriev S.K., Ignatov A.N., Miroshnikov K.A. Development of qPCR detection assay for potato pathogen *Pectobacterium atrosepticum* based on a unique target sequence // *Plants*. – 2021. – Vol. 10. – №. 2. – P. 355.
189. Lukianova A.A., Shneider M.M., Evseev P.V., Shpirt A.M., Bugaeva E.N., Kabanova A.P., Obratsova E.A., Miroshnikov K.K., Senchenkova S.N., Shashkov A.S., Toschakov S.V., Knirel Y.A., Ignatov A.N., Miroshnikov K.A. Morphologically different *Pectobacterium brasiliense* bacteriophages PP99 and PP101: deacetylation of O-polysaccharide by the tail spike protein of Phage PP99 accompanies the infection // *Frontiers in microbiology*. – 2019. – Vol. 10. – P. 3147.
190. Ma Z., Garrido-Maestu A., Jeong K.C. Application, mode of action, and in vivo activity of chitosan and its micro- and nanoparticles as antimicrobial agents: A review // *Carbohydrate polymers*. – 2017. – Vol. 176. – P. 257-265.
191. Madden L.V., Hughes G., van den Bosch F. The study of plant disease epidemics. In the study of plant disease epidemics – St. Paul, USA: APS Press, 2007. – P. 421. ISBN: 978-0890543542.

192. Maringoni A.C., Camara R.C. *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens* detection in bean seeds using a semi-selective culture medium // *Brazilian journal of microbiology*. – 2006. – 37. – P. 451–455.
193. Maringoni A.C., Camara R.C., Souza V.L. Semi-selective culture medium for *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens* isolation from bean seeds // *Seed science and technology*. – 2006b. – Vol. 34. – P. 117–124.
194. Maringoni A.C., Souza E.L.C., de Reação de cultivares de soja a isolado de *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens*, proveniente de feijoeiro // *Pesquisa agropecuária brasileira*. – 2003. – V. 38. – P. 777–781.
195. Maringoni, A.C. Comportamento de cultivares de feijoeiro à murcha-de-curtobacterium [Behaviour of dry bean to bacterial wilt] // *Fitopatologia brasileira*. – 2002. – Vol. 23. – P. 157–162.
196. Marques ASdA., Corbière R., Gardan L. Multiphasic approach for the identification of the different classification levels of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* // *European journal of plant pathology*. – 2000. – Vol. 106. – P. 715–734.
197. Martins S.J., Medeiros, F.H.V., de Souza R.M., Faria A.F., Cancellier E.L., Silveira H.R. de O., Rezende M.L.V., Guilherme L.R.G. Common bean growth and health promoted by Rhizobacteria and the contribution of magnesium to the observed responses // *Applied soil ecology*. – 2015. – Vol. 87. – P. 49–55.
198. Mbega E.R., Mortensen C.N., Mabagala R.B., Wulff E.G. The effect of plant extracts as seed treatments to control bacterial leaf spot of tomato in Tanzania // *Journal of genetics and plant pathology*. – 2012. – Vol. 78. – P. 277–286.
199. Mcclung L.S. *Bergey's manual of systematic bacteriology* // *International journal of systematic bacteriology*. – 1984. – p. 408.
200. McDonald J.G., Wong E. High diversity in *Curtobacterium flaccumfasciens* pv. *flaccumfasciens* characterized by serology and rep-PCR genomic fingerprinting // *Canadian journal of plant pathology*. – 2000. – Vol. 22. – P. 1–6.
201. McGee D.C. *Soybean diseases: a reference source for seed technologists* – St Paul, USA: APS Press, 1992. – P. 151. ISBN: 978-0890541418.

202. Mitchell R.E., Hale C.N., Shanks J.C. Toxin production as a distinguishing character for some *Pseudomonas syringae* pathovars: *P. syringae glycinea* versus *P. syringae phaseolicola* // *Physiological plant pathology*. – 1982. – Vol. 20. – P. 91-97.
203. Mizuno A., Kawai A. Studies on the diagnosis of foreign bacterial diseases of quarantine significance, VI: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* // *Research bulletin of the plant protection service japan*. – 1993. – Vol. 29. – P. 27–36.
204. Mohan S.K. An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed // *Phytopathology*. – 1987. – Vol. 77. – P. 1390.
205. Monteil C.L., Yahara K., Studholme D.J., Mageiros L., Méric G., Swingle B., Morris C.E., Vinatzer B.A., Sheppard S.K. Population-genomic insights into emergence, crop adaptation and dissemination of *Pseudomonas syringae* pathogens // *Microbial genomics*. – 2016. – Vol. 2. – №. 10. – P. e000089.
206. Moore E.S. D’Herelle’s bacteriophage in relation to plant parasites // *South africa journal of science*. – 1926. – Vol. 23. – P. 306.
207. Moriwaki J., Mizuno A., Sato M., Kadota I., Nishiyama K. Difference in production of coronatine on potato tuber tissue and in liquid culture by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* // *Japanese journal of phytopathology (Annals of the phytopathological society of Japan)*. – 1996. – Vol. 62. – № 5. – P. 544-547.
208. Moslemi H.R., Hoseinzadeh H., Badouei M.A., Kafshdouzan K., Fard R.M.N. Antimicrobial activity of *Artemisia absinthium* against surgical wounds infected by *Staphylococcus aureus* in a rat model // *Indian journal of microbiology*. – 2012. – Vol. 52. – №. 4. – P. 601-604.
209. Müller M.A., Stammler G., May De Mio L.L. Multiple resistance to DMI, QoI and SDHI Fungicides in field isolates of *Phakopsora pachyrhizi* // *Crop protection*. – 2021. – Vol. 145. – P. 105618.
210. Murthy N.B.K., Raghu K. Effect of thiram on plant growth and rhizosphere microflora of barley and nodulation in cowpea // *Plant soil*. – 1976. – Vol. 44. – P. 491–493.

211. Na S.-I., Kim Y.O., Yoon S.-H., Ha S.-M., Baek I., Chun J. UBCG: Up-to-date bacterial core gene set and pipeline for phylogenomic tree reconstruction // *Journal of microbiology*. – 2018. – Vol. 56. – No. 4. – P. 280-285.
212. Nabavi S.F., Di Lorenzo A., Izadi M., Sobarzo-Sánchez E., Daglia M., Nabavi S.M. Antibacterial effects of Cinnamon: from farm to food, cosmetic and pharmaceutical industries // *Nutrients*. – 2015. – Vol. 7. – № 9. – P. 7729-7748.
213. Nakata. Бактериальная пятнистость сои (*Bacterium glycineum* Coerper var. *japonicum* (Takimoto)). Альбом болезней растений (на японском языке). 1934-1950.
214. Nakayinga R., Makumi A., Tumuhaise V., Tinzaara W. *Xanthomonas* bacteriophages: a review of their biology and biocontrol applications in agriculture // *BMC microbiology*. – 2021. – Vol. 25. – № 1. – P. 291.
215. Nalini S., Parthasarathi R. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production from *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its biocontrol efficacy against *Fusarium* wilt of eggplant // *Annals of agrarian science*. – 2018. – Vol. 16. – P. 108–115.
216. Nascimento D.M., Oliveira L.R., Melo L.L., Silva J.C., Soman J.M., Ribeiro-Junior M.R., Sartori M.M.P., Silva Júnior T.A.F., Maringoni A.C. Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in the phyllosphere and rhizosphere of crops // *European journal of plant pathology*. – 2020. – Vol. 160. P. – 161–172.
217. Nei M. Genetic distance between populations // *The American Naturalist*. – 1972. – Vol. 106(949). – № 32. – P. 283-292.
218. Ngegba P.M., Cui G., Khalid M.Z., Zhong G. Use of botanical pesticides in agriculture as an alternative to synthetic pesticides // *Agriculture*. – 2022. – Vol. 12. – P. 600.
219. Nguyen L.-T. Schmidt H.A., von Haeseler A. Minh B.Q. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies // *Molecular biology evolution*. – 2015. – Vol. 32. – P. 268–274.
220. Nicholson J.F., J.B. Sinclair. *Pseudomonas glycinea* inhibits germination of soybean seed // *Phytopathology*. – 1971. – Vol. 61. – P. 904.

221. Nickell C.D., Lim S.M., Eathington S., Warsaw R., Registration of soybean germplasm line LL89-605, resistant to brown stem rot and bacterial blight // *Crop science*. – 1994. – Vol. 34. – Vol. 4. – P. 1134.
222. No H.K., Young Park N., Ho Lee S., Meyers S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights // *International journal of food microbiology*. – 2002. – Vol. 74. – P. 65–72.
223. Orynbayev A.T., Dzhalilov F.S.U., Ignatov A.N. Improved efficacy of formulated bacteriophage in control of black rot caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage seedlings // *Archives phytopathology and plant protection*. – 2020. – V. 53. – P. 379–394.
224. Osdaghi E., Sardrood P.B., Bavi M., Akbari Oghaz N., Kimiaei S., Hadian S. First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* causing cowpea bacterial wilt in Iran // *Journal of phytopathology*. – 2015a. – Vol. 163. – P. 653–656.
225. Osdaghi E., Taghavi S.M., Fazliarab A., Elahifard E., Lamichhane J.L. Characterization, geographic distribution and host range of *Curtobacterium flaccumfaciens*: an emerging bacterial pathogen in Iran // *Crop protection*. – 2015b. – Vol. 78. – P. 185-192.
226. Osdaghi E., Taghavi S.M., Hamzehzarghani H., Fazliarab A., Harveson R.M., Lamichhane J.R. Occurrence and characterization of a new red-pigmented variant of *Curtobacterium flaccumfaciens*, the causal agent of bacterial wilt of edible dry beans in Iran // *European journal of plant pathology*. – 2016. – Vol. 146. – P. 129–145.
227. Osdaghi E., Taghavi S.M., Hamzehzarghani H., Fazliarab A., Harveson R.M., Tegli S., Lamichhane J.R. Epiphytic *Curtobacterium flaccumfaciens* strains isolated from symptomless solanaceous vegetables are pathogenic on leguminous but not on solanaceous plants // *Plant pathology*. – 2018. – 67. – 388-398.
228. Osdaghi E., Taghouti G., Dutrieux C., Taghavi S.M., Fazliarab A., Briand M., Le Saux M.F., Portier P., Jacques M.-A. Whole genome resources of 17 *Curtobacterium flaccumfaciens* strains including pathotypes of *C. flaccumfaciens* pv. *betae*, *C. flaccumfaciens* pv. *oortii*, and *C. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae* // *Molecular plant-microbe interactions*. – 2022. – Vol. 35. – №. 4. – P. 352-356.

