

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

---

*На правах рукописи*

Васильева Анна Андреевна

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧЕРНОЙ НОЖКИ  
КАРТОФЕЛЯ И МЕРЫ ЗАЩИТЫ**

Шифр и наименование научной специальности:  
4.1.3. Агрехимия, агропочвоведение, 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

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	12
1.1. Распространение и вредоносность черной ножки картофеля	12
1.2. Биологические свойства и систематика возбудителей черной ножки картофеля	21
1.3. Диагностика черной ножки и мягкой гнили картофеля	29
1.4. Стратегии защиты картофеля от черной ножки	40
<b>ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	54
2.1 Выделение и идентификация возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля	54
2.2 Оценка биологических свойств возбудителей черной ножки картофеля	58
2.3 Разработка ПЦР в реальном времени для диагностики возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля <i>Pectobacterium punjabense</i>	61
2.4 Скрининг медьсодержащих фунгицидов для борьбы с черной ножкой картофеля	64
2.5 Использование веществ растительного происхождения в защите картофеля от возбудителей черной ножки	75
2.6 Использование бактериофагов в защите картофеля от мягкой гнили клубней	84
2.7 Оценка устойчивости сортов картофеля к возбудителям черной ножки и мягкой гнили	86
2.8 Статистический анализ	90
<b>ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ</b>	81
3.1 Разнообразие возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля	91
3.2 Характеристика биологических свойств возбудителей черной ножки картофеля из рода <i>Pectobacterium</i>	97
3.3 Разработка ПЦР в реальном времени для диагностики возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля <i>Pectobacterium punjabense</i>	107
3.4 Скрининг медьсодержащих фунгицидов для борьбы с черной ножкой картофеля	114
3.5 Использование веществ растительного происхождения в защите картофеля от возбудителей черной ножки	125
3.6 Использование бактериофагов в защите картофеля от возбудителей мягкой гнили	147

3.7 Оценка устойчивости сортов картофеля к возбудителям черной ножки и мягкой гнили	150
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	159
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	162

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Картофель (*Solanum tuberosum* L.) – одна из важнейших сельскохозяйственных культур в мире, которая по объему ежегодного производства (375 млн т) занимает второе место после зерновых злаков и по площади (17,7 млн га) входит в топ-5 сельскохозяйственных продуктов по всему миру (FAO, 2022). Благодаря высокой экологической пластичности и устойчивости к абиотическим стрессам эту культуру выращивают в 159 странах мира, преимущественно в зонах с умеренным климатом. При этом Российская Федерация, по данным FAOSTAT за 2022 год, занимает четвертое место по объему производства в мире, что соответствует 18,9 млн т картофеля (<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>; дата обращения 10 июля 2024 года).

По итогам 2023 года, согласно оценке АБ-Центра со ссылкой на уточненные данные Росстата (<https://ab-centre.ru/news/o-proizvodstve-kartofelya-i-ovoschey-v-rossii-dannye-na-2023-god>; дата обращения 16 августа 2024 года), был отмечен максимальный за последние 30 лет показатель валовых сборов картофеля в промышленном секторе (8,6 млн т), что на 18,3% превышает значения, полученные годом ранее и на 1030,6 тыс. тонн превышает показатели 2019 года, являющиеся максимальными за последние 20 лет (<https://ab-centre.ru/news/proizvodstvo-kartofelya-v-rossii-itogi-za-2023-god>; дата обращения 18 августа 2024 года). При этом наибольшие объемы производства пришлось на Брянскую, Тульскую, Московскую, Нижегородскую и Астраханскую области, вероятно, за счет преобладания промышленных площадей в секторе картофелеводства в данных регионах (<https://ab-centre.ru/news/posevnye-ploschadi-kartofelya-v-rossii-v-2024-godu-prognoz-sborov>; дата обращения 20 августа 2024 года). По расчетам АБ-Центра помимо рекордных валовых сборов 2023 год, также был отмечен высокими значениями урожайности культуры, составившими в среднем по промышленному сектору 29,01 тонн с гектара. Однако, резкое сокращение посевных площадей в 2024 году на 10,8% по сравнению с 2023 годом, в том числе в ключевых регионах возделывания, (<https://ab-centre.ru/news/posevnye-ploschadi-kartofelya-v-rossii-v-2024-godu-prognoz-sborov>; дата обращения 20 августа 2024 года) по

предварительным прогнозам, вероятнее всего, приведет к сокращению валовых сборов картофеля до уровня в 6,9 млн. тонн.

Среди всех сельскохозяйственных культур картофель занимает, пожалуй, первое место по поражаемости различными заболеваниями и повреждаемости вредителями. При этом благодаря вегетативному размножению картофеля развитие на нем возбудителей возможно в течение круглого года: летом - на ботве, а в период хранения – на клубнях. Клубни же являются и основным источником распространения инфекции для многих болезней.

Среди возбудителей болезней картофеля встречаются грибы, оомицеты, бактерии (в том числе фитоплазмы), вирусы и вириды. Впечатляет и список поражающих картофель вредителей: нематоды, колорадский жук, проволочники, подгрызающие и внутрисктебельные совки, картофельные блошки, паутинный клещ, различные виды тлей, клопов и т. д. (Иванюк и др., 2005).

Прямые потери от повсеместно распространенных бактериозов могут достигать 25 % урожая, а в отдельных регионах РФ в более влажные года эта цифра может доходить до 50–70 % (Катаева, 1972; Анисимов и др., 2009). Например, даже в семеноводческих хозяйствах на северо-западе страны ежегодно погибает до 20 - 30% продукции (Лазарев, Борисова, 2010). При этом к числу наиболее вредоносных бактериальных патогенов картофеля относят пектолитические бактерии, в частности представителей родов *Pectobacterium* и *Dickeya* (Лазарев, Базлеева, 1994; Лазарев, 1985; Надточий и др., 2014; Стацюк, Кузнецова, 2018), вызывающих черную ножку и мягкую гниль клубней. В производстве семенного картофеля эти заболевания являются следующими по экономической значимости после бактериального увядания, вызываемого *Ralstonia solanacearum*, опережая кольцевую гниль и обыкновенную паршу, вызываемые *Clavibacter michiganensis* subspp. *sepedonicus* (= *Clavibacter sepedonicum*) и *Streptomyces scabies*, соответственно (Van der Wolf, De Boer, 2007).

Достоверная диагностика является важным условием для предотвращения развития черной ножки и мягкой гнили картофеля, однако даже самые современные методы диагностики требуют постоянного совершенствования ввиду

обнаружения всё новых патогенных видов. Высокое генетическое разнообразие и сложные таксономические отношения внутри и между родами *Pectobacterium* и *Dickeya* (Pitman et al., 2008), обуславливают необходимость проведения постоянного мониторинга распространения возбудителей. Только детальное изучение изолированных штаммов позволяет создавать универсальные системы диагностики, основанные на актуальных данных филогенетического анализа и геномных исследованиях.

Несмотря на то, что в настоящее время, не существует сортов картофеля, обладающих полным иммунитетом к возбудителям черной ножки и мягкой гнили клубней, некоторые сорта и дикорастущие виды картофеля проявляют частичную устойчивость к данным заболеваниям (Стацюк, Кузнецова, 2018). Таким образом, селекция на устойчивость к патогенам из родов *Pectobacterium* и *Dickeya* является перспективным направлением борьбы с данными возбудителями. Однако, зачастую наблюдается отсутствие какой-либо корреляции между клубневой и стеблевой устойчивостью в ответ на заражение патогенами (Taylor et al., 2021), что усложняет селекцию и обуславливает необходимость применения в качестве эффективной методики проведение комплексной оценки устойчивости сортов по обоим признакам.

Всеобщая экологизация мер защиты растений (Huang et al., 2014; Ikeura, Koabayashi, 2015), определяет актуальность исследований направленных на поиск и применение нетоксичных антимикробных агентов в защите картофеля (Bhat et al., 2017), например, веществ растительного происхождения, представленных эфирными маслами и растительными экстрактами.

Несмотря на то, что основной источник распространения инфекции — это латентно инфицированные клубни, пектолитические бактерии могут сохраняться и в эпифитных популяциях, при этом на культуре всё чаще фиксируются комплексные поражения как бактериальными, так и грибными фитопатогенами. В этой связи особый интерес представляют медьсодержащие препараты широкого спектра действия, пригодные для обработки растений в течение вегетации, при этом не оказывающие фитотоксического действия на культуру.

**Степень разработанности темы.** Теоретические и практические основы научных исследований в области биологических особенностей возбудителей черной ножки и защиты картофеля от бактериозов были изложены в трудах многих исследователей (Попкова и др., 2005; Лазарев, 2013; Зейрук и др., 2020; Белов, Хютти, 2022; Варицев и др., 2022; Зайцев и др., 2018; Ерохова, Кузнецова, 2022a; Charkowski et al., 2006; Czajkowski et al., 2015a; Pérombelon, Salmond, 1995; Waleron et al., 2018a; Van der Wolf, De Boer, 2007). В значительной степени изучены биохимические свойства возбудителей, генетическое разнообразие патогенов, их вредоносность и распространенность, описаны методы диагностики, дана оценка эффективности некоторых мер борьбы с данными бактериозами. В последнее десятилетие рядом исследователей были описаны новые виды фитопатогенных пектолитических бактерий (Sarfranz et al., 2018; Waleron et al., 2019a; Waleron et al., 2019b), до недавнего времени не встречающиеся на территории РФ, однако, всё чаще обнаруживающиеся в различных регионах мира.

**Цель исследований:** Биологическое обоснование комплекса мер защиты картофеля от черной ножки.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи:**

1. Уточнение видового состава возбудителей чёрной ножки в посадочном материале картофеля различного географического происхождения.
2. Изучение биологических свойств основных групп возбудителей чёрной ножки картофеля.
3. Усовершенствование методов диагностики возбудителей черной ножки картофеля.
4. Оценка устойчивости сортов картофеля к возбудителям черной ножки и мягкой гнили.
5. Испытание эффективности применения антимикробных веществ растительного происхождения и химических пестицидов в защите картофеля от чёрной ножки.

**Научная новизна.** По итогам фитосанитарного мониторинга за 2020-2021 гг. в различных регионах РФ определено преимущественное преобладание видов *P. versatile*, *P. brasiliense*, *P. carotovorum* в популяциях возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля.

Впервые на территории Российской Федерации обнаружен возбудитель черной ножки и мягкой гнили картофеля *Pectobacterium punjabense*. Проведена характеристика биологических свойств данного патогена. Впервые в Российской Федерации разработана диагностическая тест-система, позволяющая дифференцировать штаммы *Pectobacterium punjabense* от других близкородственных видов из родов *Pectobacterium* и *Dickeya*, как в формате классической ПЦР, так и при постановке ПЦР в реальном времени.

Проведена комплексная оценка клубневой и стеблевой устойчивости 16 сортов картофеля на заражение возбудителями черной ножки и мокрой гнили.

Показан защитный эффект от применения фунгицида Ридомил® Голд Р (ООО «Сингента») по отношению к возбудителям черной ножки картофеля в условиях *in vitro* и по отношению к эпифитным популяциям патогенов.

Оценена антибактериальная активность 25 образцов эфирных масел и 7 образцов водных и этанольных растительных экстрактов по отношению к фитопатогенным бактериям из родов *Pectobacterium* и *Dickeya*. Для антибактериальных веществ растительного происхождения, отмеченных наибольшей бактерицидной активностью, показана эффективность профилактического и лечебного применения на искусственном инфекционном фоне.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Выявлены сорта картофеля, проявляющие комплексную устойчивость к возбудителям черной ножки и мягкой гнили клубней при искусственном заражении возбудителями бактериозов. Разработан метод ПЦР-диагностики, применимый для обнаружения штаммов возбудителей черной ножки *Pectobacterium punjabense*, и установлена его высокая чувствительность и видоспецифичность. Показана перспективность применения эфирных масел, растительных экстрактов и медьсодержащих



фунгицидов в защите картофеля от черной ножки, вызываемой патогенами из родов *Pectobacterium* и *Dickeya*.

**Методология и методы исследований.** Работа была выполнена с применением современного оборудования и с использованием общепринятых методик, разработанных ведущими учеными в этой области исследований, которые подробно изложены в главе «Материалы и методы исследований».

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Видовой состав и штаммовое разнообразие возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля.
2. Система диагностики возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля *Pectobacterium punjabense* методом ПЦР-РВ.
3. Комплексная устойчивость некоторых сортов картофеля к возбудителям черной ножки и мягкой гнили.
4. Эфирные масла, растительные экстракты и медьсодержащие фунгициды, способные снизить заражённость картофеля черной ножкой.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Работа выполнена с использованием современного оборудования и методик. Результаты всех экспериментов подвергнуты статистической обработке методом дисперсионного анализа. Основные результаты исследования были представлены на: Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 135-летию со дня рождения А. Н. Костякова (Москва, 2022); на Всероссийской конференции молодых исследователей «Аграрная наука-2022» (Москва, 2022); на V Всероссийском конгрессе по защите растений (Санкт-Петербург, 2024).

По материалам диссертации опубликовано 8 работ, в т. ч. 3 – в изданиях, включенных в перечень журналов, рекомендованных ВАК РФ, 1 – в издании, входящим в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и Web of Science. Получено 1 свидетельство о государственной регистрации базы данных.

**Структура и объем научно-классификационной работы (диссертации).**

Диссертационная работа изложена на 202 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы (глава I), материалов и методов исследований (глава II), экспериментальной части (главы III), заключения и библиографического списка. Диссертация иллюстрирована 19 таблицами и 45 рисунками. Библиографический список включает 338 литературных источников, в том числе 256 иностранных.

**Личный вклад соискателя.** Диссертационное исследование выполнено автором в процессе обучения в аспирантуре и является результатом оригинальных исследований. Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении лабораторных и вегетационных экспериментов, обзоре литературных источников, подготовке и написании публикаций, анализе и обобщении полученных результатов исследований, представленных в диссертации. Отдельные этапы экспериментов выполнены совместно с соавторами публикаций. Разработка программы исследований и выбор необходимых методов исследований выполнены под руководством научного руководителя.

**Благодарность.** Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю – д.б.н., профессору Ф.С.-У. Джалилову за квалифицированное руководство, координацию исследований и методическую помощь при проведении экспериментов и подготовке диссертации; д.б.н., профессору РУДН им. П. Лумумбы А.Н. Игнатову за методическую помощь и консультирование при постановке вегетационных опытов, анализе и интерпретации результатов, отображенных в настоящей работе. Автор благодарит коллектив компании ООО «Сингента», руководителя лабораторий технической поддержки и развития продуктов, к.б.н. Е.С. Мазурина и технического эксперта по картофелю и овощным культурам, к.б.н. С.Ю. Спиглазову за всестороннее содействие, консультирование и помощь при проведении исследовательской работы. Автор выражает признательность и благодарность сотрудникам ИБХ им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН д.х.н., член-корр. РАН К.А. Мирошникову, к.б.н. П.В. Евсееву, к.б.н. А.А. Лукьяновой за методическую

помощь и консультирование при постановке лабораторных экспериментов, идентификации бактериальных изолятов и проведении биоинформатического анализа данных. Автор благодарит научного сотрудника АНО ВО «Университет Сириус» к.б.н. М.В. Воронину за консультирование при подборе методик изоляции патогенов и создании искусственных инфекционных фонов; агронома ботанического сада «ФГАОУ ВО Первый МГМУ» имени И.М. Сеченова к.с.-х.н. Ю.Б. Рогачева за помощь в предоставлении образцов лекарственных растений; специалистов ГК «Союзснаб» П.А. Вьюшинского и М.А. Токмачеву за содействие в идентификации компонентного состава эфирных масел и растительных экстрактов.

Автор выражает благодарность и.о. директора института Агробиотехнологии, д.с.-х.н. А.В. Шитиковой, коллективам кафедры и лаборатории защиты растений, коллегам из НЦМУ «Агротехнологии будущего» за помощь и всестороннее содействие в проведении исследований, а также, своей семье, родным и друзьям, оказавшим поддержку в период выполнения диссертационной работы.

## ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### **1.1. Распространение и вредоносность черной ножки картофеля**

Пектолитические бактерий из родов *Pectobacterium* и *Dickeya* представляют собой грамотрицательные, факультативно анаэробные, не спорообразующие, подвижные, прямые палочки с перитрихальным расположением жгутиков. Эти близкородственные бактерии принадлежат к группе *Proteobacteria* и объединены в семейство *Pectobacteriaceae* (Adeolu et al., 2016). Представители обоих вышеупомянутых родов помимо картофеля поражают множество других овощных, плодовых и декоративных культур во всем мире (Pérombelon et al., 1989; Charkowski, 2006; Czajkowski et al., 2015a), в связи с чем были внесены в топ-10 основных бактериальных патогенов растений, ограничивающих урожайность и качество сельскохозяйственных культур (Mansfield et al., 2012). Например, *Dickeya chrysanthemi* вызывает заболевание у самых разных растений-хозяев (Ma et al., 2007; Samson et al., 2005), включая виды 16 семейств двудольных растений в 11 порядках и 10 семейств однодольных в 5 порядках (Ma et al., 2007). При этом ежегодные потери урожая картофеля от возбудителей черной ножки и мягкой гнили клубней составляют 10–15 %, а в эпифитотийные годы могут превышать 50 %.

В последние годы в мире отмечается значительные изменения видового состава возбудителей черной ножки картофеля и усиление их вредоносности. Это связано с более интенсивным международным обменом семенного картофеля, зачастую латентно инфицированного патогенами, а также с повышением весенне-летних температур в результате глобального потепления, более благоприятных для развития бактериозов, перезимовки патогенов и их переносчиков (насекомых, клещей и нематод), и отсутствием в схеме интегрированной защиты растений препаратов с эффективным бактерицидным действием.

На территории Российской Федерации основными возбудителями бактериозов картофеля долгое время считались два вида рода *Pectobacterium* — *P. atrosepticum* и *P. carotovorum* (Игнатов и др., 2015; Лазарев, Хютти, 2016; Лазарев

и др., 2017). Затем во многих европейских странах было отмечено поражение картофеля новыми представителями рода *Dickeya* (Лазарев, Хютти, 2016), которые долгое время считались возбудителями болезней полевых, декоративных и овощных культур, а начиная с 2009 года, первые случаи заболевания черной ножкой, вызванной *D. dianthicola* и *D. solani*, были зафиксированы в России и Белоруссии (Карлов и др., 2010; Лазарев, 2013; Игнатов и др., 2014; Ерохова, Дренова, 2014), возбудители которых, вероятно, были завезены с семенным материалом из западных стран (Виноградова и др., 2014). Таким образом, за период с 2009 по 2016 год вышеописанные виды распространились по всей территории Российской Федерации и к настоящему времени обнаружены во всех регионах страны (Зайцев и др., 2016), а также в Белоруссии, Молдове и Украине (Мороз, Патыка, 2011; Комар и др., 2013; Чэнное и др., 2022).

Вторая смена доминирующих видов пектобактерий произошла в 2017 г. В образцах картофеля начал возрастать процент обнаружений штаммов *P. parmentieri*, *P. brasiliense* и *P. carotovorum*, при этом *P. brasiliense* стал доминирующим видом в 2017 и 2018 гг. (Игнатов и др., 2019; Voronina et al., 2019a). В то же время штаммы *Dickeya* sp. практически не обнаруживались в России в период с 2017 по 2018 (Баранник и др., 2018; Voronina et al., 2019a).

В настоящее время таксономия пектолитических бактерий претерпевает значительные изменения, в результате чего идентифицируются всё новые виды патогенов (Czajkowski et al., 2015a). Так, *P. wasabiae* был впервые выделен в Японии на васаби (японском хрене) (Goto, Matsumoto, 1987), затем на картофеле в США в 2001 году (Ma et al., 2007) и в Новой Зеландии в 2008 году (Pitman et al., 2008). Затем *P. wasabiae* стал встречаться по всему миру, включая Европу, Южную Африку и Канаду, и научное сообщество согласно, что штаммы этого вида, вероятно, ошибочно идентифицировали как *P. carotovorum* в течение многих лет (Waleron et al., 2013). Однако детальный анализ этих штаммов с использованием геномных и фенотипических данных показал, что изоляты из картофеля таксономически отличаются от изолятов из васаби и, следовательно, представляют собой новый вид, получивший название *P. parmentieri* (Khayri et al., 2016). Также

отмечается, что *P. parmentieri* часто обнаруживают вместе с другими бактериями, вызывающими черную ножку, но он не является основной причиной этого заболевания, однако считается одной из основных причин гибели клубней в период хранения в Северном полушарии (Toth et al., 2021).

К числу недавно описанных видов пектобактерий, патогенных для картофеля, можно отнести *P. punjabense*, выделенный с картофельных полей в провинции Пенджаб в Пакистане в 2017 году (Sarfraz et al., 2018). Некоторые авторы относят этот вид к атипичным или редким, однако он способен вызывать у картофеля характерные симптомы черной ножки и мягкой гнили (Signa et al., 2021) и всё чаще выявляется в различных регионах мира. Например, среди образцов картофеля с симптомами болезни отобранных в Пенсильвании США в 2018 г. был обнаружен небольшой процент присутствия штаммов *P. punjabense* в числе прочих более распространенных пектолитических бактерий (Mainello-Land et al., 2024). Затем было опубликовано первое сообщение об обнаружении *P. punjabense* в Китае после вспышки черной ножки картофеля на полях в Чжанцзякоу провинция Хэбэй, в 2018 году и в Ниндэ провинция Фуцзянь в 2019 году (Handique et al., 2022). Также штаммы *P. punjabense* были впервые обнаружены в Сербии на полях в Зобнатице в июле 2019 года (Loc et al., 2022) и в Ахоме, на северо-западе мексиканского штата Синалоа в январе 2020 года (Palafox-Leal et al., 2024). Согласно недавно проведенному филогенетическому анализу штаммы *P. punjabense* также были обнаружены в коллекциях фитопатогенных бактерий, выделенных в США в 2015-2016 годах (Curland et al., 2021) и Европейских коллекциях фитопатогенов. Например, польский штамм *P. punjabense* IFB5596 был изолирован ещё в 1996 году, что говорит о том, что данный патоген всё-таки не является недавно возникшим видом, а присутствует за пределами Пакистана уже на протяжении последней четверти века как минимум. Таким образом истинное происхождение вида остается неизвестным.