229. Osdaghi E., Young A.J., Harveson R.M. Bacterial wilt of dry beans caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: A new threat from an old enemy // *Molecular plant pathology*. – 2020. – Vol. 21. – №. 5. – P. 605-621.
230. Pacumbaba R.P. Outbreak of bacterial blight of soybean at Alabama A&M soybean research field plots and vicinity in 1986 // *Plant disease*. – 1987. – Vol. 71. – P. 557.
231. Palacio-Bielsa A., Cambra M.A., López M. PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols 1989–2007 // *Journal of plant pathology*. – 2009. – Vol. 91. – P. 249-297.
232. Pandey A.K., Kumar P., Singh P., Tripathi N.N., Bajpai V.K. Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives // *Frontiers in microbiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 2161.
233. Park E.W., Lim, S. M. Effects of bacterial blight on soybean yield // *Plant disease*. – 1986. – Vol. 70. – P. 214-217.
234. Park J.C., Song W.Y., Kim H.M. Occurrence of bacterial soft rot of soybean sprout caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* // *The Plant pathology journal*. – 1997. – Vol. 13. – P. 13–17.
235. Patra J.K., Kim E.S., Oh K., Kim H.-J., Kim Y., Baek K.-H. Antibacterial effect of crude extract and metabolites of *Phytolacca americana* on pathogens responsible for periodontal inflammatory diseases and dental caries // *BMC complementary and alternative medicine*. – 2014. – Vol. 14. – P. 343.
236. Patrick Z.A. The antibiotic activity of soil microorganisms as related to bacterial plant pathogens // *Canadian journal of botany*. – 1954. – Vol. 32. – P. 705-735.
237. Payne S.M. Detection, isolation, and characterization of siderophores / S.M. Payne // In: *Methods in enzymology* – New York, USA: Academic Press, Inc., 1994. – P. 329–344.
238. Pelludat C., Duffy B., Frey J.E. Design and development of a DNA microarray for rapid identification of multiple European quarantine phytopathogenic bacteria // *European journal of plant pathology*. – 2009. – P. 413–423.

239. Pethybridge S.J., Nelson S.C. Leaf Doctor: A new portable application for quantifying plant disease severity // *Plant disease*. – 2015. – Vol. 99. – P. 1310–1316.
240. Pilik R.I., Tesic S., Ignatov A.N., Tarakanov R.I., Dorofeeva L.V., Lukianova A.A., Evseev P.V., Dzhalilov F.S.-U., Miroshnikov K.A. First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* causing bacterial wilt and blight on sunflower in Russia // *Plant disease*. – 2023. – V. 107. – №. 5. – P. 1621.
241. Popović T., Jelušić A., Dimkić I., Stanković S., Poštić D., Aleksić G., Veljović Jovanović S. Molecular characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *coriandricola* and biochemical changes attributable to the pathological response on its hosts carrot, parsley, and parsnip // *Plant disease*. – 2019. – Vol. 103. – №. 12. – P. 3072–3082.
242. Price T., Purvis M., Pruitt H. A Quantifiable disease severity rating scale for frogeye leaf spot of soybean // *Plant health progress*. – 2016. – Vol. – №. 17. – P. 27–29.
243. Prom L.K., Venette J.R. Races of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* on commercial soybean in eastern North dakota // *Plant disease*. – 1997. – Vol. 81. – №. 5. – P. 541–544.
244. Puia J.D., Ferreira M.G.D.B., Hoshino A.T., Borsato L.C., Canteri M.G., Vigo S.C. Occurrence of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in the state of Paraná and its pathogenicity in beans // *European journal of plant pathology*. – 2021a. – Vol. 159. – P. 627–636.
245. Puia J.D., Murari R.R., Borsato L.C., Sugahara V.H., da Silva M.G., Canteri M.G., Vigo S.C. Protocol for detecting *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in the leaves of infected bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) // *Acta scientiarum. Agronomy* – 2021b. – Vol. 43. – №1. – P. e51031.
246. Qi L., Xu Z., Jiang X., Hu C., Zou X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles // *Carbohydrate research*. – 2004. – Vol. 339. – №. 16. – P. 2693–2700.
247. Qi M., Wang D., Bradley C.A., Zhao Y. Genome sequence analyses of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and subtractive hybridization-based comparative genomics with nine pseudomonads // *PloS One*. – 2011. – Vol. 6. – №. 1. – P. e16451.

248. Radušienė J., Judžentienė A., Pečiulytė D., Janulis V. Essential oil composition and antimicrobial assay of *Acorus calamus* leaves from different wild populations // *Plant genetic resources*. – 2007. – Vol. 5. – P. 37–44.
249. Rahi Y.J., Turco S., Taratufolo M.C. Genetic diversity and population structure of *Pseudomonas savastanoi*, an endemic pathogen of the Mediterranean area, revealed up to strain level by the MLVA assay // *Journal of plant pathology*. 2020. – Vol. 102. – P. 1051–1064.
250. Rava C.A. Patogenicidade de isolamentos de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* // *Pesquisa agropecuária brasileira*. – 1984. – Vol. 19. – P. 445-448.
251. Reichling J., Schnitzler P., Suschke U., Saller R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview // *CMR*. – 2009. – Vol. 16. – P. 79–90.
252. Ren G., Hu D., Cheng E.W.C., Vargas-Reus M.A., Reip P., Allaker R.P. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications // *International journal of antimicrobial agents*. – 2009. – Vol. 33. – №. 6. – P. 587-590.
253. Romanazzi G., Feliziani E., Sivakumar D. Chitosan, a biopolymer with Triple action on postharvest decay of fruit and vegetables: eliciting, antimicrobial and film-forming properties // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2745.
254. Rueden C.T., Schindelin J., Hiner M.C., DeZonia B.E., Walter A.E., Arena E.T., Eliceiri K.W. ImageJ2: imagej for the next generation of scientific image data // *BMC bioinformatics*. – 2017. – Vol. 18. – №. 1. – P. 529.
255. Ryley M. Integrated management of foliar pathogens of mungbean in Australia / M. Ryley, C. Douglas, M. Ryan, J. Tatnell, W. Martin, K. King // *Proceedings of the 1st Australian summer grains conference, Gold Coast, Australia, 21–24 June, 2010*. – P. 1–9.
256. Rzhetsky A., Nei M. A Simple method for estimating and testing minimum-evolution trees // *Molecular biology and evolution*. – 1991. – Vol. 9. – P. 945-967.
257. Salah Eddin K., Marimuthu T., Ladhalakshmi D., Rabindran R., Velazhahan R. A simple inoculation technique for evaluation of cotton genotypes for resistance to

bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* // Zeitschrift für pflanzenkrankheiten und pflanzenschutz. – 2005. – Vol. 112. – №. 4. – P. 321-328.

258. Samaras A., Nikolaidis M., Antequera-Gómez M.L., Cámara-Almirón J., Romero D., Moschakis T., Amoutzias G.D., Karaoglanidis G.S. Whole Genome Sequencing and Root Colonization Studies Reveal Novel Insights in the Biocontrol Potential and growth promotion by *Bacillus subtilis* MBI 600 on cucumber // Frontiers in microbiology. – 2020. – Vol. 11. – P. 600393.

259. Sammer U.F., Reiher K. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean in germany—a threat for farming // Journal of phytopathology. – 2012. – Vol. 160. – №. 6. – P. 314–316.

260. Sarkar S.F., Guttman D.S. Evolution of the core genome of *Pseudomonas syringae*, a highly clonal, endemic plant pathogen // Applied and environmental microbiology. – 2004. – Vol. 70. – №. 4. – P. 1999.

261. Sathiyamurthi Dr.N., Rengasamy P. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production from *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its biocontrol efficacy against *Fusarium wilt* of eggplant // Annals of agrarian science. – 2017. – Vol. 16. – № 2. – P. 108-115.

262. Satish S., Raveesha K.A., Janardhana G.R. Antibacterial activity of plant extracts on phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pathovars // Lett. appl. microbiol. – 1999. – Vol. 28. – P. 145–147.

263. Sato M., Watanabe K., Yazawa M., Takikawa Y., Nishiyama K. Detection of new ethylene-producing bacteria, *Pseudomonas syringae* pvs. *cannabina* and *sesami*, by PCR amplification of genes for the ethylene-forming enzyme // Phytopathology. – 1997. – Vol. 87. – №. 12. – P. 1192-1196.

264. Schuster M.L. Relation of root-knot nematodes and irrigation water to the incidence and dissemination of bacterial wilt of bean. Plant disease reporter. – 1959. – Vol. 43. – P. 27–32.

265. Schuster M.L., Christiansen D.W. An orange-colored strain of *Corynebacterium flaccumfaciens* causing bean wilt // Phytopathology. – 1957. – Vol. 47. – P. 51–53.

266. Schuster M.L., Sayre R.M. A coryneform bacterium induces purple-coloured seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and other Leguminosae // *Phytopathology*. – 1967. – Vol. 57. – P. 1064–1066.