Род *Dickeya* (=биотипы *P. (Erwinia) chrysanthemi*) - очень разнообразная группа пектолитических бактерий и, хотя виды *Dickeya* уже давно ассоциируются с черной ножкой картофеля в тропических и субтропических климатических

регионах, в Западной Европе изоляты *D. dianthicola* адаптированы к более низким температурам. Оптимальная температура роста этих "холодоустойчивые" штаммов была ниже, чем у других штаммов *D. dianthicola* (Janse, 1988).

Однако, с 2005 года в Европе была обнаружена новая генетическая группа, представляющая высоковирулентный вид *Dickeya solani* (Sławiak et al., 2009; Tsrgr et al., 2013). Причем, во многие страны патоген был завезен через международную торговлю семенным картофелем (Toth et al., 2011), и в начале 2000-х стал более значимым патогеном картофеля, чем *D. dianthicola*, поскольку способен вызывать болезни при более низкой концентрации бактериального инокулюма и вырабатывает больший набор ферментов, эффективнее разрушающих клеточную стенку растений. Вирулентность этого вида также обусловлена наличием у патогена эффекторных белков, секретируемых через транспортные системы T5SS/T6SS. При этом все обнаруженные изоляты *D. solani* были очень близки генетически, что предполагает недавнее происхождение, и, возможно, интродукцию в разных странах близкими клональными группами. В подтверждение этому было проведено сравнение результатов полногеномного секвенирования штаммов *D. solani*, обнаруженных в России в 2009 г., со штаммами, вызвавшими вспышку черной ножки в Нидерландах в 2007 г., в ходе которого выяснилось полное сходство между обеими группами (Khayri et al., 2016; Игнатов и др., 2018a). А обнаружение такой же генетической клады на водном гиацинте, позволяет предположить, что в недавнем прошлом данный патоген перешел на картофель в результате использования загрязненной оросительной воды (Sławiak et al., 2009). Международное распространение *D. solani* было также подтверждено в Китае (Chen et al., 2015) при обнаружении данной бактерии на луковицах гиацинта, импортированных из Нидерландов. Наличие перекрестной инфекции между декоративными хозяевами и картофелем было впервые обнаружено для *D. dianthicola* и *D. solani* в 2009 году (Parkinson et al., 2009). Схожий сценарий был описан для бактериальной сердцевидной гнили ананасов на Гавайях (Sueno et al., 2014), куда виды *Dickeya*, по-видимому, были завезены с посадочным материалом из Центральной Америки и Филиппин.

Несмотря на то, что первые сообщения об обнаружении *Dickeya* sp. на картофеле были зарегистрированы еще в 1972 г. в Нидерландах (Toth et al., 2011), на территории Российской Федерации эти фитопатогенные микроорганизмы были обнаружены лишь в 2009 г. (Карлов и др., 2011б). Однако за последние 10 лет заболевание достигло значительных масштабов, принося год за годом все больший недобор урожая в хозяйствах по всей стране. Так в период с 2009 по 2013 гг. процент встречаемости возбудителей черной ножки *D. dianticola* и *D. solani* на клубнях картофеля в РФ увеличивалась вдвое каждый год и выросла с 4 до почти 30% (Игнатов и др., 2011).

Среди возможных причин столь активного распространения возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля можно выделить три, наиболее распространенные.

Первая причина связана с глобальным изменением климата и, как следствие, с ежегодным повышением среднегодовой температуры, что является наиболее благоприятным условием для развития данных бактериозов, при одновременном снижении иммунитета к патогенным микроорганизмам (Игнатов и др., 2018б; Лазарев, Хютти, 2016).

Развитие черной ножки картофеля во многом зависит от абиотических факторов (температуры, относительной влажности воздуха, количества выпавших осадков и др.). Эти факторы также определяют длину инкубационного периода при развитии бактериоза. Болезнь причиняет наибольший вред в районах с достаточно высокой температурой (оптимальная температура для патогена 21-27°C) и при продолжительной влажной погоде (особенно при выпадении большого количества осадков и влажности воздуха выше 50%), однако каждый вид имеет свои температурные оптимумы наибольшей вредоносности, что и обуславливает постоянное изменение видового состава патогенов. Например, по сравнению с видом *P. atrosepticum*, у *P. carotovorum* шире географическое распространение и спектр растений хозяев. При этом *P. atrosepticum* чаще поражает картофель в регионах с умеренным климатом (Pemberton et al., 2005).



*P. brasiliense*, впервые выделенный и идентифицированный в Бразилии (Duarte et al., 2004), является основной пектолитической бактерией в тропических и субтропических регионах (Южной Африки и Бразилии), и также вызывает множество проблем в Канаде (De Boer et al., 2012) и в других странах. В 2012 году этот вид был обнаружен в Нидерландах (Nunes Leite et al., 2014), а в 2014 году сообщалось, что данный вид является основной бактерией, вызывающей черную ножку в Швейцарии, обнаруженной более чем на 80 % всех растений с симптомами заболевания (De Werra et al., 2015). В России штаммы *P. brasiliense* также были впервые обнаружены в 2012 году (Игнатов и др., 2018б). При этом несмотря на генетическую близость к *P. carotovorum*, данный вид, по-видимому, более агрессивен, что подтверждено испытаниями в Нидерландах по инфильтрации клубней картофеля суспензией патогена (Duarte et al., 2004).

Устойчивость растений и температура играют важную роль в дифференциации степени патогенности возбудителей мягкой гнили и черной ножки картофеля (Pérombelon, Salmond, 1995; Liaqat et al., 2022; Rossmann et al., 2020). Для каждого из видов пектолитических энтеробактерий определен специфический диапазон температур, при которых они развиваются активнее. *Pectobacterium atrosepticum* быстрее размножается и более агрессивен при низких температурах (<25 °C), по сравнению с *Dickeya* sp. (>25 °C) (Hélias et al., 2000; Pérombelon, Salmond, 1995). *Pectobacterium brasiliense* более вредоносен в субтропическом климате и в условиях защищенного грунта и, вероятно, чаще находится в латентной форме в условиях умеренного климата (Toth, 2022). В целом оптимальные температуры для развития видов рода *Dickeya* выше, чем для *Pectobacterium* sp., поэтому *Dickeya* шире представлены в сухих тропических и субтропических районах (Pérombelon, Salmond, 1995; Liaqat et al., 2022).

Вторая причина обусловлена наличием у пектобактерий особого типа регуляции вирулентности (Alfano, Collmer, 2004; Charkowski et al., 2012), называемого «Quorum Sensing», благодаря которому патоген может долго находиться в латентной фазе и переходить к активному заражению растения лишь при достижении пороговой плотности популяции бактерий, информация о которой

передается за счет пептидных сигнальных молекул аутоиндукторов (AI). В результате клубни со скрытой формой инфекции могут распространяться на огромные расстояния, пересекая национальные границы.

Третья причина обусловлена тем, что пектобактерии могут сохраняться как эндофитно, так и эпифитно. Они способны накапливаться в ризосфере, водоемах и на поверхности растений с последующим заражением здоровых растений.

Пектолитические бактерии не зимуют в почве вне растительных остатков, однако могут накапливаться в ней в течение некоторого времени (от 1 недели до 6 месяцев), в зависимости от условий окружающей среды, таких как температура почвы, влажность и pH (Gudmestad, Secor, 1983), а также переноситься за счет свободной почвенной влаги, например, при поливе или дожде, к соседним растениям, свободным от патогенов. Наличие же в почве растительных остатков, например, сорных растений-хозяев, существенно увеличивает продолжительность выживаемости бактерий (Larwood, Harris, 1982). При этом изоляты *Pectobacterium* чаще встречаются в пробах почвы, чем изоляты *Dickeya* (Peltzer, Sivasithamparam, 1988), что подтверждают исследования, проведенные в Нидерландах, в результате которых штаммы *Pectobacterium* демонстрировали выживаемость на 42 день от начала эксперимента по сравнению с 7 днями для штаммов *Dickeya* (Van der Wolf et al., 2009).

Наличие пектолитических бактерий в пресноводных водоемах по всему миру подтверждается многочисленными сообщениями из разных стран, включая Австралию, Финляндию, Францию, Малайзию, Польшу, Великобританию, Испанию, Швейцарию и США (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2019; McCarter-Zorner et al., 1984; Harrison et al., 1987; Laurila et al., 2010; Oulghazi et al., 2019a; Parkinson et al., 2014; Pédrón et al., 2019; Sueno et al., 2014). При этом в последнее время всё больше новых видов *Pectobacterium* и *Dickeya* обнаруживается именно в пробах воды. Так недавно были описаны виды *P. aquaticum*, *P. fontis*, *P. polonicum*, *D. aquatica*, *D. lacustris* и *D. undicola*. Однако, несмотря на то что все перечисленные виды в той или иной мере патогенны для картофеля, до сих пор только *D. aquatica* была обнаружена на пораженных растениях (Zaczek-Moczyłowska et al., 2019).

Несмотря на то, что чаще всего обнаружение патогенов сопряжено с близким расположением зараженных сельскохозяйственных земель, нередки случаи их обнаружения в высокогорных альпийских водах, снегах, водопадах, дождевой, речной, морской, питьевой и грунтовой воде (Pédron et al., 2019; McCarter-Zorner et al., 1984; Harrison et al., 1987; Waleron, 2019b). При этом, исследования, проведенные Van Doorn et al. (2011) показывают, что штаммы *Dickeya* всего несколько часов способны выживать в дождевой воде по сравнению со штаммами *P. atrosepticum* и *P. carotovorum*, выживаемость которых с незначительной потерей жизнеспособности превышает 5 месяцев.

Многочисленные сообщения указывают на контаминацию этими патогенами поверхностных вод (Gudmestad, Secor, 1983; McCarter-Zorner et al., 1984; Peltzer, Sivasithamparam, 1988) и потенциальное заражение растений через поливную воду (Franc, Harrison, 1987). Например, в Финляндии, группа штаммов биовара 3 *Dickeya* sp., была обнаружена в речной воде и в то же время в семенном картофеле (Degefu et al., 2013). Следовательно, пресноводные источники, используемые для орошения, с высокой вероятностью являлись источником инфекции для растений.

В своих исследованиях Karjalainen с соавторами установили, что *Pectobacterium* sp. может сохранять жизнеспособность на увлажненных листьях картофеля, а также размножаться на них (Karjalainen et al., 2000). Burgess et al. заметили увеличение эпифитной популяции пектобактерий на листьях картофеля в конце вегетационного периода (Burgess et al., 1994), откуда бактерии могут распространяться на клубни во время сбора урожая в результате смыва дождем (Pasanen et al., 2020b). Такой способ распространения эпифитной популяции патогенов был доказан, в частности, для *P. parmentieri* (Kastelein et al., 2021).

Помимо смыва эпифитной популяции патогенов дождевой водой в почву с последующим заражением клубней, была отмечена способность пектобактерий проникать с поверхности листа в сосудистую систему растения. Так, при проведении ряда экспериментов, в которых стебли и сильно поврежденные листья растений инокулировали высокой плотностью патогенов, было зафиксировано перемещение бактерий по водной поверхности к естественным отверстиям -

гидатодам и устьицам. Помимо прочего пектобактерии способны продуцировать пептидный токсин коронатин, предотвращающий закрытие устьиц и тем самым способствующий проникновению бактерий в мезофилл листа (Pasanen et al., 2020b). При этом бактерии с листьев среднего яруса по сосудистой системе перемещались к верхушке растения и далее - вниз по стеблям, к столонам и дочерним клубням (Czajkowski et al., 2011), попутно передавая инфекцию в клубни нового урожая.

С 1920-х годов выдвигалась гипотеза, что насекомые могут служить альтернативными хозяевами для патогенных бактерий растений или действовать, как переносчики патогенов. В одном из первых предположений было высказано, что личинки ростковой мухи *Delia platura* откладывают яйца возле семенных клубней вскоре после посадки, и вероятно, переносят пектолитические бактерии в клубни, проникая в них (Leach, 1926). Позже экспериментально было доказано, что *D. platura* переносила клетки *P. carotovorum* с гнилых клубней в ранки на растениях картофеля (Phillips, Kelman, 1982). Аналогичный эксперимент с *Drosophila melanogaster* подтвердил передачу патогенов от зараженных к здоровым растениям картофеля, а искусственная инокуляция штаммами *P. carotovorum* и *P. atrosepticum* в *D. melanogaster* показала, что бактерии могут передаваться поврежденным растениям в полевых условиях (Клоеппер et al., 1981). Также было обнаружено, что патогены выживают как снаружи, так и внутри *D. melanogaster* и *D. buskii*, причем некоторые штаммы сохраняются в *Drosophila* sp. не менее 72 ч (Brewer et al., 1981). Позднее было выяснено, что геном некоторых изолятов *Pectobacterium* sp. содержит ген *evf*, который кодирует фактор вирулентности, обеспечивающий их сохранение в кишечнике насекомых (Shirshikov et al., 2018).

Тем не менее не для всех вредителей характерно наличие пектолитических бактерий, как части своего микробиома. Например, в лабораторных экспериментах штамм *D. dadantii* был способен размножаться и приводить к гибели гороховой тли *Acyrtosiphon pisum* через 4–5 дней после проглатывания инокулюма, содержащего всего  $10^2$  бактериальных клеток (Costechareyre et al., 2012). При этом пчела *Apis mellifera*, листовертка *Spodoptora littoralis* и муха *Drosophila melanogaster* не пострадали при проглатывании патогена.

Помимо насекомых, недавно было обнаружено, что нематоды и брюхоногие моллюски также могут служить переносчиками пектолитических бактерий. Например, штаммы *D. dadantii* и *P. carotovorum* были обнаружены в микробиоме кишечника черного слизня *Arion ater* (Joynson et al., 2017), характеризующегося способностью преодолевать большие расстояния и выживать в условиях зимних заморозков. А результаты экспериментов с нематодой *Caenorhabditis elegans* показали, что введение *P. carotovorum*, *P. atrosepticum* или *P. wasabiae* в нематоду, с последующим помещением вредителей на поверхностно стерилизованные клубни картофеля, уже через 2 дня приводило к появлению симптомов мягкой гнили (Nykyri et al., 2014).

Несмотря на то, что возбудители черной ножки и мягкой гнили картофеля имеют повсеместное распространение, а также способны к выживанию в ризосфере сорняков и распространению посредством почвенной влаги, воздушно-капельным путем и за счет насекомых-переносчиков, видовой состав патогенов может существенно различаться в зависимости от региона возделывания культуры, климата и торговой политики страны. К сожалению, климатические изменения, происходящие в настоящее время могут в значительной степени умножить величину экономического ущерба, наносимого пектолитическими бактериями в будущем. Только обмен достоверной информацией об обнаружении и распространении различных видов возбудителей между странами может способствовать оперативной борьбе с заболеваниями и предотвращению эпифитотий в регионах возделывания картофеля.

## **1.2. Биологические свойства и систематика возбудителей черной ножки картофеля**

В 1917 году был определен род *Erwinia*, названный в честь американского фитопатолога Эрвина Ф. Смита – первооткрывателя многих бактериальных болезней растений, и включающий всех представителей *Enterobacteriaceae*, патогенных для растений, как среди пектолитических (*E. carotovora subsp. carotovora* и *E. carotovora subsp. atroseptica*), так и непектолитических (*E. amylovora* и *E. stewartii*) видов (Winslow et al., 1920). Позже данный род был дополнен тремя

другими патогенами, подвидами *E. carotovora*, такими как *E. carotovora subsp. betavascularum*, вызывающим сосудистый некроз сахарной свеклы (Thomson et al., 1981), *E. carotovora subsp. wasabiae*, поражающим корневища японского хрена (васаби) (Goto, Matsumoto, 1987), и *E. carotovora subsp. odorifera* - возбудителем слизистой гнили цикория (Gallois et al., 1992).

В 1953 году Burkholder et al. описали новый вид *E. chrysanthemi*, патогена хризантемы (Burkholder et al., 1953). Однако, позднее выяснилось, что данный вид очень гетерогенен по фенотипическим признакам и растениям-хозяевам. Таким образом, вид *E. chrysanthemi* был разделен на шесть патоваров в соответствии с различиями в патогенности по отношению к растениям-хозяевам, а именно на: *pvs. chrysanthemi, dianthicola, dieffenbachia, paradisiaca, parthenii* и *zeae* (Dye et al., 1980; Young et al., 1996). Однако, и эта классификация была неудобна из-за сложностей в воспроизведении биотестов и заражения растений-хозяев. Были предложены альтернативные методы характеристики всех штаммов рода *Erwinia*, включая классификацию штаммов с разделением на серовары при помощи серологических проб (De Boer et al., 1979) или на биовары, с использованием биохимических тестов (Dye, 1969), которые также не всегда воспроизводились.

Фундаментальные изменения в систематике произошли благодаря достижениям молекулярно-генетического анализа ДНК, позволившим изучить взаимоотношения между видами и подвидами внутри рода *Erwinia*. Так, основываясь на методе филогенетического анализа нуклеотидной последовательности, кодирующей ген 16S рРНК, позволившим изучить взаимоотношения между видами и подвидами внутри рода *Erwinia*, Hauben с соавторами (1998) объединили представителей пектолитических бактерий в род *Pectobacterium*, приняв более раннее предложение Waldee (1945), который предложил включить все пектолитические энтеробактерии в один род. Позднее вид *Pectobacterium chrysanthemi* (Hauben et al., 1998) был перенесен в новый род *Dickeya*, названный в честь известного американского фитобактериолога Роберта С. Дики и разделен на шесть видов на основании данных ДНК-ДНК гибридизации, которые в значительной степени соответствуют предыдущей классификации по

патогенам (Samson et al., 2005), а именно: *Dickeya chrysanthemi*, *D. dadantii*, *D. dianthicola*, *D. zeaе*, *D. paradisiaca* и *D. diffenbachiae* (Samson et al., 2005). Последний был затем переклассифицирован как подвид *D. dadantii* subsp. *diffenbachiae* (Brady et al., 2012).

Современная классификация рода *Dickeya* включает 12 признанных видов: *D. aquatica* (Parkinson et al., 2014), *D. chrysanthemi* (Samson et al., 2005), *D. dadantii* (subsp. *dadantii* и subsp. *dieffenbachiae*) (Samson et al., 2005; Brady et al., 2012), *D. dianthicola* (Samson et al., 2005), *D. fangzhongdai* (Tian et al., 2016), *D. lacustris* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2019), *D. oryzae* (Wang et al., 2020), *D. paradisiaca* (Samson et al., 2005), *D. poaceiphila* (Hugouvieux-Cotte-Pattat et al., 2020), *D. solani* (Van der Wolf et al., 2014b), *D. undicola* (Oulghazi et al., 2019b), *D. zeaе* (Samson et al., 2005).

Анализ геномных последовательностей, доступных в настоящее время в благодаря использованию секвенирования нового поколения (NGS) для характеристики бактериальных штаммов привело к пересмотру и уточнению таксономического положения видов (Pitman et al., 2008). Так, род *Pectobacterium* долгое время включал в себя множество различных подвидов. Например, вид *P. carotovorum* был разделен на *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*, *P. carotovorum* subsp. *actinidiaе* (Ben Moussa et al., 2021). Чтобы избежать несоответствия между таксономическим статусом вида и подвида внутри этой большой клады, все подвиды в рамках рода *Pectobacterium* недавно были повышены до уровня вида (Portier et al., 2019), а также описаны некоторые новые виды. Например, ряд различных авторов определили, что некоторые изоляты картофеля, описанные как *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, более схожи по биохимическим характеристикам с *P. wasabiaе* (Waleron et al., 2013), после чего на основании сравнения многочисленных геномных анализов изоляты были перегруппированы в новый вид *P. parmentieri* (Khayі et al., 2016). Это помогло отличить эти картофельные изоляты от изолятов, описанных ранее, как патогены васаби (Goto, Matsumoto, 1987). Аналогично изоляты патогенов, поражающие картофель в

Пакистане и Перу, которые таксономически сходны с *P. wasabiae* и *P. parmentieri*, вновь были проанализированы геномными методами и описаны как новые виды, названные *P. punjabense* (пакистанские изоляты) и *P. peruviense* (перуанские изоляты) (Sarfraz et al., 2020; Waleron et al., 2018b).

В настоящее время род *Pectobacterium* включает в себя 19 легитимно описанных видов: *P. actinidiae* (Portier et al., 2019), *P. aquaticum* (Pédron et al., 2019), *P. aroidearum* (Nabhan et al., 2013), *P. atrosepticum* (Gardan et al., 2003), *P. betavasculorum* (Gardan et al., 2003), *P. brasiliense* (Portier et al., 2019), *P. cacticidum* (Alcorn et al., 1991), *P. carotovorum* (Portier et al., 2019), *P. fontis* (Oulghazi et al., 2019a), *P. odoriferum* (Portier et al., 2019), *P. parmentieri* (Khayati et al., 2016), *P. parvum* (Pasanen et al., 2020b), *P. peruviense* (Waleron et al., 2018b), *P. polaris* (Dees et al., 2017), *P. polonicum* (Waleron et al., 2019b), *P. punjabense* (Sarfraz et al., 2018), *P. versatile* (Portier et al., 2019), *P. wasabiae* (Gardan et al., 2003), *P. zantedeschiae* (Waleron et al., 2019a).

Типичными симптомами черной ножки картофеля, вызываемой как видами *Pectobacterium*, так и видами *Dickeya*, являются некротизация прикорневой части стебля, которая приводит к поражению сосудистой системы, мягкой слизистой гнили паренхимы стебля и последующей гибели растения.