267. Schuster M.L., Vidaver A.K., Mandel M. A purple pigment producing bean wilt bacterium, *Corynebacterium flaccumfaciens* var. *violaceum* n. var // *Canadian journal of microbiology*. – 1968. – Vol. 14. – P. 423-427.

268. Schwartz H.F. Dry Bean Bacterial Wilt. High Plains IPM Guide, a cooperative effort of the University of Wyoming, University of Nebraska, Colorado State University and Montana State University – Nebraska, USA: University of Nebraska. 2007. – P. 135.

269. Shagdarova B.T., Ilyina A.V., Lopatin S.A., Kartashov M.I., Arslanova L.R., Dzhavakhiya V.G., Varlamov V.P. Study of the protective activity of chitosan hydrolyzate against *Septoria* leaf blotch of wheat and brown spot of tobacco // *Applied biochemistry and microbiology*. – 2018. – Vol. 54. – P. 71–75.

270. Sharma K.P. Inheritance of resistance to bacterial blight of soybean caused by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* // *Journal of the institute of agriculture and animal science*. – 1988. – Vol. 9. – P. 45-49.

271. Shende S., Rathod D., Gade A., Rai M. Biogenic copper nanoparticles promote the growth of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.) // *IET nanobiotechnology*. – 2017. – Vol. 11. – №. 7. – P. 773-781.

272. Shine M.B., Fu D.-Q., Kachroo A. Airbrush infiltration method for *Pseudomonas syringae* infection assays in soybean // *Bio-protocol*. – 2015. – Vol. 5. – P. e1427.

273. Sibiya M., Sumbwanyambe M. An Algorithm for severity estimation of plant leaf diseases by the use of colour threshold image segmentation and fuzzy logic inference: a proposed algorithm to update a “Leaf Doctor” application // *AgriEngineering*. – 2019. – Vol. 1. – P. 15.

274. Simonetti G., Pucci N., Brasili E., Valletta A., Sammarco I., Carnevale E., Pasqua G., Loreti S. In vitro antimicrobial activity of plant extracts against *Pseudomonas*

syringae pv. *actinidiae* causal agent of bacterial canker in kiwifruit // *Plant biosystematics*. – 2020. – Vol. 154. – P. 100–106.

275. Sinclair J.B. *Compendium of soybean diseases*, Second edition – St Paul, USA: APS Press, 1982. – P. 104. ISBN: 978-0890540435.

276. Sinegovskaya V.T. Scientific provision of an effective development of soybean breeding and seed production in the Russian far east // *Vavilovskii zhurnal genet selektsii*. – 2021. – Vol. 25. – №. 4. – P. 374-380.

277. Singh B.K., Delgado-Baquerizo M., Egidi E. Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward // *Nature review microbiology*. – 2023. – Vol. 21. – P. 640–656.

278. Soares R.M., Fantinato G.G.P., Darben L.M., Marcelino-Guimarães F.C., Seixas C.D.S., Carneiro G.E.D.S. First Report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean in Brazil // *Tropical plant pathology*. – 2013. – Vol. 38. – P. 452–454.

279. Soltani N., Dille J., Burke I., Everman W., VanGessel M., Davis V., Sikkema P. Perspectives on potential soybean yield losses from weeds in North America // *Weed technology*. – 2017. – Vol. 31. – P. 148-154.

280. Sotelo J.P., Oddino C., Giordano D.F., Carezzano M.E., Oliva M.D.L.M. Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on soybeans seeds infected with *Pseudomonas syringae* // *Physiological molecular plant pathology*. – 2021. – Vol. 116. – P. 101735.

281. Stampoulis D., Sinha S.K., White J.C. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants // *Environmental science & technology*. – 2009. – Vol. 43. – №. 24. – P. 9473-9479.

282. Sultana H., Seo D., Choi N.-R., Kim Y.-S., Manjula P., Bhuiyan M., Heo K.-N., Lee J.-H. Genetic Diversity Analyses of Asian Duck Populations using 24 Microsatellite Markers // *Korean Journal of Poultry Science*. – 2017. – Vol. 44. – P. 75-81.

283. Sup C.Y., Hean Y.Y. Studies on bacterial diseases of soybean // *Korean journal of applied entomology*. – 1977. – Vol. 16. – №. 1. – P. 47–53.

284. Suresh G. Borkar. Laboratory techniques in plant bacteriology – 1st Edition / Suresh G. Borkar. – CRC Press, USA, 2021. – P. 342. – ISBN 9781032096001.
285. Suryadi, Y., Machmud M. Deteksi *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (PSG) menggunakan antibodipoliklonal dan ncm-elisa // *Berita biologi*. – 2006. – Vol. 8. – №. 1. – P. 45–51.
286. Susianto G., Farid M.M., Dhany N.R., Addy H.S. Host range for bacteriophages that infect bacterial blight pathogen on soybean // *Procedia environmental science*. – 2014. – Vol. 20. – P. 760–766.
287. Svircev A., Roach D., Castle A. Framing the future with bacteriophages in agriculture // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10. – №. 5. – P. 218.
288. Swati C.M.K., Joshi A., Saharan V. Assessment of Cu-chitosan nanoparticles for its antibacterial activity against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* // *International journal of current microbiology. appl. sci.* – 2017. – Vol. 6. – P. 1335–1350.
289. Swati J.A. Cu-chitosan nanoparticle induced plant growth and disease resistance efficiency of soybean [*Glycine max* (L.)] // *Legume research*. – 2022. – Vol. 1. – P. 6.
290. Tamaki S., Dahlbeck D., Staskawicz B., Keen N. T. Characterization and expression of two avirulence genes cloned from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* // *Journal of bacteriology*. – 1988. – Vol. 170. – P. 4846-4854.
291. Tarakanov R., Shagdarova B., Varlamov V., Dzhililov F. Biocidal and resistance-inducing effects of chitosan on phytopathogens // *E3S Web Conferences*. – 2021. – Vol. 254. – P. 05007.
292. Tarakanov R.I., Lukianova A.A., Evseev P.V., Toshchakov S.V., Kulikov E.E., Ignatov A.N., Miroshnikov K.A., Dzhililov F.S.-U. Bacteriophage control of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in soybean // *Plants*. – 2022a. – Vol. 11. – P. 938.
293. Tarakanov R.I., Lukianova A.A., Evseev P.V., Pilik R.I., Tokmakova A.D., Kulikov E.E., Toshchakov S.V., Ignatov A.N., Dzhililov F.S.-U., Miroshnikov K.A. Ayka, a Novel *Curtobacterium* bacteriophage, provides protection against soybean bacterial wilt and tan spot // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022b. – Vol. 23. – P. 10913.

294. Tarakanov R.I., Dzhililov F.S.-U. Using of essential oils and plant extracts against *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on Soybean // *Plants*. – 2022c. – Vol. 11. – P. 2989.
295. Tarakanov R.I., Lukianova A.A., Pilik R.I., Evseev P.V., Miroshnikov K.A., Dzhililov F.S.-U., Tesic S., Ignatov A.N. First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* causing bacterial tan spot of soybean in Russia // *Plant Disease*. – 2023a. – Vol. 107. – P. 2211.
296. Tarakanov R., Shagdarova B., Lyalina T., Zhuikova Y., Il'ina A., Dzhililov F., Varlamov V. Protective properties of copper-loaded chitosan nanoparticles against soybean pathogens *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* // *Polymers*. – 2023b. – Vol. 15. – P. 1100.
297. Tarakanov R., Ignatov A., Evseev P., Chebanenko S., Ignatyeva I., Miroshnikov K., Dzhililov F. Development of a multiplex real-time PCR method for the detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in soybean seeds // *Brazilian Journal of Biology*. – 2023c. – Vol. 83. – P. e275505.
298. Tarakanov R., Ignatyeva I., Dzhililov F. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in soybean seeds using PCR assay // *AIP Conferences Proceedings*. – 2023d. – Vol. 2921. – P. 040001.
299. Tegli S. Detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds and in seeds of other Leguminosae crops / S. Tegli, M. Cerboneschi, A.K. Vidaver // In: Fatmi, M., Walcott, R. R. and Schaad, N. W. (Eds). *Detection of plant-pathogenic bacteria in seed and other planting material* – St Paul, USA: APS Press, 2017. – P. 77–83.
300. Tegli S., Sereni A., Surico G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds // *Letters in applied microbiology*. – 2002. – Vol. 35. – №. 4. – P. 331-337.
301. Tegli S., Surico G., Esposito A. Studi sulla diagnosi di *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* nei semi di fagiolo // *Notiziario sulla protezione delle piante*. – 1998. – Vol. 9. – P. 63-71.

302. Thomas M.D., Leary J.V. A new race of *Pseudomonas glycinea* // *Phytopathology*. – 1980. – Vol. 70. – P. 310-312.
303. Tokmakova, A.D., Tarakanov R.I., Lukianova A.A., Evseev P.V., Dorofeeva L.V., Ignatov A.N., Dzhililov F.S.-U., Subbotin S.A., Miroshnikov K.A. Phytopathogenic *Curtobacterium flaccumfaciens* strains circulating on leguminous plants, alternative hosts and weeds in Russia // *Plants*. – 2024. – Vol. 13. – P. 667.
304. Tong Z., Sadowsky M.J. A selective medium for the isolation and quantification of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* strains from soils and inoculants // *Applied and environmental microbiology*. – 1994. – Vol. 60. – №. 2. – P. 581-586.
305. Tsygankova S., Ignatov A., Boulygina E., Kuznetsov B.B., Korotkov E. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* revealed by novel rep-PCR primers // *European journal of plant pathology*. – 2004. – Vol. 110. – P. 845–853.
306. Ullrich M., Bereswill S., Völksch B., Fritsche W., Geider K. Molecular characterization of field isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* differing in coronatine production // *Journal of general microbiology*. – 1993. – Vol. 139. – №. 8. – P. 1927-1937.
307. Ullrich M.S., Schergaut M., Boch J., Ullrich B. Temperature-responsive genetic loci in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* // *Microbiology*. 2000. – Vol. 146. – P. 2457-2468.
308. Urrea C.A., Harveson R.M. Identification of sources of bacterial wilt resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris*) // *Plant disease*. – 2014. – Vol. 98. – №. 7. – P. 973-976.
309. Van Twest R. Bacteriophage enrichment from water and soil / R. Van Twest, A.M. Kropinski, R. Twest // *In Bacteriophages – Totowa, USA: Humana Press, 2009. – P. 15–21. ISBN: 978-1-58829-682-5.*
310. Völksch B., May R. Biological Control of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* by epiphytic bacteria under field conditions // *Microbial ecology*. – 2001.– Vol. 41. – №. 2. – P. 132-139.

311. Wang W., Zu Y., Fu Y., Reichling J., Suschke U., Nokemper S., Zhang Y. In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-herpes simplex virus type 1 activity of *Phellodendron amurense* Rupr. from China // *The american journal of chinese medicine*. – 2009. – Vol. 37. – №. 1. – P. 195-203.
312. Weingart H., Volksch B. Ethylene production by *Pseudomonas syringae* pathovars In vitro and in planta // *Applied and environmental microbiology*. – 1997. – Vol. 63. – No. 1. – P. 156-161.
313. Wensing A., Braun S.D., Büttner P., Expert D., Völksch B., Ullrich M.S., Weingart H. Impact of siderophore production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 on epiphytic fitness and biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* 1a/96 // *Applied and environmental microbiology*. – 2010. – Vol. 76. – №. 9. – P. 2704-2711.
314. Williams D., Nyvall R. Leaf infection and yield losses caused by brown spot and bacterial blight diseases of soybean // *Phytopathology*. – 1980. – Vol. 70. – P. 900.
315. Xu J., Zhou F., Ji B.-P., Pei R.-S., Xu N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli* // *Letters in applied microbiology*. – 2008. – Vol. 47. – №. 3. – P. 174-179.
316. Y. B. Bacterial disease of soybean and their symptoms in Japan // *Bulletin of national institute of agronomy and environmental science*. – 1986. – Vol. 1. – P. 83-94.
317. Young J.M., Dye D.W., Bradbury J.F., Panagopoulos C.G., Robbs C.F., A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria // *New zealand journal of agricultural research*. – 1978. – Vol. 21. – №. 1. – P. 153-177.
318. Young M., Santra S. Copper (Cu)-silica nanocomposite containing valence-engineered Cu: a new strategy for improving the antimicrobial efficacy of Cu biocides // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2014. – Vol. 62. – №. 26. – P. 6043-6052.
319. Zhang T., Dou W., Zhang X., Zhao Y., Zhang Y., Jiang L., Sui X. The Development history and recent updates on soy protein-based meat alternatives // *Trends in food science & technology*. – 2021. – Vol. 109. – P. 702–710.

320. Żurek N., Pawłowska A., Pycia K., Grabek-Lejko D., Kapusta I.T. Phenolic profile and antioxidant, antibacterial, and antiproliferative activity of *Juglans regia* L. male flowers // *Molecules*. – 2022. – Vol. 27. – №. 9. – P. 2762.

321. Биотехагро. Эффективность органических фунгицидов против болезней сои [Электронный ресурс] – <https://xn--80abhgo0bdpo5a.xn--p1ai/rastnievodstvo/rastnievodstvo-86/> (дата обращения 08.09.2023)

322. Глобальная база данных ЕОКЗР [Электронный ресурс] <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMGL.2023/> (дата обращения 17.02.2022)

323. ЕМИСС – Единая межведомственная информационно – статистическая система [Электронный ресурс] – <https://www.fedstat.ru/> (дата обращения 28.07.2023)

324. EPPO – European and mediterranean plant protection organization. *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* categorization [Электронный ресурс] – <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMGL/categorization> (дата обращения 28.09.2023)

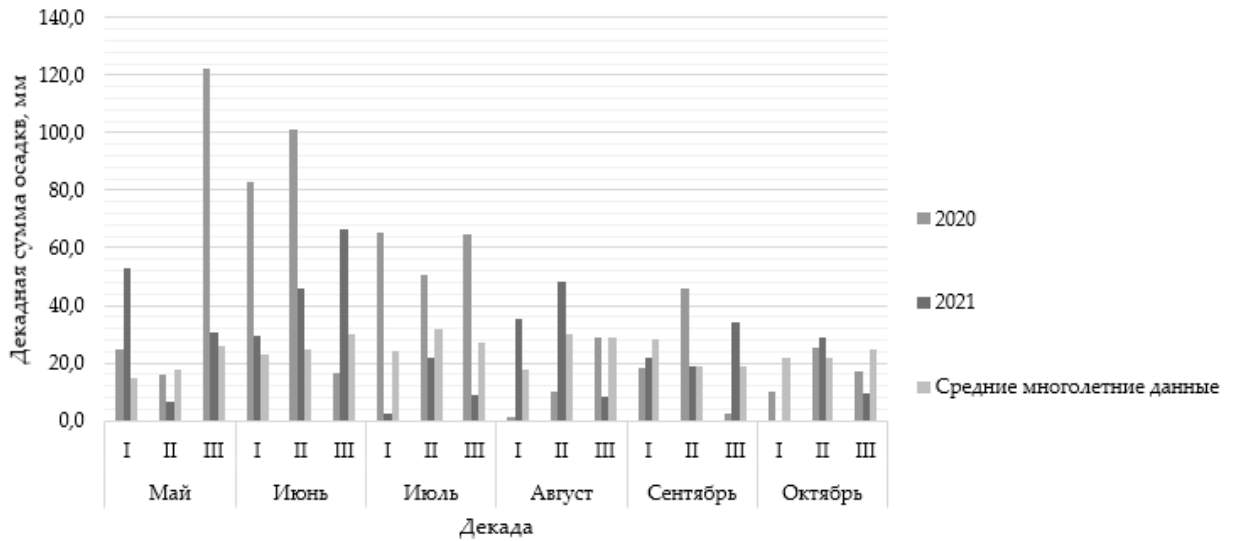
325. Hartman G.L - Diseases of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) [Электронный ресурс] – <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Soybean.aspx> (дата обращения 23.11.2022)

326. Harveson R.M. - The multicolored bacterium [Электронный ресурс] – <https://www.apsnet.org/edcenter/apsnetfeatures/Pages/bacterium.aspx> (дата обращения 23.11.2023)

327. Rooney W., Laird J., Chowdhury M., MacIntosh C., Deng X., McBride P., Milner J. - *Pseudomonas syringae* seed infections [Электронный ресурс] – <https://www.protocols.io/view/pseudomonas-syringae-seed-infections-ewov18beygr2/v1> (дата обращения 23.02.2021).

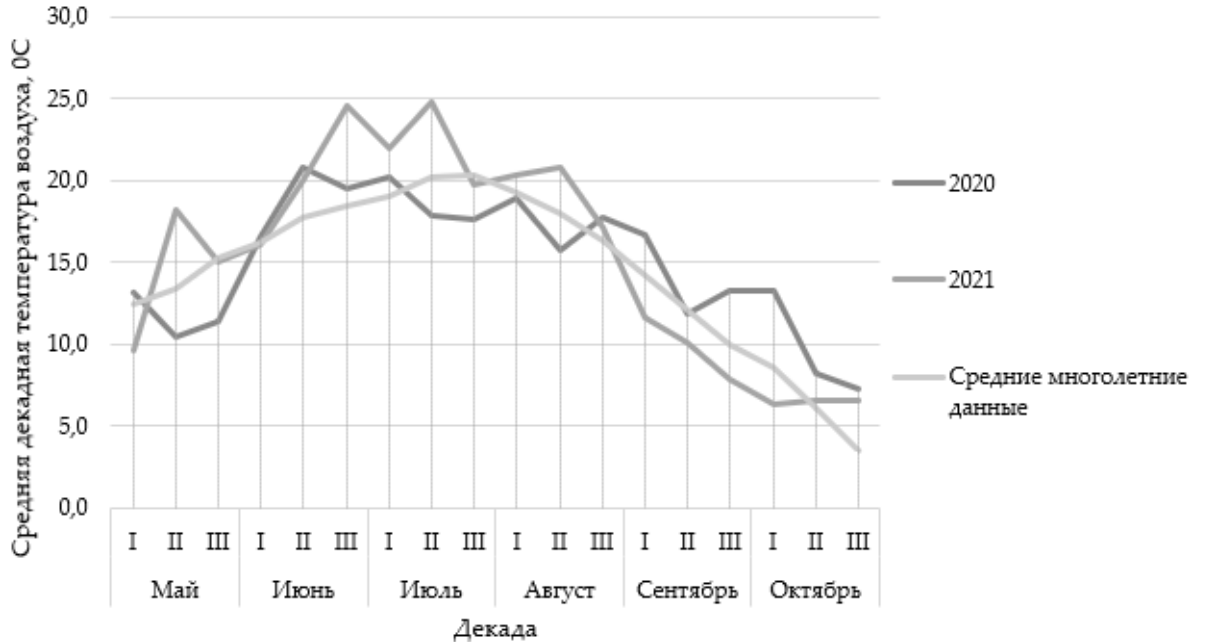
Приложение А.

Сумма осадков вегетационного периода сои в годы исследований в (2020-2021 гг.), мм



Приложение Б.

Среднесуточная температура вегетационного периода сои в годы исследований в (2020-2021 гг.), °С



Приложение В.