На начальной стадии заболевания верхние листья пораженных стеблей становятся светло-зелеными или желтыми, начинают сворачиваться и растут под острым углом (Дорожкин, Бельская, 1979; Воловик, Шнейдер, 1987), может наблюдаться выпадение всходов или замедление роста растений. Затем наступает стадия увядания, вызванная закупоркой сосудов ксилемы бактериальной массой, весь стебель ослабевает и погибает (Ерохова, Кузнецова, 2022б). Чернеет чаще всего только базальная часть стебля (черная ножка), но при повышенной влажности гниль может распространяться вверх. При засушливых погодных условиях, напротив гниль на стебле может не развиваться вовсе, а наблюдается усиленное увядание растений с усыханием листьев и стеблей (Tsrer et al., 2009, Tsrer et al., 2013). Если инфекция проникла в наземную часть растения в результате травмирования стебля, преимущественно при повышенной влажности и избыточном орошении, может



наблюдаться аэральная форма черной ножки (воздушная гниль стебля) (Ерохова, Кузнецова, 2022б, 2023).

Основным источником инфекции считают латентно инфицированные семенные клубни, от которых через столоны к клубням нового урожая распространяется патоген (Воловик, Шнейдер, 1987). Пектолитические бактерии также могут проникать в растительную ткань клубня в области чечевичек и механических повреждений, выступающих в роли ворот для инфекции (Попкова, 2005; Анисимов и др., 2009; Зейрук и др., 2020). В результате патологических процессов ткани клубней размягчаются до кремообразной консистенции (мягкая гниль), которая чернеет в присутствии воздуха, позднее, когда в гнилостный процесс включаются прочие патогены (сапротрофные и полусапротрофные микроорганизмы), возникает характерный запах гниения (Воловик, Шнейдер, 1987). При этом важным фактором, определяющим интенсивность развития черной ножки, является уровень влажности почвы. Высокая влажность почвы способствует образованию вокруг клубней слоя влаги и приводит к анаэробнозису, провоцирующему раскрытие чечевичек и повышению проницаемости клеточных мембран (Pérombelon, 2002).

В зависимости от погодных условий и видового состава возбудителей симптоматика черной ножки и мягкой гнили картофеля может существенно варьировать. Например, по данным израильских и европейских исследователей симптомы на листьях традиционно связанные с *D. dianthicola*, возникают в жарких и засушливых условиях выращивания. Основной симптом - увядание верхних листьев с последующим усыханием краев и, а затем и всего листа, при этом внешне стебли обычно остаются зелеными до полного высыхания листьев. Часто поражается только один стебель растения. Развитие симптомов обычно начинается с гниения материнского клубня, но симптомы мягкой гнили не всегда распространяются вверх по столону или стеблю, как это наблюдается в случае черной ножки, вызванной *P. atrosepticum* (Parkinson et al., 2009). Зачастую симптомы, вызванные *Dickeya* sp. сложно отличить от увядания, вызванного *Verticillium dahliae* или естественным старением растений (Tsror et al., 2009).

Симптомы на клубнях, вызванные *Dickeya* sp. также могут быть приняты за другие бактериальные заболевания картофеля, включая бурую гниль (вызываемую *Ralstonia solanacearum*) и кольцевую гниль (вызываемую *Clavibacter michiganensis* subspp. *sepedonicus*), которая в некоторых случаях, как и *D. solani*, приводит к обесцвечиванию и некрозу сосудистого кольца на новых клубнях. Также штаммы *Dickeya* способны вызвать поражение растений при более низкой инфекционной нагрузке, чем *Pectobacterium* и характеризуются значительно большей агрессивностью.

Для появления черной ножки на растении картофеля и ее последующего распространения в поле требуются три основных фактора, известных как треугольник болезней: наличие вирулентного патогена, благоприятные условия окружающей среды и восприимчивое растение-хозяин (Попкова, Шнейдер, 1979). Учитывая, что абсолютно устойчивых к пектолитическим бактериям сортов картофеля не существует (Czajkowski et al., 2015a), возникновение и распространение болезни в основном обусловлено наличием и источниками первичного инокулюма (семена, почва, насекомые, ирригационные системы и машины).

В ходе серии опытов в Англии и Нидерландах была оценена сравнительная агрессивность видов бактерий родов *Dickeya* и *Pectobacterium*. При инокуляции штаммом *D. solani* клубней, заболевание равнозначно развивалось на всех зараженных клубнях, как при 21°C, так и при 27°C. Однако, при повторении опыта со штаммом *P. atrosepticum* процент зараженных клубней при 21°C был значительно меньше, а при 27°C заболевание не развивалось вовсе (Karjalainen et al., 2000; De Naan et al., 2008).

Аналогичная серия опытов проводилась на 40 разных штаммах *D. solani*, где в биотестах оценивали степень мацерации клубней после инокуляции суспензиями патогенных бактерий с последующим инкубированием в течение 48 часов при 30°C. В итоге вариабельность между штаммами была достаточно высока, а объем мацерации клубней составлял от 0–4 до 4–10 г мацерированной ткани (Van der Wolf et al., 2021a).

Важным фактором окружающей среды для развития черной ножки является уровень влажности почвы. Анаэробиз подавляет кислородо-зависимую устойчивость хозяина, позволяя бактериям размножаться и вырабатывать ферменты, разрушающие клеточную стенку, что и приводит к мацерации растительной ткани (Samson et al., 2005).

Конкуренция внутри гниющих клубней, модулируемая условиями окружающей среды, особенно температурой, определяет, какой патоген будет преобладать, если в них присутствует более одного вида (Вакау, 2014). При этом важно отметить, что бактериальное сообщество, присутствующее в гниющих тканях картофеля, может включать несколько различных видов патогенов и сапротрофов, которые действуют синергетически, подавляя иммунитет растений, но при этом интенсивно конкурируют за питательные вещества. Так, бактерии мягкой гнили могут активно взаимодействовать с другими патогенами, особенно сосудистыми, такими как *Ralstonia solanacearum*, *Fusarium* sp., *Verticillium* sp. и *Rhizoctonia solani* (Czajkowski et al., 2015b; Nykyri et al., 2012).

Патогенность возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля обусловлена их способностью секретировать ряд ферментов пектиназ, целлюлаз, фосфолипаз, протеиназ и т. д. (plant cell wall degrading enzymes - PCWDE) (Рагозина и др., 1969; Стацюк, Кузнецова, 2018; Pöllumaa et al., 2012), под действием которых подавляются защитные реакции растений, что способствует размножению фитопатогенов и приводит к разрушению клеточных стенок растений с последующей обширной мацерацией растительных тканей.

Бактериальные патогены используют несколько специализированных систем секреции для транспортировки различных белков из бактериальной клетки. Эти белки важны для бактериального патогенеза. Для грамотрицательных бактерий были идентифицированы шесть типов секреции, однако, для пектобактерий наиболее исследованы только три. Сравнение 84 геномов пектобактерий показало, что все проанализированные геномы содержат по меньшей мере две системы секреции типа I (T1SS), одна из которых, возможно, участвует в секреции протеаз, а вторая - адгезинов, необходимых для прочного прикрепления клеток к субстрату

растения-хозяина и повышения вирулентности (Pérez-Mendoza et al., 2011). Система секреции II типа (T2SS) обладает важной функцией повышать вирулентность пектобактерий за счёт участия в секреции, разрушающих клеточную стенку пектиназ и целлюлаз и пептида, индуцирующего некроз (Nip) (Pasanen et al., 2020b). Система секреции III типа (T3SS) участвует в транслокации эффекторных белков в растительную клетку, способствующих подавлению защитных механизмов растения, повышая вирулентность патогенов. Если эффекторный белок распознается белком устойчивости растений к болезням, запускается реакция сверхчувствительности растения (HR), которая является защитным механизмом, проявляющимся в виде локальной гибели клеток вокруг места заражения, что предотвращает распространение патогена (Alfano, Collmer, 2004). Однако, пектолитические бактерии в основном являются некротрофами, которые размножаются в мертвых тканях, и поэтому HR повышает их вирулентность. Отмечается, что вирулентность *P. carotovorum*, *P. atrosepticum* и *P. versatile* на листьях картофеля и табака зависит от секреции эффекторного белка DspE T3SS в ткани хозяина, где он вызывает некроз и гибель клеток, а также участвует в активации фосфатазы, способствующей размножению патогена (Degrave et al., 2015). Именно эти пектолитические ферменты в сочетании с другими факторами вирулентности ответственны за проявление заболевания в виде характерной для черной ножки картофеля слизистой мацерации тканей растения.

История таксономии возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля насчитывает уже более 100 лет, за которые ныне описанные рода *Pectobacterium* и *Dickeya* претерпевали постоянные изменения. Появление молекулярно-генетических и геномных методов позволяет обнаруживать всё новые виды пектолитических бактерий, что приводит к постоянному пересмотру ранее используемых классификаций, однако несомненно приближает нас к пониманию сложных эволюционных взаимосвязей между родами и видами фитопатогенных бактерий.

Взаимодействие между патогенами и их хозяевами представляет собой многоступенчатый процесс, в ходе которого патогену приходится адаптироваться

к условиям окружающей среды, существующим в организме хозяина, избегая при этом защитных реакций растения. Результат такого взаимодействия зависит как от вида патогена, так и от внешних условий окружающей среды и физиологического состояния самого растения, и может выражаться в формировании мягкой гнили клубня, черной ножке стебля, признаках увядания растения или протекать бессимптомно до наступления благоприятных условий.

### **1.3. Диагностика черной ножки и мягкой гнили картофеля**

В настоящее время доступен широкий спектр надежных методов обнаружения патогенов *Pectobacterium* sp. и *Dickeya* sp. - от выделения в чистую культуру на селективных питательных средах до молекулярно-генетических методов идентификации и дифференциальной диагностики видов.

Тем не менее, после отбора проб большинство диагностических методов требуют выделения жизнеспособных клеток из образцов, их культивирования и очистки изолятов перед анализом. Для этого из симптоматических тканей рекомендуется брать около 1 см пробы, из того места, где гниль переходит в непораженную ткань, чтобы избежать подавления роста целевых бактерий со стороны сапротрофных популяций. При латентной инфекции бактерии могут быть обнаружены во всех тканях растения, однако их плотность обычно невелика и редко превышает  $10^3$  колониеобразующих единиц (КОЕ)/г растительной ткани. В стеблях бактерии чаще всего встречаются в нижней части, не выше 15–20 см над уровнем почвы, в то время как в клубнях они чаще всего присутствуют в столонной части, но могут встречаться в чечевичках и в местах механического повреждения клубней. Для выделения бактерий из латентно инфицированных клубней картофеля рекомендуется в качестве исходного материала использовать измельченную полоску кожуры, охватывающую конец столона, либо участков перидермы со столонного конца клубня (Van der Wolf et al., 2021a).

После измельчения растительных тканей в буфере или стерильной воде образец центрифугируют, чтобы сконцентрировать бактерии, и используют супернатант для посева на среды (Humphris et al., 2015). Для защиты бактериальных клеток от окислительного стресса, вызванного высвобождением растительных

соединений во время пробоподготовки, обычно используется 0,05 %-ный раствор антиоксиданта ДИЕСА (диэтилдитиокарбаминовая кислота) (Toth et al., 2011).

Как правило, образцы почвы и воды, а также части растений без явных симптомов болезни из-за низкой численности бактериальных клеток в пробах (часто менее  $10^1$  КОЕ/мл) перед посевом на среды дополнительно обогащают. Для этого образец десятикратно разбавленный РЕВ (бульон для обогащения, содержащей полипектат натрия в качестве единственного источника углерода) (Meneley, Stanghellini, 1976) инкубируют в анаэробных условиях (Pérombelon, 2002), чтобы ограничить размножение сапротрофных бактерий, в то время как рост пектолитических бактерий усиливается. Обогащение в течение одного дня в РЕВ при комнатной температуре помогает селективно увеличить количество целевых бактерий перед посевом на полуселективные среды.

Загрязнение пробы с целевыми бактериями-сапротрофами возможно избежать, проведя стадию иммуномагнитного разделения (IMS) перед посевом на селективные среды (Czajkowski et al., 2015a). В IMS образуются комплексы, состоящие из целевых бактериальных клеток, связанных со специфичными для целевых бактерий поверхностно-направленными антителами, которые затем связываются с белком А в сочетании с парамагнитными частицами. Эти комплексы могут быть выделены при воздействии сильного магнитного поля, что обеспечивает быстрое и эффективное выделение и концентрирование целевых бактериальных клеток, которые затем можно высевать на селективные питательные среды.

Самая распространенная среда для выделения возбудителей черной ножки и мягкой гнили из тканей растений, почвы и воды - это полуселективная пектатная среда СVP (Hélias et al., 2012). Её селективность основана на присутствии пектина в качестве основного источника углерода и добавлении красителя «кристаллического фиолетового», который ингибирует рост грамположительных бактерий. Пектолитические бактерии расщепляют пектин и образуют на среде характерные глубокие лунки, однако данные лунки часто содержат нецелевые бактерии, что требует дополнительной очистки культуры на других средах.

При приготовлении среды CVP источник пектина имеет решающее значение, поскольку он должен обладать сильной желирующей способностью и при этом быть нетоксичным, чтобы обеспечить высокий уровень извлечения всех видов возбудителей. На данный момент доступны только два коммерческих источника пектина: Aldrich (пектин из кожуры цитрусовых P3850) и Agdia (DIPECTA, AG366), поставляемые компаниями Sigma. При этом последний является наиболее предпочтительным для исследований и диагностики пектолитических бактерий (Helias et al., 2012).

Также известно несколько других полуселективных сред для выделения пектолитических бактерий, но они широко не используются. Наиболее перспективной является среда Пирса, которую модифицировали из среды Миллера-Шрота (Van der Wolf et al., 2021a). В этой среде агар заменяется полипектатом натрия, а для буферизации pH используется NaOH и MOPS (3-морфолинопропан-1-сульфоная кислота). Колонии *Pectobacterium* и *Dickeya*, растущие на этой среде, образуют розово-красно-оранжевые лунки, в то время как рост сапротрофных бактерий либо подавлен, либо не приводит к образованию лунок.

В 1966 году впервые было обнаружено, что виды *Dickeya* продуцируют синий пигмент под названием индигоидин, который обеспечивает бактериям защиту от активных форм кислорода во время заражения растений и который не продуцируют другие пектобактерии. Этот факт позволил разработать среду NGM, содержащую глицерин и хлорит марганца, на которой виды *Dickeya* образуют синие колонии. Данная среда была успешно использована для дифференциации *D. solani* и *D. dianthicola* от *Pectobacterium* sp., выделенных из растений с симптомами. Однако, как позже выяснилось, не все штаммы *Dickeya* sp. продуцируют синий пигмент при выращивании на данной среде (Toth et al., 2011).

В настоящее время в качестве стандартного метода идентификации фитопатогенов применяют методы ПЦР-диагностики, основанные на амплификации специфичных для целевого микроорганизма последовательностей ДНК, которые могут быть выбраны с учетом специфичности на любом уровне

таксономической организации, таком как род, вид или подвид. Эти подходы включают классическую ПЦР (De Boer, Ward, 1995; Nassar et al., 1996; Kang et al., 2003), количественную ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ, qPCR) (Pritchard et al., 2013; Kim et al., 2011), мультилокусное типирование последовательностей (MLSA/MLST), мультиплексную идентификацию с использованием флуоресцентно меченных зондов и петлевую изотермическую амплификацию (LAMP) (Yasuhara-Bell et al., 2017).

Хотя анализы на основе ПЦР значительно менее трудоёмки, чем методы с использованием посева на среды и биохимическое профилирование, а также более специфичны, чем серологические тесты, ПЦР-анализ всё же имеет свои недостатки. Во-первых, при проведении анализа невозможно отличить наличие жизнеспособных бактериальных клеток от нежизнеспособных, которые в определенных условиях могут сохранять амплификабельную ДНК в течение длительного времени. Это ограничение может быть частично преодолено за счет использования соединений, которые могут специфически связывать ДНК, высвобождающуюся из мертвых клеток, таких как моноазид пропидия (Parkinson et al., 2009).

Во-вторых, все еще существует вероятность получения ложноположительного результата с нецелевыми микроорганизмами, имеющими аналогичные последовательности нуклеотидов, еще не определенные или не опубликованными в международных базах данных. Кроме того, высокое разнообразие целевых бактерий обуславливает вариации в геноме бактериальной популяции, что может приводить к ложноотрицательным результатам. Например, набор праймеров (dia-A), широко используемый в США для диагностики возбудителей черной ножки, не смог обнаружить наличие *D. dianthicola* в образцах картофеля в период эпифитотии, поскольку в соответствующем бактериальном штамме была делеция целевого участка для посадки праймера (Pritchard et al., 2016).

Разработка специфических праймеров для диагностики осложняется и историей таксономического разделения пектобактерий, которая претерпела



несколько существенных пересмотров классификации. Зачастую это приводит к тому, что штаммы в коллекциях культур и онлайн-базах данных последовательностей имеют неправильные таксономические положения, что, в свою очередь приводит к проблемам при использовании данных штаммов или последовательностей для разработки и проверки диагностических праймеров (Pritchard et al., 2016; Karim et al., 2019).

Разработка праймеров для ПЦР-анализа пектолитических бактерий обычно основана на выявлении генов, связанных с вирулентностью, генах «домашнего хозяйства» или филогенетически отличающихся областях, таких как 16S рДНК или межгенная транскрибируемая область 16S-23S рРНК (Duarte et al., 2004; Parkinson et al., 2009; Pritchard et al., 2016). Однако, растущая доступность последовательностей полного генома для пектобактерий, позволяет использовать методы вычислительного прогнозирования праймеров, нацеленных на интересующие виды.

ПЦР-идентификация пектолитических бактерий активно развивается, начиная с 1990-х годов, и многие из разработанных ранее наборов праймеров до сих пор регулярно используются в микробиологических лабораториях. К ним относятся праймеры Eca1 и Eca2r (De Boer, Ward, 1995) и праймеры Y45 и Y46 (Frechon et al., 1998), специфичные для *P. atrosepticum*; праймеры ADE1 и ADE2 (Nassar et al., 1996), специфичные для *Dickeya* sp.; праймеры BR1F и L1R (Duarte et al., 2004), специфичные для *P. brasiliense*, а также EXPCCF и EXPCCR (Kang et al., 2003), специфичные для *P. carotovorum* и *P. parmentieri*.

В последние годы было разработано несколько методов мультиплексной ПЦР, которые позволяют одновременно обнаруживать *Dickeya* sp. и *P. atrosepticum*, а более комплексный анализ на основе существующих наборов праймеров был разработан для обнаружения видов *Dickeya*, *P. atrosepticum*, *P. carotovorum*, *P. wasabiae* и *P. parmentieri* в одной пробе (Sarfraz et al., 2020). Мультиплексная ПЦР-реакция сокращает время и усилия при идентификации патогенов, позволяя быстро обнаружить несколько мишеней в одной реакции. Пределы обнаружения мультиплексной ПЦР обычно сопоставимы с обычными анализами на выявление

одного патогена. Однако в присутствии других бактерий (например, сапротрофов) пределы могут иногда снижаться в десять раз по сравнению с простыми реакциями.

ПЦР-РВ имеет преимущество перед классической ПЦР, поскольку позволяет как качественно, так и количественно определять наличие возбудителей черной ножки и мягкой гнили в исследуемом образце. ПЦР-анализы в реальном времени могут быть основаны либо на применении флуоресцирующего красителя SYBR green (Laurila et al., 2010), накапливающегося по мере увеличения продукта реакции, либо на применении флуоресцентно меченных зондов TaqMan (Pritchard et al., 2013; Humphris et al., 2015), позволяющих повысить специфичность реакции. Наиболее известные наборы для диагностики возбудителей черной ножки и мягкой гнилей картофеля представлены анализами с использованием зонда TaqMan для дифференциальной диагностики 5 наиболее распространенных видов *Dickeya* (Zijlstra et al., 2020), одновременной диагностики родов *Dickeya* и *Pectobacterium* (Humphris et al., 2015) и дифференциальные диагностические системы для видов *D. solani* (Pritchard et al., 2013), *D. dianthicola* (Pritchard et al., 2013; Karim et al., 2019; Карлов, 2011a), *P. brasiliense* (Brierley et al., 2008), *P. atrosepticum* (Humphris et al., 2015), а также тест-системы с использованием красителя SYBR green для диагностики *Dickeya* sp. (Laurila et al., 2010) и *P. wasabiae*/*P. parmentieri* (Kim et al., 2011).

Петлевая изотермическая амплификация (LAMP) набирает популярность как чувствительный и быстрый метод амплификации, который можно выполнить за один этап путем инкубации при постоянной температуре. Анализы LAMP можно использовать в полевых условиях для быстрого неколичественного обнаружения патогенов или для количественного обнаружения с использованием стандартного оборудования для ПЦР-РВ (Czajkowski et al., 2015a). В настоящее время доступны многочисленные тесты LAMP для обнаружения пектолитических бактерий, в том числе для рода *Dickeya* (Yasuhara-Bell et al., 2017); *D. solani* (Dobhal et al., 2020); *D. dianthicola* (Ocenar et al., 2019); *P. carotovorum* (Yasuhara-Bell et al., 2017) и *P. brasiliense* (Li et al., 2011). Преимущество анализов LAMP перед ПЦР-РВ очевидно, однако разработка праймеров для LAMP гораздо сложнее поскольку требует 4–6

разных праймеров, специально разработанных для распознавания различных областей целевого гена (Lees et al., 2019).

Биохимические тесты долгое время использовали для дифференциации видов *Pectobacterium* и *Dickeya* от других бактерий. Однако, это не самый точный метод диагностики, ввиду высокой вариабельности результатов в зависимости от вида и даже штамма возбудителя, основанный на ограниченном количестве признаков и игнорирующий естественную изменчивость внутри таксонов. В настоящее время биохимический подход в основном используется для подтверждения результатов, полученных другими, более точными и менее трудоемкими методами.

К наиболее часто применяемым тестам для дифференциации пектобактерий относят чувствительность к эритромицину, выработку фосфатазы, индола, способность разжижать пектат и окислять различные углеводы (лактоза, мальтоза, сорбит и т. д.) (De Boer, Kelman, 2001; Gardan et al., 2003). В качестве альтернативы применяются коммерческие автоматизированные методы, такие как стандартизированные панели Biolog (Biolog, Inc., Hayward, Канада) и API (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Франция) для тестирования утилизации субстратов штаммами пектолитических бактерий. Такие системы полезны для быстрой идентификации некоторых видов и подвидов, например, *P. atrosepticum*, *P. betavasculorum*, *P. carotovorum* и *Dickeya* sp. (De Boer, Kelman, 2001; Waleron et al., 2018a).

В целом пектолитические бактерии являются каталазо-положительными, оксидазо-отрицательными, ферментируют глюкозу, восстанавливают нитраты, продуцируют  $\beta$ -галактозидазу и  $H_2S$ , используют L-арабинозу, D-галактозу, D-глюкозу, глицерин, D-маннозу, D-рибозу и сахарозу, но не производят уреазу или кислоту из адонита (Попкова, 2005; Van der Wolf, De Boer, 2007). Большинство штаммов используют L-рамнозу и D-маннит, но не декстрин (De Boer, Kelman, 2001).

Для дифференциации изолятов принадлежащих к роду *Pectobacterium* от изолятов рода *Dickeya*, а также для дифференциации разных видов возможно

использование биохимических анализов. Например, наиболее характерными параметрами для штаммов *P. atrosepticum* являются утилизация  $\alpha$ -метил-D-глюкозида, производство редуцирующих сахаров из сахарозы, рост на среде с 5% NaCl и отсутствие роста при 37 °C (Van der Wolf, De Boer, 2007). *P. carotovorum* имеет схожие характеристики, но не способна использовать  $\alpha$ -метил-D-глюкозид и растет при 37 °C (Samson et al., 2005). Штаммы *P. parmentieri* используют мальтодекстрин, раффинозу, лактозу,  $\beta$ -галактозу и  $\alpha$ -мелибиозу в качестве единственного источника углерода, но не метил- $\alpha$ -гликопиранозид, мальтозу или малоновую кислоту. Около 50% штаммов *P. parmentieri* способны расти при 37 °C и устойчивы к 5% NaCl (Gardan et al., 2003; Goto, Matsumoto, 1987). Штаммы *Dickeya* проявляют фосфатазную активность, способность продуцировать индол и чувствительность к эритромицину. Они могут расти в широком диапазоне температур: от 21 до 41 °C с оптимальной температурой около 32 °C.

Серологические или иммунологические методы диагностики, такие как иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХА), являются более перспективными методами экспресс-диагностики (Зайцев и др., 2015), чем биохимические тесты. Данные методы применимы для поточной диагностики посевного и полевого материала как в лабораторных (ИФА), так и во внелабораторных условиях (ИХА) (Белов и др., 2016; Усков и др., 2011). В основе детекции лежит способность антител и их конъюгатов с окрашенными частицами при взаимодействии с целевым патогеном образовывать специфические иммунные комплексы (Варицев и др., 2003). В настоящее время ФИЦ Биотехнологии РАН и ВНИИКХ разработали мультиплексный метод ИХА для одновременной детекции 10 патогенов картофеля, включая возбудителей черной ножки и мягкой гнили (*P. carotovorum*, *P. atrosepticum*, *Dickeya* sp.), с пределом обнаружения пектолитических бактерий  $10^4$ - $10^5$  КОЕ/мл (Сафенкова и др., 2018; Ерохова, Дренова, 2014).

Для дифференциальной диагностики видов пектолитических бактерий возможно применение анализа метилового эфира жирных кислот (FAME), например, для дифференциации штаммов *P. carotovorum* и *P. atrosepticum* (De Boer,

Sasser, 1986). Несмотря на то, что база данных, созданная на основе соотношения между различными жирными кислотами (Dawyndt et al., 2006; Waleron et al., 2018a), производимыми пектобактериями, не способна дифференцировать изоляты *Dickeya* до видового уровня (Van der Wolf et al., 2014a), благодаря ней возможно отличить изоляты *Dickeya* sp. от *Pectobacterium* sp.

К перспективным и наиболее точным методам дифференциальной диагностики возбудителей черной ножки и мягкой гнили можно отнести такой метод фенотипирования, как белковый фингерпринтинг, получаемый посредством матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации MALDI-TOF MS. В сочетании со специальным программным обеспечением и постоянно пополняемым банком данных фингерпринтинга MALDI Biotyper (Bruker), метод позволяет быстро и надежно определять таксономическое положение возбудителей, ранее внесенных в базу данных (Асланова и др., 2022). С помощью MALDI TOF MS удалось получить специфические спектры для различных видов *Dickeya* sp. (Van der Wolf et al., 2014b), согласно которым, штаммы *D. solani* оказались тесно сгруппированными, но значительно отличаются от штаммов *D. dadantii* subsp. *dadantii*, *D. dadantii* subsp. *dieffenbachia* и *D. dianthicola*. Результаты анализа MALDI-TOF MS также послужили основой для описания *P. peruvienne* в качестве нового вида (Waleron et al., 2018b). Сочетание капиллярного изоэлектрического фокусирования и MALDI-TOF MS позволило быстро и надежно идентифицировать различные виды *Dickeya* и *Pectobacterium* sp. в растительных тканях (Šalplachta et al., 2015), при этом было установлено, что наличие растительных клеток не влияет на результаты, что делает предложенную процедуру очень перспективной в плане быстрого и надежного обнаружения и идентификации бактерий в растительных образцах (Šalplachta et al., 2015).

Генотипирование — это технология, позволяющая различать генетически родственные роды, виды, подвиды или отдельные штаммы путем анализа небольших генетических вариаций, которые могут оказывать существенное влияние на фенотип, метаболизм, вирулентность и патогенность. Для идентификации и дифференциации пектолитических бактерий на уровне рода и

вида были разработаны различные инструменты генотипирования. Так, несмотря на то что *Pectobacterium* и *Dickeya* sp. можно таксономически отделить от других родов бактерий на основании филогенетического анализа последовательности 16S рРНК (Fessehaie et al., 2002; Duarte et al., 2004), межвидовые и внутривидовые отношения внутри пектолитических бактерий наиболее полно иллюстрируются с помощью последовательностей специфических генов домашнего хозяйства или метода мультилокусного анализа последовательностей (MLSA).

Значения сходства последовательностей генов 16S рРНК ниже 98,65 % идентифицирует штаммы как разные виды (Kim et al., 2014), при этом в геноме бактерий может быть несколько генов 16s рРНК, что усложняет диагностику. Таким образом, MLSA-анализ является дополнением к анализу на основе гена 16S рРНК (Gevers et al., 2005), так как основан на нескольких генах домашнего хозяйства, что позволяет повысить надежность характеристики (Ma et al., 2007; De Boer et al., 2012; Waleron et al., 2013; Van der Wolf, Bergsma-Vlami, 2013).

Гены домашнего хозяйства, включая такие как *gyrB* (ДНК-гираза, бета-субъединица), *rpoD* (РНК-полимераза, фактор  $\sigma$  70), *dnaK* (шаперонный белок DnaK), *trpB* (триптофан-синтаза, бета-субъединица) и *recA* (рекомбиназа А) чаще всего выбирают для MLSA-анализа, поскольку они кодируют основные ферменты бактериального метаболизма (Ma et al., 2007; De Boer et al., 2012). Так, новые виды *P. aroidearum*, *P. parmentieri*, *P. polonicum*, *P. fontis* и *P. versatile* были описаны на основе MLSA-анализа 3-14 генов, а также MLSA был использован для возведения *P. odoriferum*, *P. brasiliense* и *P. actinidiae* до видового уровня (Nabhan et al., 2013; Khayi et al., 2016; Sarfraz et al., 2018; Waleron et al., 2019b; Oulghazi et al., 2019a; Portier et al., 2019).

Первая полногеномная последовательность возбудителя черной ножки картофеля была опубликована в 2004 году для штамма *Pectobacterium atrosepticum* (тогда *Erwinia carotovora* subspp. *atroseptica*) SCRI1043 (Bell et al., 2004). С тех пор сравнительный анализ геномов оказывает большое влияние на традиционные таксономические исследования и приводит к переоценке и обнаружению новых видов и родов пектолитических бактерий. Таким образом, новые геномные

подходы таксономической классификации, включая среднюю идентичность нуклеотидов (ANI) и гибридизацию ДНК-ДНК *in silico* (isDDH) вместо того (Auch et al., 2010; Konstantinidis, Tiedje, 2005), чтобы игнорировать традиционные методы, дополнили и помогли их стандартизировать (Kang et al., 2019; Maderankova et al., 2019; Zhou et al., 2022).

Метод isDDH основан на общем генетическом сходстве двух геномов, при котором проводится локальное выравнивание для выявления пар сегментов с высоким баллом, и эти сравнения преобразуются в единое значение расстояния между геномами (Meier-Kolthoff et al., 2013). Полученные результаты можно сравнивать друг с другом, используя для разграничения видов отсекающее значение в 70 % (Auch et al., 2010).

Расчет величин ANI, применимый для анализа полных геномов, представляет собой результат степени сходства между гомологичными областями, общими для двух геномов (Jain et al., 2018), и является мощным геномным критерием для установления видовой идентичности среди генетически родственных микроорганизмов (Kastelein et al., 2021). Этот подход оценивает большое количество генов, включая как медленно, так и быстро эволюционирующие, и, таким образом, сводит к минимуму влияние переменных скоростей эволюции или событий горизонтального переноса генов. Точка отсчета порога ANI в 96 % была определена как значение для разграничения видов пектобактерий (Konstantinidis, Tiedje, 2005).

С 2016 года методы анализа ANI и цифровой гибридизации isDDH регулярно используются для характеристики и разграничения новых видов *Pectobacterium*, а также проверки таксономического положения уже описанных видов патогенов, в рамках полифазной стратегии таксономического описания бактериальных видов (Pasanen, 2020a).

За последние 30 лет в мире наметилась тенденция перехода от микробиологических, серологических и биохимических методов диагностики пектобактерий к молекулярно-генетическим методам обнаружения и дифференциации патогенов. Однако, данные методы также не являются

универсальными ввиду широкого диапазона изменчивости среди видов пектолитических бактерий, в то время как таксономическое положение многих фитопатогенов, первоначально идентифицированных по их биохимическим свойствам и последовательностям гена 16S рНК, изменилось после переоценки геномных отношений с использованием критериев ANI и isDDH. В результате такой переоценки, коллекции культур и базы данных последовательностей содержат множество неправильно идентифицированных и ошибочно названных видов патогенов, что еще больше усложняет таксономические исследования и диагностику видов *Pectobacterium* и *Dickeya*. Таким образом, выбор того или иного метода диагностики должен напрямую отвечать целям исследования, а также материально-техническим возможностям лаборатории и подтверждаться параллельными исследованиями с использованием как традиционных, так и более современных методов диагностики.

Развитие технологий секвенирования следующего поколения (NGS) и аннотирования геномных данных привело к быстрому увеличению числа описанных последовательностей, легкодоступных в онлайн-базах данных, что представляет собой богатый источник информации для новых подходов к решению сложных диагностических вопросов в патологии растений.

#### **1.4. Стратегии защиты картофеля от возбудителей черной ножки**

Ввиду биологических особенностей возбудителей черной ножки картофеля борьба с данными патогенами представляет собой весьма сложную задачу. До сих пор не было разработано коммерчески доступных и эффективных по отношению к пектолитическим бактериями средств защиты картофеля. Борьба с данными заболеваниями зачастую сводится к комплексу предупредительных мер, таких как заблаговременная диагностика зараженности посадочного материала, систематическая дезинфекция помещений, тары и агрегатов, соблюдение севооборота, проведение необходимых агротехнических мероприятий, направленных на получение здорового посадочного материала и повышение устойчивости растений к болезням. Однако, учитывая биологию возбудителей, предупредительные меры не могут в полной мере гарантировать защиту растений



от заражения (Иванюк и др., 2005). Таким образом, только интегрированная защита, применяемая на всех этапах технологии производства картофеля и сочетающая в себе комплекс организационно-хозяйственных, семеноводческих, агротехнических, биологических и химических методов может предотвратить развитие и распространение патогенных микроорганизмов.

Семенной картофель является ключевым фактором в максимизации товарного урожая, так как именно его качество определяет жизнеспособность, здоровье и урожайность культуры, что обуславливает исключительную важность контроля за качеством семенной продукции картофеля. При этом важным инструментом для борьбы с возбудителями черной ножки и мягкой гнили картофеля являются программы сертификации семенного материала, обеспечивающие производство здорового посадочного материала, а также отслеживание, контроль, и поддерживают на уровне ниже порогового болезней, переносимых семенами.

Несмотря на то, что уровни допусков по черной ножке на вегетирующих растениях и мягкой гнили на семенных клубнях картофеля в странах Европейского союза различаются, ввиду отсутствия единой системы сертификации в ЕС и остальном мире (Toth et al., 2011), минимальные допуски во всем ЕС регулируются Директивами 2014/20/ЕС и 2014/21/ЕС, согласно которым сертификация обычно основана на визуальной оценке (Van der Wolf et al., 2021b). Инспекторы посещают картофельные поля не менее двух раз в течение сезона, проверяя наличие растений с симптомами. Записи о пораженных черной ножкой растениях дают некоторые представления о заболеваемости и возможном инфекционном потенциале семенных клубней в следующем поколении, но игнорируют скрытое заражение, которое, как правило, более тесно связано с развитием болезни в будущем (Pemberton et al., 2005; Van der Wolf et al., 2021b). Однако, некоторые страны предпочитают использовать лабораторное тестирование в дополнение к визуальному осмотру на предмет скрытых инфекций. При этом официальные программы послеуборочного диагностического тестирования на наличие пектолитических бактерий не предусмотрены и носят добровольный характер.

В 2012–2018 гг. в ходе пилотного исследования в Нидерландах был проведен эксперимент с обязательным послеуборочным тестированием с применением метода диагностики на основе ПЦР-РВ всего имеющегося на рынке семенного материала картофеля предбазисной категории (РВ и S по европейской классификации). Первоначальные результаты показали наличие корреляционной связи между латентной инфекцией в исследуемых клубнях и симптомами черной ножки в полевых условиях в следующем году. Однако, ввиду высокой вариабельности в степени вирулентности между разными видами пектолитических бактерий, послеуборочное тестирование было признано непригодным для целей сертификации клубней картофеля (Van der Wolf et al., 2021b).

Примером эффективной системы сертификации семенного картофеля может служить Шотландия. Её территории в соответствии с решением Европейской Комиссии придан особый статус EC High Grade Region, в котором отсутствуют патогены *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum* и *Dickeya* sp. (Ерохова, Кузнецова, 2022б).

На территории страны поддерживается строгий фитосанитарный режим для выращивания и реализации семенного картофеля предбазисных и базисных категорий, при котором все импортируемые семенные клубни должны быть проверены перед посадкой на отсутствие зараженности возбудителями черной ножки. Кроме того, в течение вегетации дважды проводится мониторинг посадок семенного картофеля, диагностика клубней, полученных после уборки урожая, а также ежегодная плановая проверка воды из водоемов, используемых для орошения картофельных полей, на наличие патогенных штаммов (Van der Wolf, Bergsma-Vlami, 2013; Van der Wolf et al., 2017). Также, для облегчения контроля за процессом сертификации Шотландский совет по сельскохозяйственной науке (SASA) предоставляет свободный доступ к соответствующей базе данных MySPUDs для каждой партии семенного и продовольственного картофеля (Ерохова, Кузнецова, 2022а, 2022б).

На территории Российской Федерации с 1 января 2018 г. в качестве национального стандарта в системе сертификации семян (взамен ГОСТ Р 53136-

2008, ГОСТ Р 55329-2012) был введен новый межгосударственный стандарт ГОСТ 33996–2016 “Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества”, разработанный при участии ФГБНУ ВНИИКХ, Картофельного союза и Россельхозцентра.

Основные положения стандарта в отношении нормативных допусков оригинального, элитного и репродукционного картофеля близки к уровню, принятому в странах ЕС. Однако, имеются и существенные различия, так в РФ в отношении черной ножки картофеля для категорий оригинальных и элитных семян установлен нулевой допуск, а для репродукционных партий допускается не более 1 % пораженности (Анисимов, 2018), что в целом соотносится с европейскими допусками, где для оригинального (предбазовый, по европейской классификации) картофеля определен нулевой допуск, для элитного (основной) – от 0 до 0,5% и для репродукционного (сертифицированный) – 0 до 4%, в зависимости от уровня репродукции (Анисимов и др., 2017). Однако, в странах ЕС данные допуски основаны исключительно на визуальной оценке клубней и растений, в то время как ГОСТ 33996–2016 предполагает использование дополнительно методов ПЦР, ИФА и ИХА-диагностики, прописанных в Национальном стандарте РФ ГОСТ Р 59551-2021 "Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов", что довольно противоречиво ввиду различий в чувствительности молекулярных методов, способных выявить минимальное присутствие патогенов в пробе (согласно ГОСТу 33996–2016  $10^1$  КОЕ/см<sup>3</sup> пробы для ПЦР-метода и  $10^4$  КОЕ/см<sup>3</sup> – для ИФА) и визуальной оценке, нерепрезентативной, например, при наличии латентной инфекции.

Обязательным профилактическим приемом при возделывании семенного картофеля является фитопочистка посадок, целью которой является обнаружение и удаление слаборазвитых и больных растений (Воловик, Шнейдер, 1987). При этом весь куст с материнским растением и молодыми клубнями следует выкопать, поместить в полиэтиленовый мешок и уничтожить в специально отведенном месте (De Boer et al., 2012). Данное мероприятие рекомендуется проводить на семенных посадках не менее двух раз: первый - при высоте растений 10–15 см; второй - в

период от бутонизации до смыкания рядов (Белов, Хютти, 2022; Лысов и др., 2020).

Под посадки картофеля лучше отводить участки с хорошо дренированными почвами и избегать избыточного орошения. В противном случае в переувлажненной тяжелой почве будут создаваться анаэробные условия, благоприятные для развития пектолитических бактерий (Лазарев, Хютти, 2016; Ерохова, Кузнецова, 2023).

Оптимальными предшественниками картофеля являются озимая пшеница, викоовсяная смесь, многолетние травы и смеси однолетних бобовых трав (Лазарев, Хютти, 2016; Белошапкина и др., 2017). Возврат картофеля на предыдущее место возделывания не рекомендуется проводить раньше, чем через 3–5 лет (Лазарев, Хютти, 2018), дабы снизить риск накопления в почве картофельных цистообразующих нематод, грибов *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia* sp., *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, оомицетов *Phytophthora infestans*, поражение которыми способствует инфицированию бактериальными фитопатогенами (Ерохова, Кузнецова, 2023).

Минеральное питание также влияет на уровень восприимчивости растения к патогенным микроорганизмам. Растения с оптимальным питанием обладают наибольшей устойчивостью к болезням, в то время как дефицит или избыток основных элементов может привести к повышению восприимчивости к болезням (Huber et al., 2012).

Оптимальное соотношение NPK для семенного картофеля составляет 1:1-1,2:1,6-2, для продовольственного — 1:0,8-1:1,5-1,8 (Ерохова, Кузнецова, 2023). Однако, стоит учитывать, что точная норма внесения азотных удобрений может варьировать в зависимости от сорта картофеля, предшественника и типа почвы. При этом рекомендуется не превышать норму внесения азотных удобрений, так как это увеличивает содержание макроэлемента в растении и способствует излишнему росту вегетативной массы, что повышает влажность ботвы, а это в свою очередь увеличивает риск развития болезни. Высокое содержание азота также повышает содержание нитратов в клубнях потомства (Maltas et al., 2018), что теоретически может способствовать развитию мягкой гнили.

Целесообразно сбалансированно вносить минеральные удобрения не только по NPK, а также по кальцию (Ca), так как он является макроэлементом, улучшающим структурную целостность клеточной мембраны и компонентов клеточной стенки растений (Ерохова, Кузнецова, 2023). В нескольких исследованиях содержание кальция в тканях растений положительно коррелировало с устойчивостью к пектолитическим бактериям (Da Silva Felix et al., 2017). Механизм действия Ca против патогенов, по-видимому, обусловлен взаимодействием ионов Ca с пектином клеточной стенки растений, укрепляя её (White, Broadley, 2003). Недавнее исследование с применением кальциевой селитры в качестве минерального удобрения из расчета 250 кг/га (19% Ca) показало снижение симптомов черной ножки на 20–50%, при этом заболеваемость на обработанных участках оставалась ниже контрольной даже спустя 12 недель от появления всходов. Однако, важно не забывать, что переизбыток Ca в почве может способствовать развитию других болезней картофеля, таких как парша обыкновенная *Streptomyces scabiei* (Lambert, 1991).

Обязательным агротехническим приемом, предшествующим уборке урожая картофеля, служит удаление наземной массы путем скашивания, десикации или комбинации этих приемов (Шнейдер, 1972; Ерохова, Кузнецова, 2023). Удаление ботвы за 8–12 дней до уборки урожая, способствует ускорению формирования и утолщения перидермы и суберинового слоя у клубней (Лазарев, Хютти, 2018; Зейрук и др., 2016), что обеспечивает лучшую защиту картофеля от мягкой гнили при хранении, поскольку *Pectobacterium* sp. не способны проникнуть сквозь перидерму здорового клубня.