Характеристика сортов сои, использованных в исследовании

№ п/п	Сорт	Группа спелости	Оригинатор (страна)	Регион допуска*
1.	Асука	ранний	Semences Prograin Inc. (Канада)	5, 6, 12
2.	Опус	ранний		5
3.	Кофу	ранний		5
4.	Сибيريا	ранний		5
5.	Хана	ранний		5, 6, 12
6.	Нордика	ранний		12
7.	Максус	ранний		5
8.	Аляска	ранний		5
9.	Киото	среднеранний		5
10.	Соер 4	ранний	ФАНЦ Юго-Востока (Россия)	5, 7, 8, 9, 12
11.	Самер 1	ранний		7
12.	Чера	ранний	ФАНЦ Северо-Востока Россия)	4, 7
13.	Мк-100	ранний	ВНИИ Сои (Россия)	12
14.	Даурия	ранний		12
15.	Грация	ранний		12
16.	Китросса	ранний		12
17.	Дш 863	ранний	Sevita Genetics (Канада)	12
18.	Бара	очень ранний	Соевый Комплекс (Россия)	5
19.	Аванта	очень ранний		5, 7, 8
20.	Эльта	ранний		5, 6
21.	Дока	ранний		5, 6, 9, 10
22.	Арлета	ранний		5, 6, 8
23.	Фарта	ранний		5, 6, 8
24.	Аргента	ранний	ЭкоНива-Семена (Россия)	5
25.	Султана	очень ранний	Societe Ragt 2n S.A.S. (Франция)	6
26.	Протина	ранний		5
27.	Ржт Шуна	ранний		6
28.	Мезенка	очень ранний	ФАНЦ Зернобобовых и Крупяных культур (Россия)	5
29.	Свапа	ранний		5
30.	Осмонь	ранний		5
31.	Зуша	среднеранний		5
32.	Белгородская 7	очень ранний	Белгородский ГАУ (Россия)	5
33.	Белгородская 48	среднеранний		5

34.	ЕС Командор	среднеранн ий	Lidea France (Франция)	5,6
35.	Фавор	среднеранн ий		5, 6, 12
36.	Волма	очень ранний	Соя-Север КО (Белоруссия)	3, 5, 7, 9, 12
37.	Припять	ранний		2, 3, 5
38.	Билявка	очень ранний	Русская Генетика (Россия)	5
39.	Аннушка	ранний		5
40.	Сибиряда	ранний	ФГБНУ Омский АНЦ (Россия)	3, 10. 11
41.	Пруденс	очень ранний	Huron Commodities Inc. (Канада)	5
42.	Малага	очень ранний	Saatbau Linz Egen (Австрия)	5
43.	Лиссабон	среднеранн ий		5, 12
44.	Альтона	среднеранн ий		5
45.	Скульптор	ранний	Norddeutsche Pflanzenzucht Hans- Georg Lembke Kg (Германия)	3, 5, 7
46.	Амадеа	ранний	Saatzucht Donau (Австрия)	6
47.	Касатка	ранний	ФНАЦ ВИМ (Россия)	3, 4

*Примечание: * 2 - Северо-Западный, 3 – Центральный. 4 - Волго-Вятский, 5 - Центрально-Черноземный, 6 - Северо-Кавказский, 7 – Средневолжский, 8 – Нижневолжский, 9 – Уральский, 10 - Западно-Сибирский, 11 - Восточно-Сибирский, 12 – Дальневосточный.*

Приложение Г.

Растительный материал, использованный для экстракции эфирных масел и растительных экстрактов. ЭМ-эфирное масло, РЭ-растительный экстракт

Русскоязычное название	Латинское название	Семейство	Часть растения	ЭМ или РЭ	Ссылка на источник
Аир обыкновенный	<i>Oleum calami</i> L.	<i>Acoraceae</i>	корневища	ЭМ, РЭ	(Radušienė et al., 2007; Kumar et al., 2010)
Тысячелистник обыкновенный	<i>Achillea millefolium</i> L.	<i>Asteraceae</i>	соцветия	ЭМ	(Mbega et al., 2012)
Фенхель обыкновенный	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	<i>Apiaceae</i>	плоды	ЭМ	(Reichling et al., 2009)
Анис обыкновенный	<i>Pimpinella anisum</i> L.	<i>Apiaceae</i>	плоды	ЭМ	(Khanjari et al., 2019)
Пижма обыкновенная	<i>Tanacetum vulgare</i> L.	<i>Asteraceae</i>	листья и соцветия	ЭМ	(Reichling et al., 2009)
Чеснок посевной	<i>Allium sativum</i> L.	<i>Amaryllidaceae</i>	зубчики	ЭМ, РЭ	(Benkeblia et al., 2004; Gull et al., 2012)
Тимьян обыкновенный	<i>Thymus vulgaris</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	листья и соцветия	ЭМ	(Lo Cantore et al., 2009)
Душица обыкновенная	<i>Origanum vulgare</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	листья и стебли	ЭМ	(Flores et al., 2018)
Мята перечная	<i>Mentha piperita</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	цветы, листья, стебли	ЭМ	(Reichling et al., 2009)
Мята длиннолистная	<i>Mentha longifolia</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	листья, стебли	ЭМ	(Pandey et al., 2017)
Лаванда узколистная	<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	<i>Lamiaceae</i>	листья и соцветия	ЭМ	(Chouhan et al., 2017)
Розмарин лекарственный	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	листья и соцветия	ЭМ	(Reichling et al., 2009)
Шалфей лекарственный	<i>Salvia officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	листья и цветы	ЭМ	
Коричник китайский	<i>Cinnamomum aromaticum</i> (L.) Presl	<i>Lauraceae</i>	листья	ЭМ	(Nabavi et al., 2015)
Гвоздичное дерево	<i>Syzygium aromaticum</i> L.	<i>Myrtaceae</i>	цветы, листья, стебли	ЭМ	(Radušienė et al., 2007)
Лайм настоящий	<i>Citrus aurantiifolia</i> (Christm.) Swingle	<i>Rutaceae</i>	кожура от фруктов	ЭМ	
Мандарин	<i>Citrus</i>	<i>Rutaceae</i>	кожура	ЭМ	(Reichling et al., 2009)

красный	<i>reticulata</i> Blanco		от плодов		al., 2009)
Рута душистая	<i>Ruta graveolens</i> L.	<i>Rutaceae</i>	листья и стебли	ЭМ	(França Orlanda et. al., 2015)
Кардамон настоящий	<i>Elettaria cardamomum</i> (L.) Maton	<i>Zingiberaceae</i>	плоды	ЭМ	(Reichling et. al., 2009)
Тмин обыкновенный	<i>Carum carvi</i> L.	<i>Apiaceae</i>	плоды	РЭ	(Moslemi et. al., 2012)
Полынь горькая	<i>Artemisia absinthium</i> L.	<i>Asteraceae</i>	листья и стебли	РЭ	
Бузина чёрная	<i>Sambucus nigra</i> L.	<i>Caprifoliaceae</i>	листья	РЭ	(Chassagne et. al., 2021)
Козлятник лекарственный	<i>Galega officinalis</i> L.	<i>Fabaceae</i>	листья и стебли	РЭ	(Khameneh et. al., 2019)
Дуб черешчатый	<i>Quercus robur</i> L.	<i>Fagaceae</i>	листья	РЭ	
Мелисса лекарственная	<i>Melissa officinalis</i> L.	<i>Lamiaceae</i>	листья и стебли	РЭ	(Abdel-Naime et. al., 2019)
Шелковица чёрная	<i>Morus nigra</i> L.	<i>Moraceae</i>	листья	РЭ	(Budiman et. al., 2017)
Чистотел большой	<i>Chelidonium majus</i> L.	<i>Papaveraceae</i>	листья и стебли	РЭ	(Patra et. al., 2014)
Маклея сердцевидная	<i>Macleaya cordata</i> R.	<i>Papaveraceae</i>	листья и стебли	РЭ	(Khameneh et. al., 2019)
Лаконос американский	<i>Phytolacca americana</i> L.	<i>Phytolaccaceae</i>	листья и стебли	РЭ	(Patra et. al., 2014)
Горец сахалинский	<i>Reynoutria sachalinensis</i> F. Schmidt	<i>Polygonaceae</i>	листья и стебли	РЭ	(Kumagai et. al., 2005)
Бархат амурский	<i>Phellodendron amurense</i> Rupr	<i>Rutaceae</i>	листья	РЭ	(Wang et. al., 2012)
Шиповник повислый	<i>Rosa pendulina</i> L.	<i>Rosaceae</i>	листья	РЭ	(Kiss et. al., 2017)
Спирея иволистная	<i>Spiraea salicifolia</i> L.	<i>Rosaceae</i>	листья	РЭ	
Бадан толстолистный	<i>Bergenia crassifolia</i> (L.) Fritsch	<i>Saxifragaceae</i>	корневища	РЭ	(Liu et. al., 2017)
Перец стручковый	<i>Capsicum annuum</i> L.	<i>Solanaceae</i>	плоды	РЭ	(Koffi-Nevry et. al., 2012)
Орех маньчжурский	<i>Juglans mandshurica</i> Maxim	<i>Juglandaceae</i>	листья	РЭ	(Žurek et. al., 2022)

Приложение Д.