Уборку урожая картофеля следует проводить в сухую теплую погоду (выше 10°C), всячески избегая механического травмирования клубней при прохождении технологических этапов. Сразу после уборки необходимо дать пройти клубням лечебный период, в течение 2–3 недель при температуре +(12–14)°C (Ерохова, Кузнецова, 2023), активной вентиляции и относительной влажности воздуха 90–95% (Лазарев, Хютти, 2018). Особое внимание уделяют температурно-влажностному режиму, не допуская образования конденсата. Картофель следует

хранить в хорошо проветриваемых условиях при температуре 2–4 °С, поскольку мягкая гниль развивается очень медленно при температуре ниже 10 °С (Зейрук и др., 2023; Wicks et al., 2007) и относительной влажности воздуха 85-90% (Ерохова, Кузнецова, 2023).

При уборке, транспортировке и хранении картофеля необходимо соблюдать санитарные требования для предотвращения бактериальной контаминации рабочих поверхностей, агрегатов и тары. Перед применением дезинфицирующих средств, поверхности следует предварительно очистить от пыли, грязи и остатков органического материала, желательно использовать пар и промышленные пылесосы. Хранилища также должны проходить ежегодную дезинфекцию, например, с применением 0,2%-го раствора извести с добавлением 2–3% медного купороса (Лазарев, Хютти, 2018).

Важной составляющей в системе интегрированной защиты является выращивание устойчивых сортов, использование которых позволило бы сократить объемы применения пестицидов, снизив нагрузку на биоценоз.

Современные сорта картофеля имеют узкую генетическую основу и в основном происходят от чилийской группы *Solanum tuberosum* группы *Tuberosum* при участии группы *Andigena*. Это могло привести к отсутствию иммунитета к черной ножке и мягкой гнили у коммерческих сортов картофеля, хоть их восприимчивость и сильно различается (Райко, 2007; Ертаева, 2016).

Устойчивость к пектолитическим бактериями была обнаружена у многих дикорастущих и культурных видов рода *Solanum* (Curland et al., 2021; Tsrer et al., 2013). Однако, интрогрессия их генов устойчивости в современные коммерческие сорта картофеля затруднена сложным механизмом наследования признака, связанным с аддитивным взаимодействием генов, расположенных на разных хромосомах (Zimnoch-Guzowska et al., 2000; Lebecka et al., 2021). Селекцию на устойчивость осложняет и тот факт, что реакция растений на заражение фитопатогенами в виде проявления симптомов черной ножки на растениях и развития мягкой гнили на клубнях не всегда коррелируют между собой (Pérombelon, Salmond, 1995). Более того, восприимчивость растения зависит от

степени агрессивности используемого бактериального штамма, размера и зрелости клубней, различных факторов окружающей среды, а также от применяемых методов скрининга (Lebecka et al., 2018).

В настоящее время абсолютно невосприимчивых сортов картофеля к чёрной ножке и мягким гнилям не выявлено, но среди сортов и гибридов отечественной селекции выделяют относительно устойчивые: Аврора, Агрономический, Веселовский, Волжанин, Гатчинский, Голубизна, Дружный, Ресурс, Ладожский, Онежский, Снегирь, Сударыня, Чародей и др. (Лазарев и др., 2017; Фасулати и др., 2014), при этом к наиболее восприимчивым относят: Розаро, Романо (к черной ножке) и Гулливер, Невский, Самбо, Солнечный, Антонина, Тулеевский, Ред Скарлетт, Гала (к мягкой гнили) (Васильева и др., 2018).

Семенные клубни являются основным источником заражения растений картофеля пектолитическими бактериями. Таким образом, обработка клубней могла бы минимизировать развитие заболевания в поле и при хранении. Неспособность таких обработок полностью уничтожить бактерии, расположенные глубоко в сосудистой системе клубня, существенно ограничивает их эффективность (Райко, 2007), но и позволяет снизить процент заболевания ввиду контроля численности эпифитных популяций патогенов на поверхности клубней.

Физические методы обработки семенных клубней, такие как применение горячей воды, пара, горячего сухого воздуха и УФ-излучения, признаны экологически безопасными и эффективными против широкого спектра патогенов. Например, обработка семян горячей водой в течение 5 минут (при 55 °С) с последующей сушкой при принудительной вентиляции привела к снижению симптомов черной ножки картофеля в полевых экспериментах (Pérombelon et al., 1989), а обработка горячим паром позволила существенно снизить инфицирование перидермы клубня (Afek, Orenstein, 2002).

В последнее время на картофеле все чаще фиксируется комплексное поражение культуры фитофторозом, альтернариозом и бактериальными гнилями, защита от которых подразумевает применение препаратов с расширенным спектром действия. Однако, многие применяемые ранее в сельском хозяйстве

препараты оказались токсичными и экологически небезопасными, а современный ассортимент препаратов для предпосадочной обработки клубней и опрыскивания посевов в период вегетации достаточно ограничен ввиду отсутствия новых препаративных форм, эффективных в первую очередь против почвенно-клубневой инфекции (Van der Wolf et al., 2021b). Так, в результате ужесточения законодательства ЕС, регламентирующего применение пестицидов в защите растений, было отозвано разрешение на применение фунгицидов на основе действующего вещества фенамидона (с 2018 г.), хлороталонила (с 2019 г.), манкоцеба (с 2021 г.), фамоксадона (с 2021 г.) до недавнего времени успешно применявшихся в защите картофеля (Ерохова, Кузнецова, 2022а). При этом в качестве альтернативы запрещенным препаратам в странах Европы и Америки при выращивании органической продукции стали всё чаще применять медьсодержащие фунгициды (гидрооксид меди, оксид меди, оксихлорид меди) (Ерохова, Кузнецова, 2022а), эффективность которых обусловлена способностью денатурировать белковые структуры грибов и бактерий, а биостатический эффект меди, препятствующий размножению бактерий на обработанной поверхности, позволяет сокращать концентрацию меди в самом препарате и кратность обработок фунгицидом (Hibbing et al., 2010). Таким образом, применение в период цветения картофеля медьсодержащих фунгицидов позволяет снизить инфекционную нагрузку, в том числе вызванную возбудителями черной ножки и мягкой гнили, на клубни нового урожая (Зейрук и др., 2020).

На территории РФ против черной ножки в комплексе с другими болезнями картофеля (ризоктониоз, фитофтороз, альтернариоз, фузариоз) рекомендуется использование ряда фунгицидов, зарегистрированных на картофеле и представленных в «Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации», таких как Максим, КС (д.в. флудиоксонил, 25 г/л; ООО «Сингента») или его аналога Протект, КС (д.в. флудиоксонил, 25 г/л; ООО «Агро Эксперт Групп»), применяемые для протравливания клубней перед закладкой на хранение, а также ТМТД, ВСК (д.в. тирам, 400 г/л; АО «Август») - для предпосевной обработки (Лысов и др., 2020).



Для профилирования бактериозов в течение вегетации возможно применение медьсодержащего фунгицида Ридомил Голд Р, ВДГ (д.в. мефеноксам 20 г/кг и меди оксихлорид 142 г/кг, ООО «Сингента») для обработки по листу.

Среди неорганических и органических солей перспективных для применения в защите картофеля от черной ножки и способных в условиях *in vitro* подавлять рост штаммов *P. carotovorum* и *P. atrosepticum* можно выделить соединения ацетата и хлорида алюминия, метабисульфата и бензоата натрия, сорбата калия, пропионата кальция, гипохлорида и бикарбоната натрия (Mills, Hurta, 2006).

В зарубежной литературе описывается успешный опыт применения перекиси водорода, тринатрийфосфата, кофеина, надуксусной и бензойной кислоты для снижения концентрации пектолитических бактерий. Однако, при переходе от лабораторных экспериментов к вегетационным опытам, обработка всеми вышеописанными веществами, кроме перекиси водорода и кофеина приводили к высокой фитотоксичности, снижая прорастание клубней на 10–100% (Czajkowski et al., 2015b).

Перспективным является использование альтернативных антибактериальных веществ растительного происхождения, к которым относятся эфирные масла и экстракты растений (Alonso-Gato et al., 2021). В последнее десятилетие активно разрабатываются научные основы применения данных веществ в защите растений от вредных организмов, включая пектолитические бактерии (Iacobellis et al., 2005). Например, эфирное масло тимьяна, имеющее в своем составе тимол и линалоол в качестве основных компонентов, может проявлять антибактериальную активность по отношению к штаммам *P. carotovorum* (Rojas et al., 2014), вероятно, за счет способности этих веществ разрушать клеточные мембраны и ингибировать метаболические процессы в бактериальных клетках (Louws et al., 2001). А при исследовании эфирного масла коричника китайского преобладающим веществом в его составе выступал коричный альдегид (Huang et al., 2014), отмеченный антибактериальным действием по отношению ко многим грамотрицательным бактериям (Васильева, 2024а). Кислоты же, преобладающие в составе растительных экстрактов, такие как уксусная, капроновая, изовалериановая и др.,

встречаются при анализе многих растительных экстрактов (Дацюк, Тараканов, 2022) и обладают антибактериальными свойствами по отношению к широкому кругу патогенов (Ха, Джалилов, 2014; Bhat et al., 2017; Ikeura, Koabayashi, 2015).

Недавние разработки в области нанотехнологий открывают большие перспективы для совершенствования средств защиты растений на основе наноразмерных частиц металлов. За счет повышения доступности большего количества ионов становится возможным снижение нормы расхода препарата и пестицидной нагрузки на окружающую среду (Зейрук и др., 2019). Так, в лабораторных экспериментах отмечается повышение ингибирующей активности препаратов с наночастицами меди в различных формах по отношению к грамотрицательным бактериям, включая штаммы *D. dadantii* и *P. carotovorum*, по сравнению с коммерческими медьсодержащими фунгицидами (Varympori et al., 2020). Сложности же в применении в полевых условиях эфирных масел, вызванные плохой растворимостью в воде и термолабильностью, возможно решить с помощью наноэмульгирования, т. е. суспендирования наноразмерных капель масла путем инкапсуляции в поверхностно-активные вещества, что также улучшит их диффузию через плазматическую мембрану (Donsì, Ferrari, 2016). Кроме того, было показано, что эфирные масла и их компоненты действуют синергически с бактерицидами на основе меди и могут применяться вместе для повышения эффективности (Qiao et al., 2020).

В настоящее время в европейских странах намечается тенденция на сокращение использования химических средств защиты растений в сторону глобальной биологизации и управления микробиомами растений и почвы. Большая часть этих исследований была сосредоточена на выборе штаммов, ингибирующих рост целевых патогенов путем производства антимикробных соединений (Krzyzanowska et al., 2019; Raoul des Essarts et al., 2016) или ослабление активности патогена посредством вмешательства в механизм Quorum Sensing (Krzyzanowska et al., 2012). В основном в роли антимикробных агентов используют различные штаммы из родов *Bacillus*, *Pseudomonas* и *Serratia* (Czajkowski et al., 2011). Некоторые лабораторные исследования доказывают антагонистическую

активность по отношению к возбудителям черной ножки молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum*, *La. acidophilus*, *La. buchneri*, *Leuconostoc* sp. и *Weissella cibaria*, выделенные из свежих фруктов и овощей, что вероятно связано с их способностью к подкислению среды (Tsuda et al., 2016). Примечательно и использование непатогенных штаммов *P. carotovorum* в качестве антагонистов к возбудителям мягкой гнили (Kazemi-Zaromi et al., 2016). Так, за счет продуцирования веществ бактериоцинов, включая каротоворицин, карозин S1, карозин S2, карозин D и пектоцины M1 и M2, выделяемых некоторыми штаммами рода *Pectobacterium*, повышается их конкурентоспособность по отношению к родственным патогенным видам (Chuang et al., 2007). На сегодняшний день в Японии разработан единственный коммерческий препарат биоконтроля на основе непатогенного штамма *P. carotovorum* для защиты овощей, цикламена и клубней картофеля от мягкой гнили. Он доступен на рынке с 1997 года под названием ВЮКЕЕР (Central Glass Co., Ltd., Токио, Япония).

Среди коммерческих препаратов отечественного происхождения в профилактических целях и для снижения пестицидной нагрузки против черной ножки картофеля для обработки клубней и вегетирующих растений эффективно применение препаратов Алирин-Б, Ж (ООО УК «АБТ-ГРУПП», Россия) и Фитоспорин-М, Ж (ООО «НВП «БашИнком», Россия) на основе штаммов В-10 ВИЗР и 26 Д *Bacillus subtilis*, соответственно (Белов и др., 2020; Лысов и др., 2020). Также, в начале 2024 года в список разрешенных биопрепаратов на картофеле был внесен Лавибакт, Ж (ООО «БИОМ-ПРО», Россия), в состав которого входит штамм молочнокислых бактерий 1101 *Lactobacillus plantarum*, эффективный против мягкой гнили клубней.

Другой многообещающей стратегией в защите растений от патогенных бактерий является применение специфических бактериальных вирусов - бактериофагов (Bugaeva et al., 2021; Мирошников К. А., 2018; Мирошников К. А. и др., 2019). В отличие от химических пестицидов бактериофаги естественным образом присутствуют в окружающей среде и нетоксичны для человека (Лукьянова, Мирошников, 2019). А также они обладают способностью к само-

воспроизводимости, однако, только до тех пор, пока присутствует бактерия-хозяин.

Несмотря на то, что смеси фагов, специфичные к целевым патогенам (фаговые коктейли), успешно использовались для борьбы с различными бактериальными фитопатогенами (Jones et al., 2007; Svircev et al., 2018; Holtappels et al., 2021), большинство исследований, направленных на защиту картофеля от мягкой гнили, ограничивались лабораторными или тепличными экспериментами (Parena et al., 2022). Основная проблема возникшая при применении фагов в полевых условиях заключалась в их чувствительности к ультрафиолетовому излучению (УФ) (Iriarte et al., 2007), ввиду чего было разработано несколько методов для продления их сохранности, таких как использование УФ-протекторов или внесение лизатов фагов в вечернее время суток (Balogh et al., 2003). Тем не менее, в полевом эксперименте, проведенном в Бельгии применение фагового коктейля при обработке клубней, не привело к значительному повышению урожайности и снижению процента зараженных клубней в следующем поколении (Adriaenssens et al., 2012). Однако, аналогичные полевые испытания, проведенные в 2016–2018 гг. в Ирландии, выявили увеличение урожайности и подавление симптомов черной ножки и мягкой гнили при применении фагового коктейля (Zaczek-Moczydłowska et al., 2020).

В настоящее время еще разрабатываются основы для эффективного контроля черной ножки в полевых условиях. Однако, эксперименты по защите клубней картофеля от мягкой гнили при хранении довольно успешны. Так, при внесении фагового коктейля в систему поддержания влажности в картофелехранилище с разбрызгиванием на протяжении всего периода хранения было отмечено сокращение популяции пектолитических бактерий на клубнях в 10–12 раз (Bugaeva et al., 2021). Также для профилактики мягкой гнили клубней во время хранения уже зарегистрирован коммерческий продукт в виде промывочного раствора на основе бактериофага *Violyse* («APS Biocontrol Ltd.», Шотландия, Великобритания).

Несмотря на многолетние исследования в области защиты растений от возбудителей черной ножки и мягкой гнили, эффективные меры борьбы с патогенами ещё не достигнуты. Ввиду особенностей биологии возбудителей и

разнообразных путях распространения инфекции пока не будут созданы высокоустойчивые сорта картофеля, стратегии борьбы с возбудителями по-прежнему будут основываться на использовании сертифицированного посадочного материала, свободного от патогенов и применении строгих гигиенических норм, особенно при сборе урожая и в период послеуборочного хранения. В дополнение к санитарно-гигиеническим мероприятиям необходимо добавить схему научно-обоснованного севооборота, проведение обязательных агротехнических мероприятий и внесение оптимальных доз минеральных удобрений для поддержания иммунитета и общей устойчивости растений. Несмотря на отсутствие эффективных химических средств защиты против бактериозов, стоит обращать внимание на фунгициды комбинированного действия, обладающие антибактериальными свойствами, а также препараты биологического контроля. Только интегрированная стратегия защиты сможет обеспечить сокращение распространенности черной ножки и мягкой гнили картофеля.

## ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основная часть научно-исследовательской работы была выполнена на кафедре защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева». Отдельные эксперименты, связанные с работой по созданию искусственных инфекционных фонов и постановке вегетационных опытов были проведены в теплицах лаборатории защиты растений.

### **2.1. Выделение и идентификация возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля**

Материалом для исследования были 8 партий клубней картофеля с симптомами заболевания 11 сортов (Леди Клер, Пламя, Королева Анна, Утро, Сатурна, Кибиц, Гала, Розара, Импала, ВР-808, Ред Скарлет), полученных из 11 регионов Российской Федерации (Кемеровская обл., Московская обл., Томская обл., Ставропольский край, Свердловская обл., Омская обл., Красноярский край, Тульская обл., Брянская обл., Тверская обл., Волгоградская обл.) в период с сентября 2020 по сентябрь 2021 года.

В качестве типовых штаммов использовали штаммы пектолитических бактерий из коллекции DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Брауншвейг, Германия) *Dickeya chrysanthemi* (DSM 4610), *Dickeya dadantii* (DSM 18020) и *Pectobacterium odoriferum* (DSM 22556), а также штаммы *Pectobacterium versatile* (F002), *Pectobacterium atrosepticum* (F004), *Pectobacterium brasiliense* (F126) и *Pectobacterium parmentieri* (F148) из коллекции лаборатории молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, описанные ранее (Lukianova et al., 2021).

*Выделение штаммов возбудителей* проводили по общепринятой методике с модификациями (De Boer et al., 2017; Жевора и др., 2019).

После получения образцов, каждую анализируемую партию клубней картофеля подвергали поверхностной дезинфекции, путем замачивания на 2 минуты в 75 %-ном растворе этанола с последующим трехкратным промыванием

стерильной дистиллированной водой. Далее в зависимости от степени поражения клубня придерживались 1-й или 2-й схеме выделения.

1) При наличии явных признаков заболевания отбирали скальпелем по 3 г ткани клубня картофеля, помещали навеску в ступку и пестиком перетирали фрагмент клубня со стерильной водой, добавленной в соотношении 2:1 к массе навески до однородной массы и оставляли на 30 минут при комнатной температуре.

2) При отсутствии явных признаков заболевания со столонной части клубня вырезали скальпелем конус около 3–5 мм в диаметре, стараясь не затрагивать мацерированные участки, и помещали их в стерильную колбу на 300 мл. Фрагменты клубней заливали 100 мл стерильной дистиллированной воды и инкубировали на орбитальном шейкере ES-20 (Biosan, Рига, Латвия) со скоростью 150 об/мин в течение 60 мин при температуре 28°C.

В ближайшие 2-3 часа полученный гомогенат высевали серийными десятикратными разведениями на полу-селективную пектатную среду CVP-SL (на 1 литр среды:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 2,04 г; триптон – 2 г; трисодиум цитрат –  $2\text{H}_2\text{O}$  – 11,4 г;  $\text{NaNO}_3$  – 4 г; 0,1%-ный раствор кристаллического фиолетового – 3 мл; агар – 8 г;  $\text{NaOH}$  (5M) – 5,6 мл; пектин дипекта – 36 г) (Hélias и др., 2012). Через 48 часов инкубации в термостате при 28°C бактериальные колонии, расщепившие пектин и образовавшие на поверхности питательной среды характерные лунки, очищали на среде YD (на 1 литр среды: дрожжевой экстракт – 10 г; декстроза – 20 г; агар – 17 г), культивируя в течение 24 часов при 28 °C.

Полученные единичные колонии были проверены на среде King's B (на 1 литр среды: пептон дрожжевой – 20 г;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,5 г;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,5 г; глицерин – 10 мл; агар – 15 г) на отсутствие флуоресценции и подтверждены как грамтрицательные посредством лизиса бактериальных клеток при взаимодействии с 3%-ным раствором КОН в тесте Греггерсена (Bourgault, Lamothe, 1988; Arthi et al., 2003). Также для отобранных изолятов подтверждали наличие пектолитической активности на ломтиках картофеля, помещенных в чашки Петри во влажную камеру. Инокуляцию проводили посредством укола стерильной зубочисткой, предварительно опущенной в суспензию изучаемых бактерий с

последующей инкубацией ломтиков картофеля в чашках Петри в течение 24–48 часов инкубации при 28 °С. Положительным результатом служила мацерация ломтика в месте укола с последующим потемнением размягченной ткани при контакте с воздухом, сопровождающиеся характерным запахом гниения.

Штаммы возбудителей, успешно прошедшие этапы выделения и предварительной идентификации, хранили в 15%-ном растворе глицерина при температуре -80°С до дальнейших исследований.

*Молекулярно-генетическую характеристику штаммов* проводили с использованием методов ПЦР-диагностики с последующим секвенированием образцов.

ДНК выделяли с использованием набора для экстракции ДНК «Фитосорб» (Синтол, Москва, Россия) согласно протоколу производителя из водной суспензии культуры бактерий, выращенной за 24 часа на среде King's B при 28 °С. Качество и количество выделенной ДНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). После экстракции ДНК хранили при -20°С до дальнейшего анализа.

Классический ПЦР-анализ проводили с использованием набора праймеров ADE1/ADE2 (размер продукта – 434 п.н), специфичных к фрагменту гена пектатлиазы *pelB Dickeya* sp. (Nassar et al., 1996). Температурно-временной профиль: начальная денатурация — 95 °С, 15 мин; последующие 35 циклов: денатурация — 95°С, 1,5 мин, отжиг — 57°С, 1 мин и элонгация — 72°С, 1 мин; завершающая элонгация — 72°С, 15 мин. А также, набора праймеров Pect1F ('5- САА Т(А,Г)С GAA ТАА TTC TTT CG(С,Т) GC -3') и Pect2R ('5- ССG АА(С,Т) ААС GAT СС(Г,Т) АСА Т -3'), сконструированных на основании фрагмента гена аланин-тРНК-синтазы *AlaRS Pectobacterium* sp. (размер продукта – 372 п.н). Температурно-временные параметры реакции включали этапы: начальная денатурация - 95°С, 10 мин; 34 цикла: денатурация - 95°С, 1 мин, отжиг - 52°С, 1 мин, элонгация - 72°С, 2 мин; и финальная элонгация - 72°С, 10 мин. Общий объем реакционной смеси для амплификации составлял 25 мкл и состоял из: 5 мкл 5×Master Mix (5×Mas<sup>DD</sup>TaqMIX-2025, Диалат, Россия), 2 мкл ДНК (20 нг) и 2 мкл



каждого праймера (10 пМ). Амплификацию проводили с использованием термоциклера T100 (Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США) с последующим разделением ампликонов электрофорезом в 1,5%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия в 0,5x TBE-буфере.

Подтверждение полученных результатов и уточнение видового состава выделенных штаммов возбудителей проводили при постановке ПЦР-РВ с использованием коммерческих наборов реагентов «ФИТОСКРИН» (РН-008, РН-029, РН-031, РН-032, РН-044, Синтол, Москва, Россия), применяемых для дифференциальной диагностики *Dickeya* и *Pectobacterium* sp., следуя инструкции производителя. Анализ проводили при помощи амплификатора CFX96 Touch (Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США).

Для детальной генетической характеристики штаммов проводили секвенирование последовательностей гена гиразы *gyrB* с использованием праймеров *gir1* (5'- СТТ АТГ АСТ ССТ САА ГТА ТСА АГГ Т-3') и *gir2* (5'- СТГ ГАА АСС АТС ГТТ ССА СТГ С -3') с предварительной детекцией ампликонов размером 1489 п.н. в агарозном геле. Параметры амплификации: начальная денатурация при 95 °С, 15 мин; 35 циклов, состоящих из: денатурации при 95°С, 1,5 мин, отжига при 57,5°С, 1 мин и элонгации при 72°С, 1 мин; завершающая элонгация при 72°С, 15 мин. Состав реакционной смеси и используемое оборудование было аналогично описанному выше при постановке классического ПЦР-анализа с праймерами ADE1/ADE2 и Pect1F/Pect2R. Продукты ПЦР были очищены от реакционной смеси с использованием набора ColGen (Синтол, Москва, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Секвенирование проводили по Сэнгеру в обоих направлениях на базе компании Синтол (Москва, Россия).

При анализе последовательностей гена *gyrB* штаммов *Pectobacterium* sp., выделенных в рамках данной работы, было проведено их сравнение с базой данной NCBI Genbank при помощи программы для определения величины сходства Basic Local Alignment Search Tool - BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В качестве критерия видовой идентичности использовали последовательности более

чем на 96% сходные с опубликованными ранее.

Обработку данных сэнгеновского секвенирования, проверку качества ридов и тримминг последовательностей делали с помощью программы Geneious v24.0.3 (<https://www.geneious.com/>). Выравнивание последовательностей ПЦР-ампликонов *gyrB* проводили с помощью программы MAFFT v7.48, используя алгоритм L-INS-i algorithm и стандартные параметры (Kato et al., 2013). Филогенетические деревья строили при помощи программы IQ-TREE v2.2.5 (Nguyen et al., 2015), используя автоматический поиск лучшей модели нуклеотидного замещения и бутстрэп-анализ (1000 реплик). Визуализацию результатов филогенетического анализа осуществляли с помощью программы iTOL v6 (Letunic, Bork, 2021).

## **2.2. Оценка биологических свойств возбудителей черной ножки картофеля**

В исследовании были использованы 3 штамма *Pectobacterium punjabense* (КА-4, КА-5, SATURN), выделенные в 2021 году из клубней картофеля с симптомами мягкой гнили, а также штаммы 4 других видов пектолитических бактерий (*Pectobacterium versatile* F002, *Pectobacterium atrosepticum* F004, *Pectobacterium brasiliense* F126 и *Pectobacterium parmentieri* F148) из коллекции лаборатории молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, описанные ранее (Lukianova et al., 2021).

*Биохимический профиль* каждого изолята определяли при помощи коммерческой системы анализа API 20E (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Франция). Инокулом для исследования получали путем отбора и суспензирования в буферном растворе в составе набора изолированной единичной колонии, культивированной в течение 24 часов на среде YD. Полоски тест-системы после инокуляции суспензией бактериальной культуры инкубировали в течение 24 часов при 28°C. Тест-система включала следующие тесты: ONPG (выработка β-галактозидазы), ADH (аргининдигидролаза), LDC (лизиндекарбоксилаза), ODC (орнитиндекарбоксилаза), CIT (утилизация цитрата), H<sub>2</sub>S (образование сероводорода), URE (выработка уреазы), TDA (утилизация тартрата), IND

(выработка индола), VP (выработка ацетоина), GEL (выработка желатиназы), GLU (ферментация глюкозы), MAN (ферментация маннита), INO (ферментация инозита), SOR (ферментация сорбита), RHA (ферментация рамнозы), SAC (ферментация сахарозы), MEL (ферментация мелибиозы), AMY (ферментация амигдалина), ARA (ферментация арабинозы) и тест на восстановление нитрита до нитрата. Исследование проводили в трехкратной повторности. Результаты интерпретировали в соответствии с инструкцией производителя.

*Исследования патогенности* пектобактериальных штаммов проводили на стеблях вегетирующих растений картофеля (Sima et al., 2015) сорта Удача. В качестве инокулюма использовали бактериальную суспензию 16-часовой культуры, выращенной на среде King's B при 28°C. Оптическая плотность бактериальной суспензии составляла при измерении спектрофотометром NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) 0.2 при 600 нм (О.П.<sub>600</sub>), что примерно соответствовало  $10^8$  КОЕ/мл. В качестве контроля использовали стерильную воду.

Перед инокуляцией растения картофеля выращивали при температуре 20°C и относительной влажности воздуха 70-75% в пластиковых горшках объемом 0,5 л на торфо-перлитовом субстрате (Велторф, Великие Луки, Россия) на стеллаже для роста растений СТЕЛЛАР-ФИТО LINE (АНО АВТех, Москва, Россия) со светодиодным освещением в 5000 люксов, режиме освещения 16/8 часов (день/ночь) и ежедневном поливом равными объемами воды. При достижении растениями четырехнедельного возраста стебли растений картофеля травмировали стерильной иглой на высоте 5 см над уровнем почвы. В стебель вводили 20 мкл бактериального инокулюма, а место инокуляции оборачивали лабораторной лентой Parafilm M (Amcor, Цюрих, Швейцария) для предотвращения высыхания капель бактериальной суспензии, согласно описанным ранее методикам (Azadmanesh et al., 2022; Mitchell McGrath et al., 2002). Учет проводили спустя 72 часа после заражения. Для каждого штамма и отрицательного контроля инокулировали по 3 побега на растении в 3-кратной повторности.

По завершению опыта для подтверждения постулатов Коха, штаммы были повторно реизолированы из инфицированной ткани стебля на среду CVP-SL и рассеяны до единичных колоний, аналогично протоколу выделения, описанному ранее. Идентичность выделенных штаммов исходным, используемым для заражения, подтверждали согласно их биохимическим и морфологическим характеристикам.

*Вирулентность* различных штаммов пектолитических бактерий оценивали путем инокуляции ломтиков картофеля сорта Удача. Для анализа клубни поверхностно стерилизовали 70 %-ным этанолом, трижды промывали дистиллированной водой, срезали кожуру, очищали от кожуры и разрезали на ломтики толщиной 5 мм. Центр каждого ломтика повреждали уколom на глубину 2 мм стерильной зубочисткой, предварительно смоченной в бактериальной суспензии патогенов. Поверх ломтика на место укола наносили 10 мкл инокулюма в концентрации  $10^8$  КОЕ/мл и помещали их в стеклянные чашки Петри на увлажненную стерильную фильтровальную бумагу (4 слоя). В качестве отрицательного контроля - стерильная вода. Герметично закрытые пищевой пленкой чашки Петри с ломтиками инкубировали в термостате в течение 48 часов при температурах в 16, 20, 24 и 28°C. Измерение диаметров зоны мацерации проводили электронным штангенциркулем каждые 24 часа. Опыты проводили в 4-кратной повторности каждого варианта.

*Интенсивность роста бактерий при различных температурах* контролировали с помощью биореактора Biosan RTS-8 (Biosan, Рига, Латвия). Культивирование патогенов проводили в аэрируемых пробирках на 50 мл с мембранным фильтром TubeSpin® заполненных на 15 мл жидкой питательной средой King's B. Перед культивированием в каждую пробирку вносили по 15 мкл бактериального инокулюма ( $O.P._{600} = 0.2$ ), суспензированного в жидкой среде King's B. В качестве контроля также использовали жидкую среду King's B в равном объеме. Пробирки были установлены в биореактор, культивирование проходило при скорости 1250 об/мин в течении 30 часов при температурах 18, 21, 24, 27, 30 и

33°C с измерением оптической плотности каждые 30 мин. Каждый вариант опыта был проведен в трехкратной повторности.

### **2.3. Разработка ПЦР в реальном времени для диагностики возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля *Pectobacterium punjabense***

*Молекулярно-генетическую характеристику штаммов Pectobacterium punjabense* проводили согласно методам, описанным в 2.1 с дополнениями.

В исследовании использовали штаммы *P. punjabense* КА-4, КА-5 и SATURN выделенные из зараженного посадочного материала в 2020–2021 гг., а также штаммы *P. versatile* (F002, F016, F135), *P. atrosepticum* (F048, F162, F163), *P. brasiliense* (F126, F157), *P. parmentieri* (F148) из коллекции лаборатории молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, штамм *D. solani* (DFil) из коллекции лаборатории защиты растений РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева (Карлов и др., 2010), и штаммы *D. chrysanthemi* (DSM 4610), *D. dadantii* (DSM 18020) из международной коллекции DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Брауншвейг, Германия).

Для детальной генетической характеристики штаммов *P. punjabense* проводили их секвенирование по Сэнгеру на базе компании Евроген (Москва, Россия) с использованием набора праймеров для амплификации гена 16S рРНК 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') и 1492R (5'-TAC CYT ACC TTG TTA CGA CTT-3') и предварительной визуализацией в агарозном геле ампликонов размером около 1200 п.н. Режим термоциклирования состоял из начальной денатурации при 95 °С в течение 3 мин, затем 29 циклов: денатурация при 95 °С в течение 30 с, отжиг при 45 °С в течение 30 с и элонгация при 72 °С в течение 45 с и финальная элонгация при 72 °С в течение 6 мин (Lane, 1991). Состав и этапы очистки реакционной смеси, а также используемое оборудование были аналогичны описанным в 2.1 для ПЦР-анализа с праймерами gir1/gir2.

*Секвенирование генома* штамма *Pectobacterium punjabense* SATURN проводили с использованием в качестве исходного материала 100 нг геномной ДНК на базе компании Биоспарк (Москва, Россия).

ДНК фрагментировали с использованием аппарата сфокусированного ультразвука ME220 (Covaris, Воберн, Массачусетс, США) со следующими параметрами: итераций —7; продолжительность—10 с; пиковая мощность — 50; коэффициент заполнения —20%; циклов на партию — 1000.

Библиотеки были подготовлены с использованием набора Nextera DNA Flex library prep kit (Illumina Inc., Сан-Диего, Калифорния, США) в соответствии с инструкциями производителя. По результатам секвенирования, проведенного на приборе MiSeq, было получено  $2 \times 300$  считываний п.н. Данные были собраны с использованием CLC Genomic workbench v. 7.5 (QIAGEN, Орхус, Дания) и депонированы в NCBI GenBank под регистрационным номером JBBWSM000000000. Группировка считываний была выполнена с помощью программного обеспечения MetaBAT v2 (Kang et al., 2019). Согласно оценке, проведенной при помощи программы CheckM v1.1.6 (Parks et al., 2015), полнота сборки генома составила 98,66%, контаминация образца 0,55%

Расчеты средней идентичности нуклеотидов (Average Nucleotide Identity – ANI), их кластеризация и визуализация были выполнены с использованием программ fastANI v1.34 (Parks et al., 2015) и ANIclustermap (<https://github.com/moshi4/ANIclustermap>; дата обращения 1 мая 2024 года). Филогенетический анализ проводился с использованием метода UBCG2, основанного на использовании актуальных генов бактериального ядра, присутствующих в единственной копии во всем бактериальном геноме (Jain et al., 2018) и программного обеспечения IQ-TREE v2.3.3 (Nguyen et al., 2015), позволяющего определить лучшую модель нуклеотидных замен с использованием 1000 бутстреп-повторностей. Филогенетические деревья визуализировали с помощью программы iTOL v6 (Letunic, Bork, 2021).

Для *первичной оценки видоспецифичности праймеров к Pectobacterium ripunjabense* была поставлена классическая ПЦР с детекцией ампликонов размером около 518 п.н. в агарозном геле, определенном при сравнении размера продукта с маркером молекулярного веса 1 kb (Евроген, Москва, Россия). Параметры амплификации были следующие: первичная денатурация – 15 мин при 95 °С; затем

35 циклов из: денатурации – 1,5 мин при 95°C, отжиг – 1 мин при 60°C, элонгация – 1 мин при 72°C; заключительная элонгация – 15 мин при 72°C. Каждая реакция проводилась в объеме 25 мкл и содержала 5 мкл 5xMaster Mix (5xMas<sup>DD</sup>TaqMIX-2025, Диалат, Москва, Россия), 5 пМ каждого праймера (Таблица 1) и 20 нг матричной ДНК. ПЦР-ампликоны разделяли электрофорезом в окрашенном 1,5% агарозном геле с бромидом этидия и документировали с помощью GelDocXR+ (Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США).

Таблица 1. Последовательности праймеров, зонда и ампликона видоспецифичной области у *P. punjabense*

Праймер / зонд	Нуклеотидная последовательность (направление 5'-3')	Последовательность ампликона для типового штамма
РесpunF	CACAACCTTAACAATACCGGCG	CACAACCTTAACAATACCGGCG TCACCGCACCAACCACAAGAGAT GCCGTCTGCTTCCCCATCCAAAA AGTTGTCTTTCATGATGCAGAGT CGTCCCAGCGAAAGATCGCACG GCCATTCAGCAACGCTACCAAAG CCGCTGCCTTGATTTAGCCACAA TCCATAACGCCGTGAGGGAAACC ACCAATGCCTACCTCAATCGTGG CTTTGTCAACAGTCAGGCCTATTT ACAGGAGCAAGACCTCTCCGGCG GCACGCTCATCATCAGCGTCAGC GAGGGAAAGATAGAAGCTATTTCG CATGGAAGGGGAAACGCCACTCG CAATCAAGATGGCCTTCCCTAGG CTGGAAGGACATATTCTTAATCT GCGCGACATCGAACAAGGGATG GAACAGTTGAATCGTCTGCCTTC GCAGCAGGTTGCCATTGATATTC AACCGGGAAAACAAGCAGGGAG TTCGATTGTTTATCTCAAGCGCAC CACGCAAGCCCGTCCGTGCACCC TCTCTCTCAGCG
РесpunR	CGCTGAGAGAGAGGGTGACA	
Ресpun	(FAM)- TCATGATGCAGAGTCGCTCC- (RTQ1)	

Оценку чувствительности и специфичности ПЦР-РВ проводили с использованием зондов TaqMan в режиме реального времени при помощи амплификатора CFX96 Touch (Bio-Rad, Калифорния, США). Термоциклирование выполнялось в следующем режиме: начальная денатурация 94 °C в течение 5 мин;

45 циклов: денатурация при 94 °С в течение 30 с, отжиг при 60 °С в течение 10 с и элонгация при 72 °С в течение 10 с. Каждая реакция содержала 10 мкл 2,5×Master Mix (2,5×Mas<sup>ED</sup>MIX-2025, Диалат, Москва, Россия), по 5 пМ прямого и обратного праймеров, 5 пМ флуоресцентной пробы, меченной 50-репортерным красителем (FAM-6-карбоксифлуоресцеин (FAM)) и 30-концевым гасящим красителем (RTQ1), синтезированные компанией Синтол (Москва, Россия) (Таблица 1) и 2 мкл матричной ДНК. Конечная концентрация каждого дезоксинуклеотидтрифосфата (dNTP) составляла 0,2мМ, а концентрация магния – 1,25 мМ.

*Специфичность* разработанных праймеров была оценена по отношению к 3 штаммам-мишеням и 12 ранее идентифицированным родственным штаммам различных видов *Pectobacterium* и *Dickeya*.

*Чувствительность детекции* оценивали с использованием серийных 10-кратных разведений очищенной геномной ДНК штамма *P. punjabense* SATURN в диапазоне от 25 до 0,0025 нг/мкл. Каждое разведение применяли в качестве матрицы для ПЦР в реальном времени.

*Эффективность ПЦР* рассчитывали путём построения стандартной кривой с использованием программного обеспечения CFX Maestro™ 1.0 v.4.0.2325.0418 (Bio-Rad, Калифорния, США). Все эксперименты проводили в трех экземплярах за один цикл и повторяли трижды. Таким образом, получилось девять технических повторов. В качестве отрицательного контроля проводили реакции с водой без внесения ДНК.

#### **2.4. Скрининг медьсодержащих фунгицидов для борьбы с черной ножкой картофеля**

В качестве типового штамма использовали референтный штамм *Dickeya chrysanthemi* (DSM 4610) из немецкой коллекции микроорганизмов DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Брауншвейг, Германия). А также, штаммы бактерий *Pectobacterium brasiliense* (РФ, Брянская обл., Ставропольская обл., Омская обл., Томская обл.), *Pectobacterium carotovorum* (РФ, Брянская обл., Томская обл., Красноярский край), *Pectobacterium versatile* (РФ, Тверская обл., Московская обл.) и *Pectobacterium punjabense* (первоначально определенный как



*Pectobacterium wasabiae*) (РФ, Кемеровская обл.), выделенные из зараженного посадочного материала в 2020-2021 гг. и идентифицированные согласно 2.1.

В качестве исследуемых фунгицидов выступали медьсодержащие Курзат Р, СП (42 г/кг цимоксанил + 689,5 г/кг меди хлорокись, ДюПон Химпром, Россия) и Ридомил Голд Р, ВДГ (20 г/кг мефеноксам и 142 г/кг меди охсихлорид, Сингента, Россия).

*Оценку бактерицидных свойств фунгицидов* проводили на картофельно-глюкозном агаре (HiMedia, Мумбай, Индия) с добавлением фунгицидов в концентрациях 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 и 1% по препарату (Ни и et., 2008). Расчёт расхода рабочего раствора для внесения в питательную среду КГА осуществляли исходя из рекомендуемых производителем норм применения: для Ридомила Голд Р - 5 кг/га препарата при расходе рабочего раствора 300 л/га; для Курзат Р – применение препарата 2 кг/га при расходе рабочего раствора 400 л/га. Необходимые концентрации препарата в среде достигались путем добавления в питательную среду КГА заранее подготовленных растворов препарата с соответствующим содержанием действующего вещества в растворе из расчёта 20 мл раствора на 80 мл среды. В качестве контроля использовали среду КГА с добавлением 20 мл дистиллированной воды к 80 мл питательной среды. Рабочие растворы препаратов вносили в среду КГА после стерилизации автоклавированием (121°C, 15 минут) при перемешивании на магнитной мешалке, затем полученную смесь разливали по чашкам Петри по 20 мл (Дацюк, Джалилов, 2022). После отвердения поверхность питательной среды засеивали 100 мкл десятикратных разведений суспензий патогенов в стерильной воде. Засеянные чашки Петри инкубировали при 28°C в течение 24 ч. Бактерицидное действие фунгицидов оценивали путем подсчета числа бактериальных колоний в различных вариантах.

Дополнительно были проведены *исследования по оценке эффективности фунгицида по отношению к эпифитной популяции патогенов в лабораторных условиях*. Для этого были проведены опыты с использованием методов отпечатков листьев картофеля на питательные среды с целью доказательства возможности

сохранения пектолитических бактерий на листовой поверхности картофеля (Дацюк, 2022а).

Для реализации эксперимента, со среднего яруса вегетирующих в теплице растений картофеля сорта Гала отбирали листья среднего размера, тщательно промывали в проточной воде, дезинфицировали 70%-ным этанолом. Бактериальную суспензию возбудителей черной ножки плотностью  $10^6$  КОЕ/мл наносили на поверхность листьев с помощью шприца на 1 мл из расчета 100 мкл на лист. Далее листья оставляли на два часа до полного высыхания капель бактериальной суспензии, после чего раскладывали листья на поверхности трех питательных сред CVP-SL, King's B и КГА с добавлением Ридомила Голд Р, 1%, контролируя полное соприкосновения листа с поверхностью питательной среды. Чашки Петри вместе с листьями инкубировали в термостате при  $28^{\circ}\text{C}$  в течение 2 часов. Затем чашки извлекали из термостата, удаляли из чашек листья и вновь помещали чашки Петри в термостат при той же температуре. Учет роста колоний проводили для сред King's B и КГА через 24 часа, для среды CVP-SL - спустя 72 часа инкубации. Опыт проводили в трехкратной повторности.

Оценку антибактериального действия фунгицида Ридомил Голд Р при нанесении фунгицида непосредственно на листовую поверхность также оценивали при помощи метода отпечатков. Для этого часть дезинфицированных листьев картофеля обрабатывали Ридомилом для последующей оценки защитного действия, часть оставляли в качестве контроля, без обработки. Обработку фунгицидом проводили при одинаковой рекомендуемой концентрации рабочего раствора (5 кг/га при расходе 300 л) при помощи автоматической пипетки при расходе раствора 500 мкл на лист, так чтобы фунгицид полностью покрывал всю поверхность листа. В контроле листья обрабатывали 500 мкл стерильной воды. После высыхания капель фунгицида и воды по поверхности листьев распределяли бактериальные суспензии плотностью  $10^8$ ,  $10^6$ ,  $10^4$  КОЕ/мл из расчета 100 мкл суспензии на лист. После полного высыхания капель суспензии листья раскладывали по питательным средам КГА. Чашки Петри вместе с листьями инкубировали при  $28^{\circ}\text{C}$  в термостате в течение 2 часов. Затем чашки извлекали из

термостата, удаляли из них листья и вновь помещали чашки Петри в термостат при той же температуре на 24 часа. Эксперимент проводили в трехкратной повторности.