Характеристика фунгицидов, использованных в исследовании

№	Действующее вещество (вещества)	Коммерческое название фунгицида	Код д.в. по FRA C*	Соде ржан ие д.в. .%	Культура	Норма расхода		Производитель (страна)
						фунгицида [ссылка**]	рабо чег о раст вор а	
Жидкие формуляции								
1	макролидный тилозиновый комплекс	Фитоплазмин, ВРК	48	20	томат	обработка семян, 3,5 л/т	300-600 л/га	Фармбиомед (Россия)
2	комплекс стрептомициновых антибиотиков (БА - 120000 ЕД/мл)	Фитолавин, ВРК	25	3,2	пшеница	обработка семян, 1,75 л/т	10 л/т	
						опрыскивание, 1,75 л/га	300 л/га	
3	тирам	ТМТД, ВСК	М 03	40	соя	обработка семян, 7 л/т	10 л/т	Август (Россия)
4	азоксистробин + тебуконазол + тирам	Гераклион, КС	11+3+М 03	1,5+2,5+40	соя	обработка семян, 1,1 л/т	6-8 л/т	Щелково Агрохим (Россия)
5	наночастицы	Наноклолоид 2, ВКР	М	-	капуста	опрыскивание, 9 л/га (Орынбаев, 2019)	300 л/га	Наноиндустрия (Россия)
6	коллоидного серебра	Зерокс, ВРК	М	0,3	капуста		300 л/га	Нанобиотех (Россия)
7	четвертичные аммониевые соединения	Физан 20, ВРК	-	20	томат	опрыскивание, 1,4 л/га (Baysal et. al., 2015)	300 л/га	Maril Products Inc., (США)
8	хлороталонил	Браво, КС	М 05	50	томат, лук	опрыскивание, 3 л/га	400 л/га	Сингента Россия (Россия)
						обработка семян, 7,5 кг/т (Kharbanda et. al., 1979)	10 л/т	
9	фитобактериомицин	Стрекар, КС	25	7	томат, зерновы	опрыскивание, 1,75 л/га	300-400	Фармбиомед (Россия)

					е		л/га	
10	касугамицин	Касумин, ВРК	24	2	рис	опрыскивание, 1,37 л/га	300 л/га	Нокко Chemical Industry Co., Ltd (Япония)
11	наночастицы серебра и меди	Серебро медин, ВРК	М	-	овощной горох	опрыскивание, 12 л/га (https://stop-pest.ru/)	300 л/га	Экофорвард (Россия)
						замачивание семян на 10 минут	-	
Твердые формуляции								
12	метирам (поликарбонатин)	Полирам, ВДГ	М 03	70	картофель	опрыскивание, 2 кг/га	300-600 л/га	БАСФ (Германия)
13	манкоцеб	Даймонд айсен, СП	М 03	80	томат	опрыскивание, 1,6 кг/га	200-600 л/га	Corteva (США)
					нут	обработка семян, 3 кг/т (Basave et. al., 2020)	10 л/т	
14	ипродиион	Ровраль, СП	2	50	подсолнечник	обработка семян, 4 кг/т	10 л/т	Байер (Германия)
15	оксихлорид меди + мефеноксам	Ридомил Голд, ВДГ	М 01 + 4	14, 2+ 2	томат, картофель	опрыскивание, 2,5 кг/га	300 – 500 л/га	Сингента Россия (Россия)
						обработка семян, 2 кг/т (Martins et. al., 2015)	10 кг/т	
16	гидроксид меди	Косайд 2000, ВДГ	М 01	35	картофель	опрыскивание, 1,75 кг/га	200-400 л/га	Dupont Science and Technology (США)
					фасоль	замачивание семян на 10 минут (Estefani et. al., 2007)	5-10 г/л	
17	фосэтилалюминия	Эфатол, СП	Р 07	80	рапс	опрыскивание, 1,2 кг/га	200-400 л/га	Химагрома ркетинг. RU (Россия)

18	гидроксид меди + цимоксан ил	Курзат, СП	М 01+ 27	68, 9+ 4,2	томат	опрыскивание , 2,25 кг/га	400-600 л/га	Dupont Science and Technology (США)
----	------------------------------	------------	----------	------------	-------	---------------------------	--------------	-------------------------------------

Примечания: * - <https://www.frac.info/>; ** - отсутствие ссылки в столбце указывает на информацию из «Государственного каталога пестицидов и агрохимикатов, разрешённых к применению на территории Российской Федерации».

Приложение Е.

Список штаммов бактерий, использованных в исследовании и специфичность ПЦР метода

№	Целевая бактерия	Штамм	Значение порогового цикла ± стандартное отклонение для мультиплексного ПЦР анализа		Результат классического ПЦР анализа		Источник
			FAM (Psg-специфичный флюорофор)	R6G (Cff-специфичный флюорофор)	<i>cfl</i> (Vereswill et. al., 1994)	<i>tlsp</i> (Tegli et. al., 2002)	
Целевые бактерии							
1.	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	2411T	20.07±0.12	-	+	-	NCPP В
2.		G1	19.3 ±0.53	-	+	-	Эта работа
3.		G2	19.07±0.02	-	+	-	
4.		G3	21.01±0.16	-	+	-	
5.		G4	21.87±0.59	-	+	-	
6.		G5	18.77 ±0.15	-	+	-	
7.		G6	19.65±0.19	-	+	-	
8.		G7	19.84±0.32	-	+	-	
9.		G8	19.93±0.26	-	+	-	
10.		G9	20.42±0.41	-	+	-	
11.		G10	18.50±0.09	-	+	-	
12.		G11	20.23±0.23	-	+	-	

13.		G17	19.98±0.07	-	+	-	
14.	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	3418	-	16.59±0.63	-	+	CFBP
15.		20129	-	15.28±0.06	-	+	DSM
16.		F-125-1	-	15.76±0.15	-	+	Эта работа
17.		F-125-2	-	16.21±0.29	-	+	
18.		F-125-3	-	15.69±0.02	-	+	
19.		F-30-1	-	15.93±0.21	-	+	
20.		F-30-2	-	16.89±0.12	-	+	
21.		F-30-3	-	16.24±0.09	-	+	
22.		C101	-	15.26±0.32	-	+	
23.		C122	-	14.08±0.45	-	+	
24.		C139	-	16.96±0.04	-	+	
25.		C142	-	17.91±0.6	-	+	
Нецелевые бактерии							
26.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>pisii</i>	2105	17.88±0.19	-	.*	-	CFBP
27.	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	7231	-	-	.*	-	DSM
28.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	B-894	-	-	.*	-	VKM
29.	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i>	1429	-	-	+	-	CFBP
30.	<i>Pseudomonas savastanoi</i>	B-1546	-	-	.*	-	VKM
31.	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>aptata</i>	2-1-5	-	-	-	-	(Игнатов, 2018)
32.	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	20141	-	-	.*	-	DSM
33.	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>oorti</i>	1384	-	-	.*	-	CFBP
34.	<i>Curtobacterium herbarum</i>	14013	-	-	.*	-	DSM
35.	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	2403	-	-	.*	-	CFBP
36.	<i>Curtobacterium citreum</i>	B-1207	-	-	.*	-	VKM
37.	<i>Curtobacterium albidum</i>	Ac-2186T	-	-	-	-	VKM
38.	<i>Curtobacterium luteum</i>	Ac-2188T	-	-	-	-	VKM
39.	<i>Curtobacterium pusillum</i>	19096	-	-	-	-	ATC C
40.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MBI 600	-	-	-	-	(Samaras et. al., 2021)

41.	<i>Xanthomonas phaseoli</i> pv. <i>phaseoli</i>	2534	-	-	_*		CFBP
42.	<i>Clavibacter</i> <i>michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	2405	-	-	-		CFBP
43.	<i>Pectobacterium</i> <i>carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	2046	-	-	_*		CFBP

Примечания: *Штаммы, которые показали амплификацию неспецифических продуктов; Т – типовой штамм представленного вида.

Приложение Ж.

Химический состав этанолового экстракта бадана толстолистного, эфирных масел коричника китайского и душицы обыкновенной. МСД - масс-спектрометрический детектор; ПИД - пламенно-ионизационный детектор. Результаты представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение

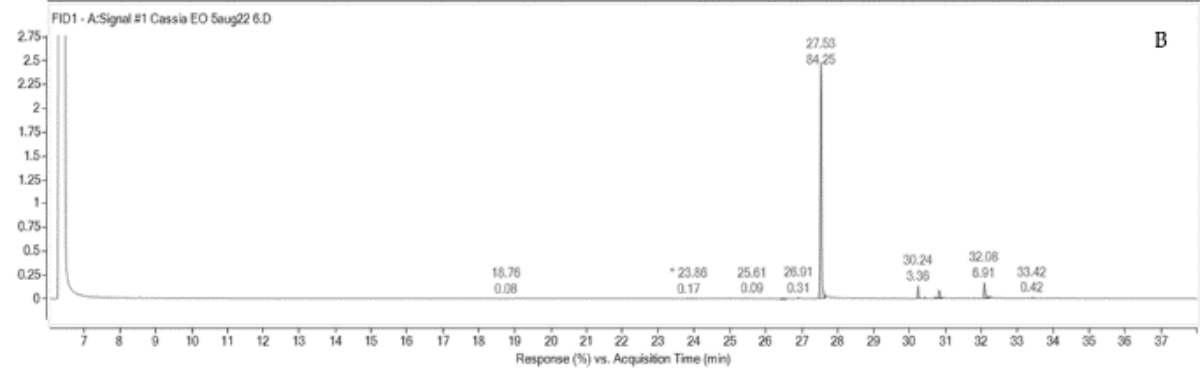
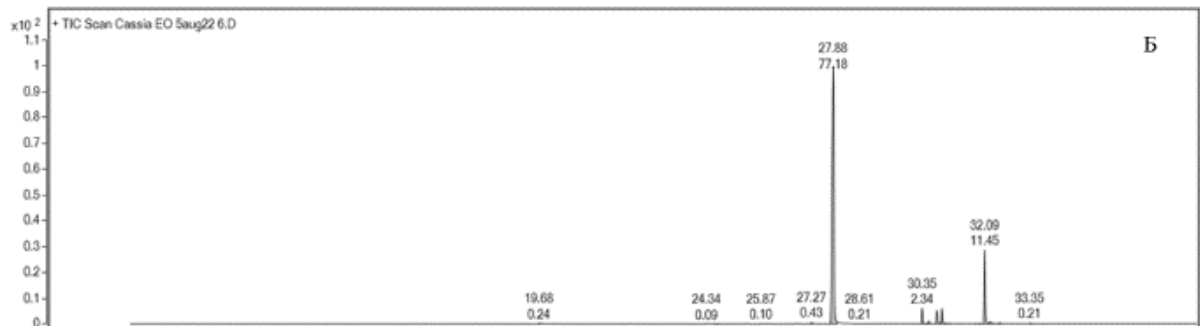
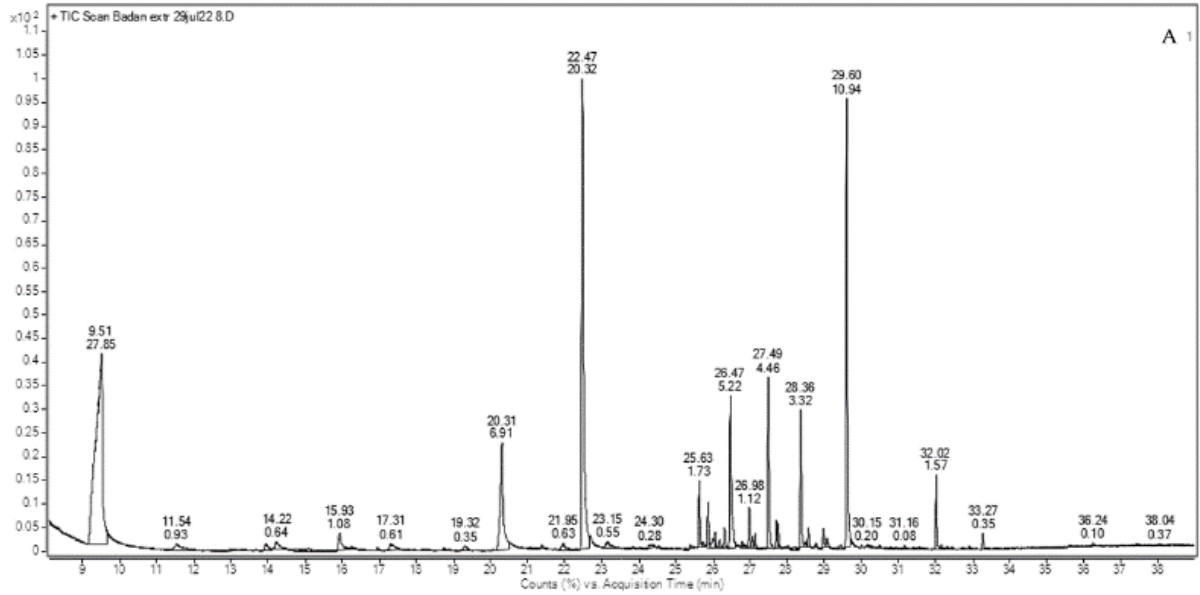
Время удержания (мин)		Соединение	Площадь \pm стандартное отклонение, %		
МСД	ПИД		ЭЭБТ	ЭМКК	ЭМДО
9,5 \pm 0,03	-	Уксусная кислота	27,91 \pm 0,12	-	-
11,54 \pm 0,0	-	Пропановая кислота	0,93 \pm 0,09	-	-
14,21 \pm 0,01	-	2,3-Бутандиол	0,63 \pm 0,02	-	-
15,93 \pm 0,0	-	Изовалериановая кислота	1,04 \pm 0,06	-	-
16,26 \pm 0,0	-	2-Метилмасляная кислота	0,13 \pm 0,01	-	-
19,39 \pm 0,0	18,48 \pm 0,02	3-Туйен	-	-	0,33 \pm 0,018
19,67 \pm 0,0	18,75 \pm 0,0	α -пинен	-	-	1,65 \pm 0,015
19,68 \pm 0,01	18,76 \pm 0,0	Бензальдегид	-	0,08 \pm 0,002	-
20,05 \pm 0,0	19,15 \pm 0,01	α -Фенхен	-	-	0,06 \pm 0,002
20,12 \pm 0,0	19,22 \pm 0,0	Камфен	-	0,08 \pm 0,01	0,45 \pm 0,013
20,33 \pm 0,02	-	Гексанолевая кислота	6,91 \pm 0,14	-	-
20,97 \pm 0,01	20,12 \pm 0,0	β -Пинен	-	-	0,46 \pm 0,004
21,16 \pm 0,03	20,36 \pm 0,0	β -Мирцен	-	-	0,84 \pm 0,009
21,52 \pm 0,02	20,77 \pm 0,0	2,6-Диметил-2,6- октадиен	-	-	0,03 \pm 0,0

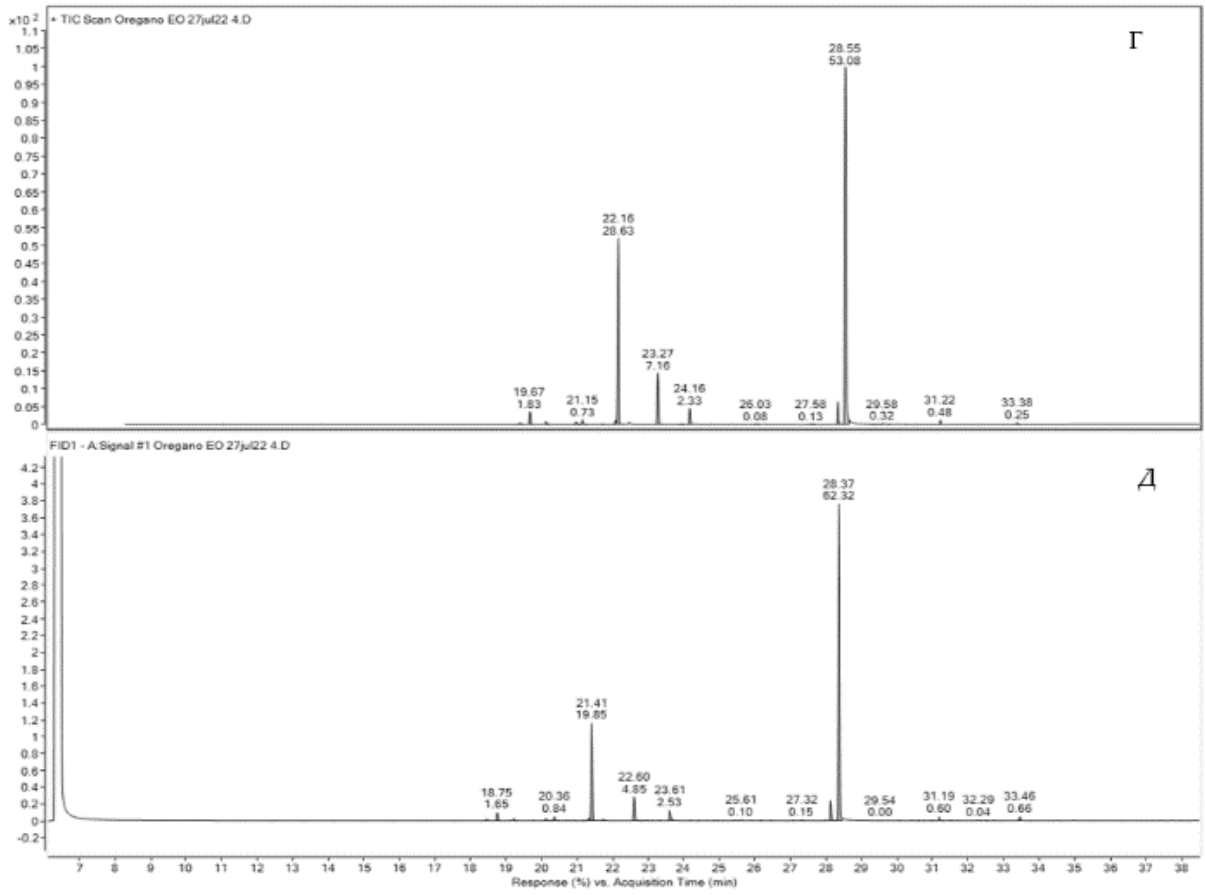
21,67 ± 0,03	20,91 ± 0,01	Псевдолимонен	-	-	0,07 ± 0,004
22,07 ± 0,01	21,33 ± 0,0	α-Терпинен	-	-	0,53 ± 0,01
22,16 ± 0,0	21,41 ± 0,0	Цимен	-	-	19,85 ± 0,36
22,35 ± 0,0	21,61 ± 0,0	п-1-Ментен	-	-	0,035 ± 0,014
22,46 ± 0,0	21,73 ± 0,0	Эвкалиптол, лимонен	-	-	0,28 ± 0,003
22,50 ± 0,03	-	5-Метил-3-метилендигидро-2(3H)-фуранон	20,32 ± 0,71	-	-
22,53 ± 0,0	21,80 ± 0,0	Лимонен	-	0,03 ± 0,001	-
23,27 ± 0,0	22,61 ± 0,02	γ-Терпинен	-	-	4,85 ± 0,002
23,92 ± 0,0	23,30 ± 0,0	D-фенхон	-	-	0,04 ± 0,0
24,17 ± 0,01	23,61 ± 0,0	Линалоол	-	-	2,53 ± 0,045
24,32 ± 0,03	23,86 ± 0,0	Фенилэтиловый спирт	0,29 ± 0,001	0,15 ± 0,007	-
25,36 ± 0,01	24,87 ± 0,0	d-камфор	-	-	0,072 ± 0,009
25,43 ± 0,0	24,96 ± 0,0	3-Фенилпропаналь	-	0,10 ± 0,026	-
25,63 ± 0,0	-	l-Ментон	1,69 ± 0,08	-	-
25,86 ± 0,0	-	Изоментон	1,25 ± 0,01	-	-
25,87 ± 0,0	25,42 ± 0,01	4-Фенилбутаналь	-	0,09 ± 0,01	-
26,04 ± 0,02	25,61 ± 0,0	Эндо-борнеол	-	0,1 ± 0,032	0,10 ± 0,03
26,06 ± 0,0	-	Изоборнеол	0,46 ± 0,003	-	-
26,29 ± 0,01	25,9 ± 0,01	Терпинен-4-ол	-	-	0,04 ± 0,001
26,31 ± 0,01	-	Транс-сабинена гидрат	0,53 ± 0,006	-	-
26,47 ± 0,0	-	Метилсалицилат	5,18 ± 0,08	-	-
26,97 ± 0,01	-	2-Гидроксицинеол	1,16 ± 0,08	-	-
27,27 ± 0,0	26,91 ± 0,01	2-Анисальдегид	-	0,31 ± 0,037	-
27,49 ± 0,01	-	Пулегон	4,46 ± 0,0	-	-
27,58 ± 0,01	27,32 ± 0,01	Метилловый эфир тимола	-	-	0,15 ± 0,08