Для разработки наиболее эффективной стратегии защиты картофеля от эпифитной популяции возбудителей черной ножки была проведена серия опытов, моделирующих передачу эпифитной популяции от листа к листу посредством механического контакта, капельным путем и оценена продолжительность сохранения бактериального инокулюма на поверхности орудий труда, а также, показан защитный эффект от применения фунгицида при передаче патогенов выше обозначенными путями (Дацюк, 2022b).

Для оценки способности фунгицида предотвращать заселение листовой поверхности картофеля возбудителями черной ножки при передаче патогенов от листа к листу через механический контакт, листья картофеля, как и в предыдущих опытах, отбирали, дезинфицировали, часть обрабатывали фунгицидом в аналогичном количестве, часть – стерильной водой. После чего необработанные фунгицидом листья инокулировали 100 мкл суспензией патогена плотностью  $10^8$  КОЕ/мл и оставляли до полного высыхания капель суспензии бактерий. Затем накладывали на инокулированные листья по одному листу картофеля сверху: в первом варианте – обработанному фунгицидом, во втором – без обработки. Листья совместно инкубировали в термостате при  $28^{\circ}\text{C}$  в течение 2 часов, по прошествии которых их извлекали из термостата и делали отпечатки листьев на среду КГА с последующим инкубированием чашек Петри с листьями в термостате при той же температуре в течение 3 часов (Рисунок 1). После чего удаляли листья из чашек Петри, а сами чашки с полученными отпечатками вновь возвращали в термостат при той же температуре на 24 часа.

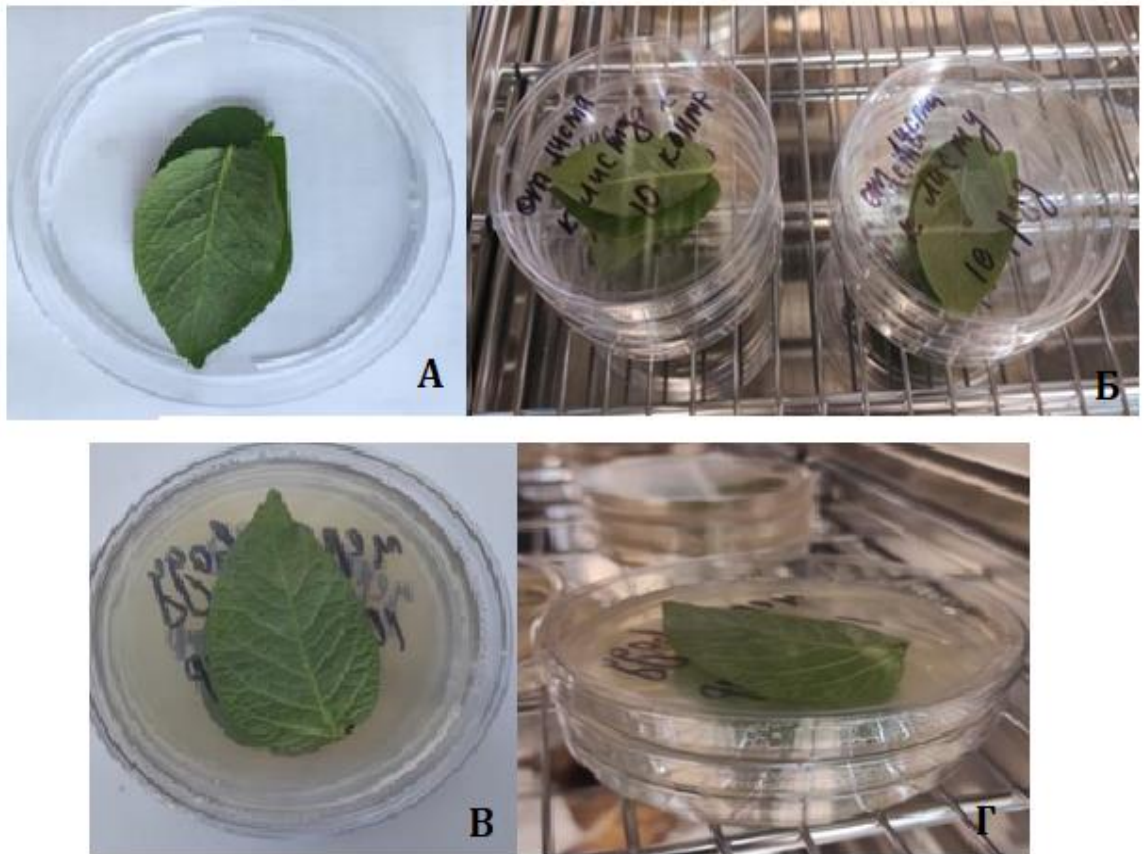


Рисунок 1. Этапы проведения эксперимента по моделированию передачи патогенных бактерий от листа к листу механическим путем (А – наложение на лист инокулированный суспензией патогенов листа обработанного Ридомилом; Б – инкубирование чашек с соприкасающимися листьями в термостате; В – отпечатывание листьев на среду КГА; Д – инкубирование чашек с листьями, соприкасающимися со средой, в термостате)

Подготовка к проведению эксперимента по *оценке способности фунгицида Ридомил Голд Р предотвращать заселение листовой поверхности картофеля возбудителями черной ножки при передаче патогенов капельным путем* проходила аналогично описанным выше опытам. Часть листьев обрабатывали фунгицидом в известной концентрации, часть – оставляли без обработки. Необработанные листья инокулировали 100 мкл суспензией патогена плотностью  $10^8$  КОЕ/мл, после высыхания капель которой наносили на каждый лист по 200 мкл стерильной воды. Через 10 минут воду с листьев собирали при помощи автоматической пипетки и переносили по 100 мкл данной воды: в первом варианте – на лист, обработанный фунгицидом и во втором варианте – на необработанный

лист (Рисунок 2). После высыхания капля делала отпечаток листьев на среду КГА, убирали чашки Петри с листьями в термостат при 28°C на 3 часа, по прошествии которых листья извлекали из чашек Петри, инкубацию которых продолжали ещё в течение 24 часов.

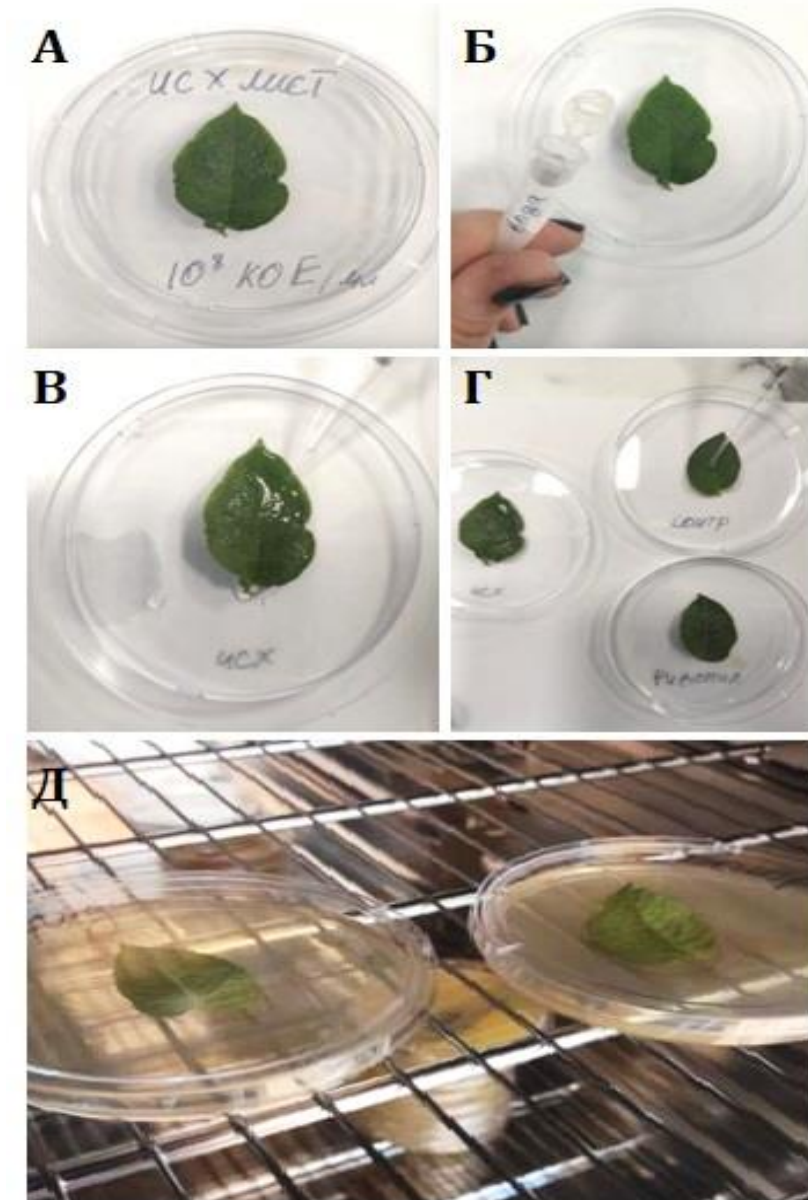


Рисунок 2. Этапы проведения эксперимента по моделированию передачи патогенных бактерий от листа к листу капельным путем (А – инокуляция суспензией патогенов продезинфицированных и не обработанных Ридомилом листьев с последующим просушиванием капель суспензии, для моделирования листа с исходным заражением; Б – нанесение на каждый лист стерильной воды, имитирующей дождевую влагу; В, Г - отбор воды с исходного листа и нанесение её на контрольные листья без обработок и на листья, обработанный Ридомилом; Д - отпечатывание листьев на среду КГА с последующим инкубирование чашек в термостате)

Для оценки способности возбудителей черной ножки картофеля продолжительное время сохраняться на поверхностях орудий труда были использованы предварительно промытые под проточной водой, дезинфицированные 70%-ным раствором этанола и высушенные в стерильном ламинарном боксе 4 металлические и 4 полипропиленовые пластины (Рисунок 3). Две металлические и две полипропиленовые пластины подвергли обработке фунгицидом, путем погружения на 5 минут в раствор в той же концентрации, при которой проходила обработка листьев в предыдущих экспериментах. Ещё две металлические и две полипропиленовые пластины оставляли без обработок для контроля заражения. Спустя час проводили инокуляцию бактериальной суспензией плотностью  $10^8$  КОЕ/мл всех 8-ми пластин. После инокуляции, половину всех пластин - 2 металлические (одна - обработанная фунгицидом, другая – нет) и 2 полипропиленовые (одна - обработанная фунгицидом, другая – нет) - оставляли в стерильном ламинарном боксе на 6 часов, другую половину пластин - на сутки. По прошествии обозначенного времени делали отпечатки пластин на питательные среды КГА по принципу отпечатков с листьев. Чашки Петри с отпечатками пластин на средах инкубировали в термостате при  $28^{\circ}\text{C}$  в течение 24 часов.

Для количественной оценки полученных данных была использована программа LeafDoctor (Pethybridge, Nelson, 2015), с помощью которой оценивали площадь, занимаемую бактериальными колониями в процентах от общей площади листа/пластины. Каждый из трех вышеописанных опытов проводили в трехкратной повторности.

*Оценку степени патогенного влияния популяции пектолитических бактерий на листовые пластины и побеги картофеля* проводили по тому же принципу, что и при постановке предыдущих опытов.

Листья отбирали, дезинфицировали, часть обрабатывали Ридомилом, часть оставляли без обработки для контроля. Обработку фунгицидом также проводили при рекомендуемой концентрации рабочего раствора (5 кг/га при расходе 300 л.) при расходе раствора 250 мкл на лист. Листья предназначенные для контроля

заражения обрабатывали 250 мкл стерильной воды. После высыхания каплей воды и фунгицида на все листья наносили суспензию патогенов *Dickeya chrysanthemi* плотностью  $10^6$  КОЕ/мл из расчета 50 мкл на лист, на листья отрицательного контроля наносили 50 мкл стерильной воды. Листья помещали в стерильные чашки Петри в условия влажной камеры. Чашки Петри вместе с листьями инкубировали в термостате при  $28^{\circ}\text{C}$  в течение 2-х дней.

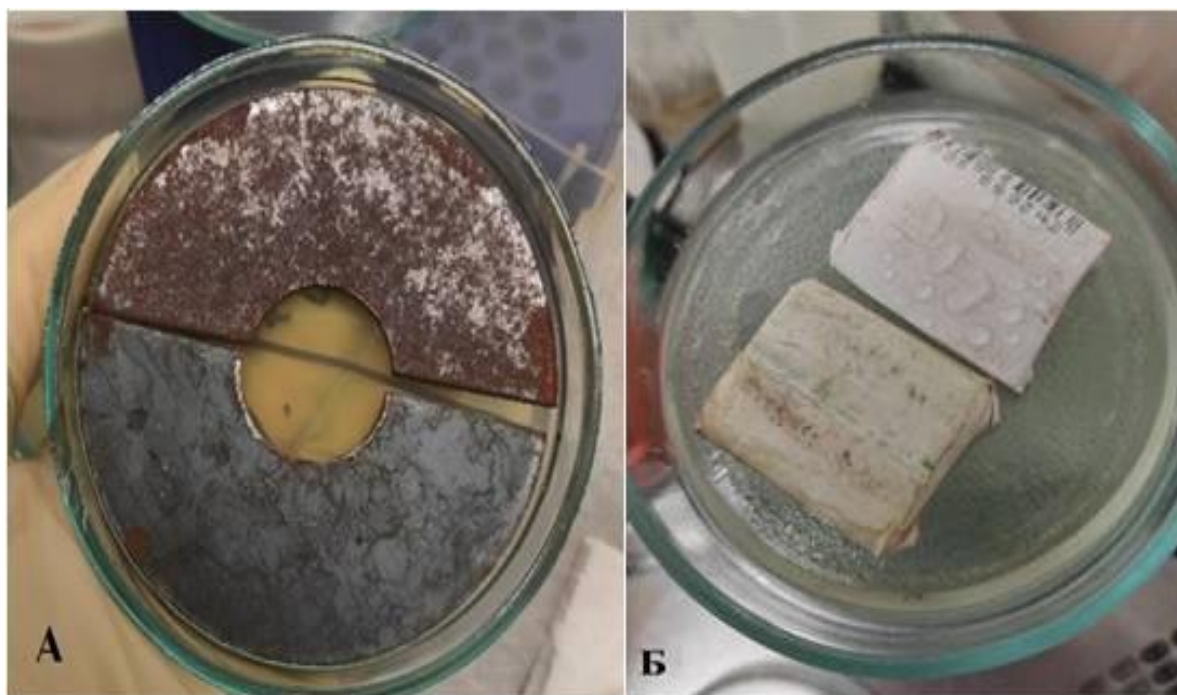


Рисунок 3. Пластины, подготовленные для инокуляции возбудителям черной ножки картофеля *Dickeya chrysanthemi* (А – металлические пластины; Б – полипропиленовые пластины)

Аналогичный опыт проводили с побегами картофеля. Для этого были отобраны побеги с вегетирующих в теплице растений, тщательно промыты под проточной водой и продезинфицировали 70%-ным раствором этанола. Побеги устанавливали в стерильные колбы, наполненные водой. Часть побегов предварительно обрабатывали из пульверизатора Ридомилом Голд Р в вышеописанной концентрации рабочего раствора при расходе 10 мл на побег, так чтобы фунгицид равномерно покрывал все листья на побеге, часть бегов - обрабатывали 10 мл стерильной воды. После высыхания каплей воды и фунгицида при помощи пульверизатора равномерно распределяли бактериальную суспензию патогенов *Dickeya chrysanthemi* плотностью  $10^6$  КОЕ/мл по поверхности побегов из

расчета 5 мл на побег. Также присутствовал контрольный вариант без обработки фунгицидом и без обработки суспензией бактерий, который обрабатывали 15 мл стерильной воды. Таким образом было сформировано три варианта, каждый из которых был помещен в отдельную колбу: обработка фунгицидом + обработка суспензией патогенных бактерий; обработка стерильной водой + обработка суспензией бактерий (контроль заражения); двойная обработка стерильной водой (отрицательный контроль). Каждый побег накрывали целлофановым пакетом, перетянутым резинкой на горлышке колбы для создания условий 100%-ной влажности. Колбы вместе с побегами инкубировали в термостате при 28°C в течение 3-х дней.

Пектолитическую активность патогенов оценивали визуально: в опыте с листьями через двое суток, в опыте с побегами - через трое, согласно шкале интенсивности симптомов, где 0 баллов – отсутствие видимых симптомов, 1 балл - потемнение и/или мацерация менее 50% листа/побега, 2 балл - потемнение и/или мацерация более 50% листа/побега. Оба вышеописанных эксперимента проводили в шестикратной повторности.

За счет создания искусственных инфекционных фонов на вегетирующих растениях картофеля была смоделирована передача заболевания посредством стекания бактериального экссудата с пораженных побегов, предварительно инокулированного растения, на вегетирующее здоровое растение. Для проведения эксперимента использовали семенные клубни картофеля сорта Гала, высаженные в пластиковые горшки объемом 0,5 л в торфо-перлитовом субстрате (Велторф, Великие Луки, Россия). Растения выращивали в условиях стеклянной теплицы при температуре 32/24 °C (день/ночь), относительной влажности воздуха 70–75 %, естественном освещении, с ежедневным поливом равными объемами воды. На 20 день вегетации проводили заражение растений картофеля по тому же принципу, по которому проводили лабораторные опыты с заражением отдельных побегов. Бактериальную суспензию патогенов *Dickeya chrysanthemi* плотностью  $10^8$  КОЕ/мл равномерно распределяли по поверхности побегов с помощью пульверизатора из расчета 60 мл на растения. Для инициирования процесса заражения побеги



накрывали темными полиэтиленовыми пакетами, а сами горшки устанавливали в емкости, наполненные водой, так чтобы вода не достигала уровня дна горшка с растением, но поддерживалась повышенная влажность. Спустя сутки пакет снимали, горшок с растением извлекали из емкости с водой и оставляли в естественных условиях теплицы ещё на сутки. На второй день от заражения растений оценивали результат пектолитической активности патогенных бактерий, отбирая для дальнейших экспериментов только растения с признаками загнивания листьев/стеблей, сопровождающиеся выделением бактериального экссудата на местах поражения (Рисунок 4).



Рисунок 4. Патогенное влияние возбудителя черной ножки картофеля *Dickeya chrysanthemi* на вегетирующие растения картофеля на 2-й день после искусственной инокуляции суспензией патогена (А – загнивание стебля картофеля, В – проявление пектолитической активности на листе картофеля)

Затем рядом с каждым пораженным растением устанавливали по одному горшку с вегетирующим здоровым растением, поверхностно обработанным стерильной водой из расчета 60 мл на растение, так, чтобы зараженное растение соприкасалось со здоровым. После чего устанавливали оба растения в емкость с водой, как описано выше, накрывали сверху одним темными полиэтиленовым

пакетом, так чтобы поддерживались одинаковые условия и побеги обоих растений имели контакт друг с другом. Спустя сутки горшки извлекали из емкости с водой, фиксировали промежуточные результаты эксперимента, после чего растения опять накрывали одним пакетом, но не устанавливали в емкость с водой. Ещё через сутки фиксировали окончательные результаты эксперимента, согласно четырехбалльной шкале интенсивности симптомов заболевания, где 0 баллов – отсутствие симптомов, 1 балл – пожелтение отдельных листьев, 2 балла – пожелтение листьев и/или гнивание листьев/стеблей, 3 балла – частичное увядание растения, сопровождающееся почернением стебля, 4 балла – полное увядание, сопровождающееся усыханием растения. Эксперимент проводили в девятикратной повторности.

*Оценка защитного действия Ридомил Голд Р против возбудителей черной ножки картофеля на вегетирующем растении при обработке по листу.* При проведения данного опыта, как и при предыдущем эксперименте, были использованы вегетирующие в горшках растения картофеля сорта Гала. На каждом растении картофеля были отмечены по 1 побегу 3-х вариантов обработки, общее количество повторностей - 23. В первом варианте - побеги предварительно обрабатывали из пульверизатора Ридомилом Голд Р при рекомендуемой концентрации рабочего раствора (5 кг/га при расходе 300 л) при расходе раствора 10 мл на побег, так чтобы фунгицид равномерно покрывал все листья на побеге, после высыхания капель фунгицида при помощи пульверизатора равномерно распределяли бактериальную суспензию патогена *Dickeya chrysanthemi* плотностью  $10^8$  КОЕ/мл по поверхности побегов из расчета по 5 мл на побег. Вторым вариантом обработки служил контроль заражения, на котором вместо предварительной обработки фунгицидом проводили обработку стерильной водой при расходе 10 мл на побег, после высыхания капель которой проводили инокуляцию бактериальной суспензией патогенов плотностью  $10^8$  КОЕ/мл по поверхности побегов из расчета 5 мл на побег. Третьим вариантом обработки выступал отрицательный контроль, на котором проводили только обработку 15 мл стерильной воды. Все варианты обработок присутствовали на одном растении,

выращиваемом в одном горшке. После проведения всех обработок растение в горшке устанавливали в емкость с водой и накрывали темным полиэтиленовым пакетом, как при предыдущем эксперименте. Спустя двое суток горшок извлекали из емкости с водой, при этом пакет с растения не снимали. Спустя ещё сутки с вегетирующего растения снимали пакет и оставляли горшок в естественных условиях теплицы ещё на двое суток. На пятый день от инокуляции растений фиксировали результаты эксперимента, согласно шкале интенсивности поражения от 0 до 4 баллов, описанной выше. Распространённость рассчитывали, как процентное соотношение растений с симптомами к их общему количеству.