27,76 ± 0,02	-	Пиперитон	0,66 ± 0,07	-	-
27,88 ± 0,0	27,53 ± 0,0	(Е)-Циннамальдегид	-	84,25 ± 3,452	-
28,34 ± 0,0	28,13 ± 0,0	Тимол	3,33 ± 0,02	-	3,51 ± 0,055
28,57 ± 0,0	28,37 ± 0,0	Карвакрол	0,45 ± 0,01	-	62,37 ± 0,01
29,60 ± 0,0	-	Эвгенол	10,89 ± 0,61	-	-
30,35 ± 0,0	30,24 ± 0,0	Диметилацеталь циннамальдегида	-	3,36 ± 0,011	-
30,54 ± 0,0	30,43 ± 0,0	Копаен	-	0,38 ± 0,007	-
30,76 ± 0,01	30,71 ± 0,0	Кумарин	-	0,38 ± 0,001	-
30,90 ± 0,0	30,83 ± 0,0	Циннамилацетат	-	2,34 ± 0,052	-
31,22 ± 0,0	31,18 ± 0,01	Кариофиллен	-	-	0,6 ± 0,002
31,84 ± 0,01	31,82 ± 0,0	Куркумен	-	0,15 ± 0,04	-
31,94 ± 0,02	31,93 ± 0,01	γ-Аморфен	-	0,17 ± 0,0	-
32,02 ± 0,0	-	3,5-Ди-tert-бутилфенол	1,6 ± 0,03	-	-
32,09 ± 0,0	32,08 ± 0,01	о- Метоксициннамальдеги д	-	6,93 ± 0,024	-
32,26 ± 0,0	32,25 ± 0,01	α-Муролен	-	0,34 ± 0,01	-
33,28 ± 0,01	-	2,2,4-Триметил-1,3- пептандиол диизобутират	0,35 ± 0,01	-	-
33,32 ± 0,0	33,39 ± 0,01	α-Фарнезен	-	-	0,07 ± 0,002
33,35 ± 0,01	33,42 ± 0,0	Диметилацеталь метоксициннамальдегид а	-	0,4 ± 0,026	-
33,38 ± 0,01	33,46 ± 0,0	Кариофиленоксид	-	-	0,63 ± 0,03
-	-	Всего идентифицировано, %	90,17	99,64	99,55

Приложение 3.

Хроматографические профили эфирных масел и растительных экстрактов (А - хроматографический профиль этанольного экстракта бадана толстолистного с использованием масс-спектрометрического детектора; хроматографический профиль эфирного масла коричника китайского с использованием масс-спектрометрического детектора (Б) и пламенно-ионизационного детектора (В); хроматографический профиль эфирного масла душицы обыкновенной с использованием масс-спектрометрического детектора (Г) и пламенно-ионизационного детектора (Д))





Приложение И.

Базы данных «Устойчивость сортов сои к бактериальному ожогу и ржаво-бурой бактериальной пятнистости» и «Генетическая коллекция штаммов возбудителя бактериального ожога сои *Pseudomonas savastanoi*. pv. *glycinea*»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



RU2022622561

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ БАЗЫ ДАННЫХ, ОХРАНЯЕМОЙ
АВТОРСКИМИ ПРАВАМИ

Номер регистрации (свидетельства): 2022622561 Дата регистрации: 19.10.2022 Номер и дата поступления заявки: 2022622520 12.10.2022 Дата публикации и номер бюллетеня: 19.10.2022 Бюл. № 10 Контактные реквизиты: Snezkina@rgau-msha.ru	Автор(ы): Тараканов Рашит Ислямович (RU) Правообладатель(и): Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева» (ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева) (RU)
---	---

Название базы данных:
«Устойчивость сортов сои к бактериальному ожогу и ржаво-бурой бактериальной пятнистости»

Реферат:

База данных предназначена для хранения результатов исследования реакции наиболее распространенных на производстве сортов сои на заражение штаммами возбудителей бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости. Данные получены путем инокуляции листьев методом среза ножницами, смоченными в суспензии бактерии с концентрацией 108 КОЕ/мл в фазе растения V3 с последующим через 12 суток измерением ширины зоны поражения при помощи штангенциркуля всех листьев каждого растения. Пользователями базы данных могут быть агрономы хозяйств, выращивающих сою и заинтересованных в использовании на производстве малопоражаемых сортов, сотрудники селекционных учреждений, которые могут использовать малопоражаемые сорта в качестве доноров генов устойчивости, а сильнопоражаемые - в качестве стандартов восприимчивости к бактериозам сои. База данных создана в рамках реализации Программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030», соглашение № 075-15-2021-1196 от 30.09.2022 г.

Вид и версия системы управления базой данных: Access 2007 и выше

Объем базы данных: 0,73 МБ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



RU2024620680

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ БАЗЫ ДАННЫХ, ОХРАНЯЕМОЙ
АВТОРСКИМИ ПРАВАМИ

Номер регистрации (свидетельства):
2024620680

Дата регистрации: 13.02.2024

Номер и дата поступления заявки:
2024620377 08.02.2024

Дата публикации и номер бюллетеня:
13.02.2024 Бюл. № 2

Контактные реквизиты:
Snezkina@rgau-msha.ru

Автор(ы):

Тараканов Рашид Ислямович (RU),
Белошапкина Ольга Олеговна (RU),
Чебаненко Светлана Ивановна (RU),
Савоськина Ольга Алексеевна (RU),
Каратаева Оксана Григорьевна (RU),
Хоружий Людмила Ивановна (RU),
Джалилов Февзи Сеид-Умерович (RU)

Правообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Российский государственный
аграрный университет - МСХА имени К.А.
Тимирязева» (ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА
имени К.А. Тимирязева) (RU)

Название базы данных:

«Генетическая коллекция штаммов возбудителя бактериального ожога сои *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*»

Реферат:

База данных (БД) позволяет проводить сравнение и идентификацию штаммов возбудителя бактериального ожога сои и может быть использована для анализа генетического разнообразия, выявления местных особенностей изолятов данного вида при сравнении с другими образцами в рамках всемирных баз данных. БД может быть использована для разработки новых методов (ПЦР праймеров) для диагностики зараженности сои патогеном. Пользователями БД могут быть работники специализированных микробиологических лабораторий, занимающиеся идентификацией, систематизацией и анализом генотипов штаммов патогенных бактерий, фитосанитарных лабораторий, а также студенты и аспиранты естественнонаучного профиля подготовки. БД создана в рамках выполнения НЦМУ, соглашение №075-15-2022-317 от 20.04.2022г.

Вид и версия системы управления базой данных: Excel

Объем базы данных: 37 МБ

Приложение К.**Акты о внедрении результатов научно-исследования вательской работы**

ООО «Сингента»
Россия, 115114, г. Москва
ул. Летниковская, д.2, стр.3
www.syngenta.com

Тел. +7 495 933-77-55
Факс +7 495 933-77-56

Исх. №_б/п_ от «14» августа 2023 г.
Вх. № _____ от «__» _____ 2022

АКТ

о внедрении научных и практических результатов Тараканова Р.И. и авторского коллектива на тему: «Комплекс инновационных приемов защиты сои от бактериальных болезней»

Научные и практические результаты работы аспиранта Тараканова Р.И. используются при фитосанитарном анализе посевного материала сои в лабораториях ООО «Сингента». В частности, применяется разработанная авторским коллективом мультиплексная тест-система для диагностики *Pseudomonas savastanoi pv. glycinea* и *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* методом «ПЦР в реальном времени» (ПЦР-РВ).

Настоящий АКТ составлен комиссией в следующем составе:

Руководитель лабораторий технической
поддержки и развития продуктов
ООО «Сингента», к.б.н.,



Мазурин Е.С.

ООО «Нива Черноземья»

398050 г. Липецк ул. Ленина д. 23, офис 313 тел. 8 903 867 46 00

ИНН 4825056668 КПП 482501001

ОГРН 1084823003649

Утверждаю

Генеральный директор

ООО «Нива Черноземья»

Подосинников И.С.

г. Липецк



20.07.2023 г.

АКТ

о внедрении научных и практических результатов Тараканова Р.И. и авторского коллектива на тему: «Комплекс инновационных приемов защиты сои от бактериальных болезней»

Научные и практические результаты работы аспиранта Тараканова Р.И. используются в производстве зерна сои в ООО «Нива Черноземья». В частности, для снижения ущерба от бактериозов применяются рекомендованные устойчивые к болезням сорта.

Настоящий АКТ составлен комиссией в следующем составе:

Директор

Подосинников И.С.

Заведующая лабораторией

Мороз Е.Я.

Аспирант

Тараканов Р.И.

Руководитель авторского коллектива

Джалилов Ф.С.-У.



Приложение Л.
Свидетельство к золотой медали 32-й Агропромышленной выставки
АГРОРУСЬ-2023



Приложение М.

Диплом призёра III этапа Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых вузов Минсельхоза России