## **2.5. Использование веществ растительного происхождения в защите картофеля от возбудителей черной ножки**

Оценки антибактериальных свойств эфирных масел и экстрактов растений проводили с использованием референтных штаммов пектолитических бактерий *Dickeya chrysanthemi* (DSM 4610), *Dickeya dadantii* (DSM 18020), *Pectobacterium carotovorum* (DSM 30168), и *Pectobacterium odoriferum* (DSM 22556).

Первичный скрининг антибактериальной активности эфирных масел и экстрактов растений были проведены с применением эфирных масел 25 растений и 7 растительных экстрактов (4 водных и 3 этанольных) из 6 растений. Выбор эфирных масел и растительных экстрактов был основан на сообщениях об их антибактериальной активности (Таблица 2).

Растительные образцы для последующего выделения эфирных масел и экстрактов растений были собраны в Ботаническом саду Первого МГМУ имени И. М. Сеченова в июле 2021 г. После сбора образцы растений высушивали в темном вентилируемом помещении в течение 20 дней.

При извлечении эфирных масел растительные образцы измельчали и подвергали гидродистилляции с использованием аппарата Клевенджера. Маслянистый слой, находящийся поверх водного дистиллята, отделяли и сушили над безводным сульфатом натрия для удаления остаточной воды из эфирного масла. Экстрагированные эфирные масла хранили в герметичных пробирках при 4°C до дальнейшего анализа (El Gendy et al., 2015).

Таблица 2. Список растительных образцов, используемых для выделения эфирных масел и экстрактов растений

Источник выделения			Орган выделения	Упоминание в научной литературе
Название (рус.)	Название (лат.)	Семейство		
Эфирные масла				
Анис обыкновенный	<i>Pimpinella anisum</i> L.	Зонтичные ( <i>Apiaceae</i> )	Семена	(Redfern et al., 2014)
Гвоздичное дерево	<i>Syzygium aromaticum</i> L.	Миртовые ( <i>Myrtaceae</i> )	Стебли, листья, соцветия	(Alkan, Yemenicioğlu, 2016)
Душица обыкновенная	<i>Origanum vulgare</i> L.	Яснотковые ( <i>Lamiaceae</i> )	Листья, стебли	(Ха, Джалилов, 2014)
Кардамон настоящий	<i>Elettaria cardamomum</i> L.	Имбирные ( <i>Zingiberaceae</i> )	Семена	(Alam et al., 2021)
Кориандр посевной	<i>Coriandrum sativum</i> L.	Зонтичные ( <i>Apiaceae</i> )	Семена	(Silva et al., 2011)
Коричник китайский	<i>Cinnamomum cassia</i> L.	Лавровые ( <i>Lauraceae</i> )	Листья	(Huang et al., 2014)
Лаванда узколистная	<i>Lavandula angustifolia</i> MILL.	Яснотковые ( <i>Lamiaceae</i> )	Листья, соцветия	(Jianu et al., 2013)
Лайм настоящий	<i>Citrus aurantiifolia</i> (CHRISTM.) SWINGLE	Рутовые ( <i>Rutaceae</i> )	Кожура плодов	(Lemes et al., 2018)
Мандарин Клементин	<i>Citrus unshiu</i>	Рутовые ( <i>Rutaceae</i> )	Кожура плодов	(Yang, Kang, 2013)
Мята длиннолистная	<i>Mentha longifolia</i> L.	Яснотковые ( <i>Lamiaceae</i> )	Стебли, листья, соцветия	(Javed, Nadhman, 2020)
Мята перечная	<i>Mentha piperita</i> L.	Яснотковые ( <i>Lamiaceae</i> )	Стебли, листья, соцветия	(Dhaliwal et al., 2004)
Пижма обыкновенная	<i>Tanacetum vulgare</i> L.	Астровые ( <i>Asteraceae</i> )	Листья, соцветия	(Ravari et al., 2013)
Пихта сибирская	<i>Abies sibirica</i> LEDEB.	Сосновые ( <i>Pinaceae</i> )	Ветви, хвоя	(Salamon et al., 2019)
Розмарин обыкновенный	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Яснотковые ( <i>Lamiaceae</i> )	Листья, соцветия	(Zaouali et al., 2010)

Ротанговая пальма	<i>Calamus rotang</i> L.	Пальмовые ( <i>Arecaceae</i> )	Корневище	(Radušienė et al., 2007)
Рута душистая	<i>Ruta graveolens</i> L.	Рутовые ( <i>Rutaceae</i> )	Листья, стебли	(Nahar et al., 2021)
Тимьян обыкновенный	<i>Thymus vulgaris</i> L.	Яснотковые ( <i>Lamiaceae</i> )	Листья, соцветия	(Oliva et al., 2015)
Тмин обыкновенный	<i>Carum carvi</i> L.	Зонтичные ( <i>Apiaceae</i> )	Семена	(Khosravipour, Rezaeian-Doloei, 2015)
Тысячелистник обыкновенный	<i>Achillea millefolium</i> L.	Астровые ( <i>Asteraceae</i> )	Соцветия	(Kotan et al., 2014)
Фенхель обыкновенный	<i>Foeniculum vulgare</i> MILL.	Зонтичные ( <i>Apiaceae</i> )	Семена	(Kalleli et al., 2020)
Цитрус бергамот	<i>Citrus aurantium</i> subsp. <i>bergamia</i>	Рутовые ( <i>Rutaceae</i> )	Кожура плодов	(Fisher, Phillips, 2006)
Чабер садовый	<i>Satureja hortensis</i> L.	Яснотковые ( <i>Lamiaceae</i> )	Стебли, листья, соцветия	(Redfern et al., 2014)
Чёрный тмин	<i>Nigella sativa</i> L.	Лютиковые ( <i>Ranunculaceae</i> )	Семена	(Behidj-Benyounes et al., 2017)
Чеснок посевной	<i>Allium sativum</i> L.	Амариллисовые ( <i>Amaryllidaceae</i> )	Дольки луковицы	(Bhat et al., 2017)
Шалфей лекарственный	<i>Salvia officinalis</i> L.	Яснотковые ( <i>Lamiaceae</i> )	Листья, соцветия	(Sookto et al., 2013)
Растительные экстракты				
Бадан толстолистный	<i>Bergenia crassifolia</i> L.	Камнеломковые ( <i>Saxifragaceae</i> )	Корневище	(Kraśniewska et al., 2015)
Дуб обыкновенный	<i>Quercus robur</i> L.	Буковые ( <i>Fagaceae</i> )	Кора	(Vasilchenko et al., 2022)
Кедр сибирский	<i>Pinus sibirica</i> DU TOUR	Сосновые ( <i>Pinaceae</i> )	Хвоя	(Amri et al., 2012)
Лук репчатый	<i>Allium cepa</i> L.	Луковые ( <i>Allioideae</i> )	Луковица	(Soltan et al., 2016)
Орех манчжурский	<i>Juglans mandshurica</i> MAXIM.	Ореховые ( <i>Juglandaceae</i> )	Листья	(Vieira et al., 2020)
Ротанговая пальма	<i>Calamus rotang</i> L.	Пальмовые ( <i>Arecaceae</i> )	Корневище	(Radušienė et al., 2007)

Экстракты растений получали с помощью прибора Сокслета, используя в качестве растворителей 70%-ный этанол и дистиллированную воду.

Предварительно измельченный растительный материал помещали внутрь экстрактора поверх бумажного обеззоленного фильтра, затем заливали растворитель в соотношении 1:4. Установку помещали на нагреватель и проводили экстрагирование. Полученные экстракты концентрировали досуха на роторном испарителе RE100-Pro (DLab, Пекин, Китай) при 50°C, после чего растворяли в ДМСО до 50%-ной концентрации. Полученные растворы растительных экстрактов хранили в герметичных пробирках при 4°C до дальнейшего анализа (Harborne, 1998).

*Анализ эфирных масел и экстрактов растений* проводили при помощи газового хроматографа Agilent 8890 GC System с двумя независимыми каналами, капиллярными кварцевыми колонками DB-1MS (длина - 60 м, диаметр - 0,25 мм, толщина пленки неподвижной фазы - 0,25 мкм) с применением масс-спектрометрического (МСД) и пламенно-ионизационного детекторов (ПИД) (Baharum et al., 2010). Относительное количество отдельных компонентов было рассчитано по хроматограммам и выражено в процентах площади пика по отношению к площади пика от общего объема пробы. Идентификацию компонентов проводили путем сравнения их относительного времени удержания и масс-спектров со значениями для эталонных соединений при помощи библиотеки спектров Nist (National Institute of Standards and Technology, США) (Baharum et al., 2010).

Для получения стабильной масляной эмульсии эфирные масла растворяли до 5%-ной концентрации в 2,5%-ном Tween 20 (Duchefa Farma B.V., Харлем, Нидерланды). Растворы водных и этанольных экстрактов получали путем растворения сконцентрированного осадка в ДМСО до 50%-ной концентрации. В качестве положительного контроля использовали 4%-ный раствор антибиотика гентамицина (ДальХимФарм, Хабаровск, Россия).

*Первичный скрининг антибактериальной активности эфирных масел и экстрактов растений* по отношению к пектолитическим бактериям проводили методом диффузии в агаре. Для этого 200 мкл суспензии бактерий в концентрации 10<sup>8</sup> КОЕ/мл высевали в чашку Петри с питательной средой YD (YDC без CaCO<sub>3</sub>).

Через 30 мин на поверхность засеянной среды раскладывали стерильные диски фильтровальной бумаги диаметром 5 мм, пропитанные 5 мкл тестируемого эфирного масла или экстракта. В качестве отрицательного контроля использовали диски с 5 мкл 2,5%-ного водного раствора Tween 20. Положительным контролем служили диски пропитанные 5 мкл 4%-ного раствора гентамицина. Диски с нанесенными на них растворами помещали в центр инокулированной суспензией бактерии чашки Петри с агаром и инкубировали при 28°C в течение 24 ч. Диаметр стерильных зон, образовавшихся на бактериальном газоне, измеряли электронным штангенциркулем без учета значения диаметра диска. Эфирные масла и экстракты растений, показавшие наибольшие зоны ингибирования роста бактерии, использовали в последующих опытах по определению МИК (минимальных ингибирующих концентраций) и МБК (минимальных бактерицидных концентраций). Эксперимент был проведен в трехкратной повторности, результат представлен как среднее арифметическое по варианту  $\pm$  стандартное отклонение (CLSI - M100-S26, 2016).

*Тест на определение значений МИК* проводили в стерильном 96-луночном планшете (Corning, США) с использованием метода разведения питательного бульона (Рисунок 5). В первую ячейку планшета вносили 40 мкл 5%-ного эфирного масла, после чего со 2 по 9 ячейку включительно вносили по 20 мкл жидкой среды YD и проводили в обозначенных ячейках серийные двухкратные разведения масла в бульоне. Таким образом, исследуемые концентрации эфирных масел варьировали в диапазоне от 1 до 0,004% (Nouri et al., 2021). Из последней, 9 ячейки, удаляли по 20 мкл питательной среды. Далее добавляли в каждую из 9 ячеек по 10 мкл суспензии бактерии в жидкой среде YD в концентрации  $10^6$  КОЕ/мл, по 10 мкл 0,1%-ного резазурина и по 160 мкл жидкой среды. 10-я лунка служила контролем без масла, 11-я лунка - контролем без резазурина, 12-я лунка - контролем без бактериальной суспензии. Обозначенные лунки доводили до 200 мкл с помощью жидкой среды.

Планшет инкубировали при 28°C в течение 24 ч. После истечения установленного времени оценивали окраску лунок планшета. Синий или

фиолетовый цвет свидетельствовал об отсутствии роста бактериальной культуры в лунке, розовый цвет, наоборот, указывал на рост бактерий. Значение МИК было взято при наименьшей концентрации антибактериальных агентов, ингибирующих рост бактерий (цвет оставался синим) (CLSI - M100-S26, 2016).

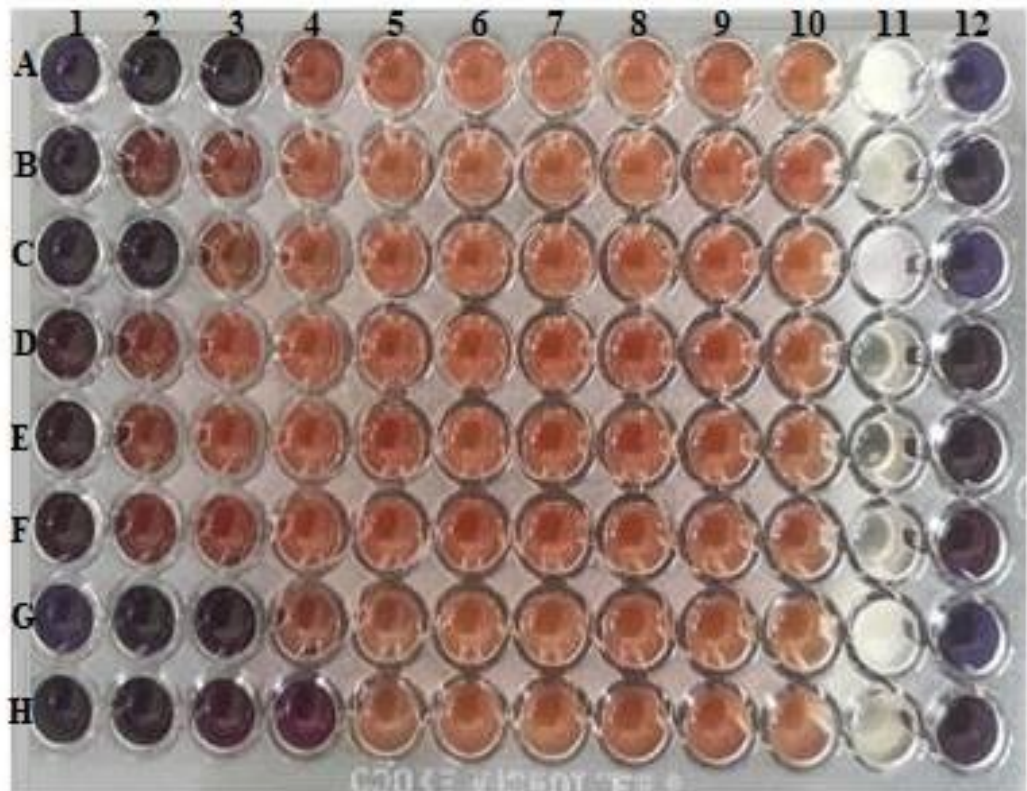


Рисунок 5. Определение значения МИК эфирных масел методом разведения питательным бульоном, с добавлением красителя резазурина (по вертикали: А-Н – эфирные масла различных растений; по горизонтали: 1-9 – концентрации эфирных масел от 1,0 до 0,004%, 10 – контроль без добавления масла, 11 – контроль без добавления резазурина, 12 – контроль без добавления суспензии бактериальных патогенов)

*МБК для эфирных масел был определен как самая низкая концентрация антибактериальных агентов, способная полностью исключить рост бактерии. Тест МБК проводили путем переноса 20 мкл бульона из лунок, окрашенных в результате вышеописанного теста в синий/фиолетовый цвет на агаризованную среду YD. Затем чашки инкубировали при 28°C в течение 24 ч, по прошествии этого времени отмечали самую низкую концентрацию масла, при которой не наблюдался видимый рост колоний после культивирования на питательной среде. Это значение принимали за МБК.*



*Исследования антибактериальной активности растительных экстрактов* были проведены по той же методике, по которой определяли МИК, но без внесения в лунки планшета раствора резазурина. Сами разведения проводили в лунках с 1 по 5 таким образом, чтобы исследуемые концентрации растительных экстрактов варьировали в диапазоне от 10 до 0,625%. 6-я лунка служила контролем без экстракта, 7-я лунка - контролем без бактериальной суспензии.

Планшет инкубировали при 28°C в течение 24 ч, после чего отбирали по 20 мкл культуры бактерий из каждой лунки планшета и высевали на агаризованную среду YD. Через 24 ч инкубации при 28°C сравнивали количество колоний в исследуемых образцах с количеством колоний в контроле. Для каждого экстракта самая низкая концентрация, которая препятствовала росту микроорганизмов, была обозначена как МИК. Концентрация экстракта, при которой после посева смеси не было роста бактериальных колоний, была обозначена как МБК.

Дополнительно *оценивали жизнеспособность бактерий в питательном бульоне с экстрактами растений* по способности к мацерации ломтиков клубней картофеля. Для этой цели ломтики картофеля инокулировали 10 мкл культуры бактерий в жидкой питательной среде из каждой лунки планшета и помещали ломтики в чашки Петри в условия влажной камеры. Герметично упакованные чашки Петри инкубировали в термостате в течение 24 ч при 28°C. По прошествии этого времени оценивали диаметр мацерации ломтика картофеля при помощи электронного штангенциркуля.

Для *оценки лечебной и профилактической активности эфирных масел и экстрактов растений против возбудителей черной ножки картофеля in vivo* были отобраны клубни картофеля средней семенной фракции сорта Ресурс. В каждом варианте использовали по 5 клубней. Клубни поверхностно стерилизовали 70%-ным раствором этанола, промывали под проточной водой и сушили в течение 12 ч при комнатной температуре.

При постановке опыта по оценке лечебной активности антибактериальных агентов клубни травмировали ножом, нанося рану глубиной 6 мм и диаметром 2 мм вдоль продольной оси клубня. Инокуляцию клубней проводили путем внесения

20 мкл бактериальной суспензии в концентрации  $10^6$  КОЕ/мл в рану. Обработку эфирными маслами и экстрактами проводили спустя 4 ч, равномерно распределяя раствор по поверхности клубня из расчета 10 мл раствора/100 г клубня, и оставляли для просушивания при комнатной температуре на 5 ч.

Для оценки профилактического действия эфирных масел и экстрактов растений клубни картофеля вначале травмировали, как описано выше, после чего обрабатывали растворами антибактериальных агентов и оставляли для просушивания. Затем приступали к инокуляции клубней в места ранений суспензией патогенных штаммов и оставляли еще на 4 ч при комнатной температуре до впитывания суспензии.

Помимо обработанных антибактериальными агентами клубней, в эксперимент включали образцы положительного контроля (клубни, инокулированные бактериальной суспензией и обработанные раствором 2,5 %-ного Tween 20 в случае с эфирными маслами, дистиллированной водой - в случае с экстрактами растений) и отрицательного контроля (клубни, обработанные дистиллированной водой, без инокуляции бактериями).

После просушивания все клубни помещали в условия влажной камеры в стерильные пластиковые боксы и инкубировали при  $25^{\circ}\text{C}$  в течение 5 дней (Najjan-Maleki et al., 2021). Через установленное время обработанные эфирными маслами/экстрактами растений и контрольные клубни разрезали вдоль продольной оси и поперек места инокуляции для измерения диаметра ( $D$ , мм) и протяженности мацерации ( $d$ , мм). Влияние эфирных масел и экстрактов оценивали по 2 показателям: глубине мацерации клубня ( $P$ ) и биологической эффективности от применения масел и экстрактов (БЭ).

Глубину мацерации рассчитывали по формуле (Larwood et al., 1984):

$$P, \text{ мм} = \frac{((D/2) + (d - 6))}{2}$$

Биологическую эффективность рассчитывали по формуле (Sameza et al., 2016):

$$\text{БЭ, \%} = \left( \frac{(D \text{ положительный контр.} - D \text{ обработка маслом/экстрактом})}{D \text{ положительный контр.}} \right) \times 100$$

*Оценка эффективности применения эфирных масел и экстрактов растений против клубневых гнилей картофеля в условиях хранения* была проведена по методике схожей с описанной выше в опытах *in vivo*, за исключением этапа искусственного травмирования клубней картофеля перед обработкой веществами растительного происхождения. Также после подготовки клубней каждая партия взвешивалась для последующей оценки мацерации тканей в конце эксперимента. Далее проводили обработку клубней путем распыления растворов масел и растительных экстрактов по поверхностям клубней в количестве, описанном ранее. После просушивания клубни равномерно поверхностно инокулировали суспензиями патогенов в концентрации  $10^6$  КОЕ/мл и в количестве 500 мкл на клубень или 2,5 мл на партию. После чего клубни просушивали и инкубировали при 20°C в стерильных пластиковых боксах в условиях влажной камеры в течение 2 недель. Через установленное время клубни извлекали из боксов, вымывали под проточной водой мацерированные ткани клубня и оставляли для испарения влаги на 12 часов при комнатной температуре. Затем клубни картофеля снова взвешивали и рассчитывали процент потери массы клубня (L), определенный в зависимости от его массы, в начале и конце эксперимента (W) и биологическую эффективность (БЭ) от применения масел и экстрактов в условиях хранения, рассчитанную в соответствии с процентом массы сгнившей ткани при положительном контроле и при обработке растительными веществами.

Потерю массы клубня рассчитывали по формуле (Abd-El-Khair et al., 2007):

$$L, \% = \left( \frac{W \text{ исх. клубня} - W \text{ клубня без гнили}}{W \text{ исх. клубня}} \right) \times 100$$

Биологическую эффективность в условиях хранения рассчитывали по формуле (Najhamed et al., 2007):

$$\text{БЭ, \%} = \left( \frac{L \text{ положительный контр.} - L \text{ обработка маслом/экстрактом}}{L \text{ положительный контр.}} \right) \times 100$$

*Оценку защитного действия эфирных масел и экстрактов растений против стеблевой гнили картофеля* проводили с использованием стеблей, отобранные с вегетирующих в теплице растений картофеля сорта Гала. Для этого стебли нарезали на сегменты длиной по 5 см, дезинфицировали 70%-ным раствором

этанола и трижды промывали под проточной водой, после чего оставляли при комнатной температуре на 1 час, а затем погружали в растворы эфирных масел и растительных экстрактов в известных концентрациях на 2 минуты. Стебли контроля выдерживали в 2,5%-ном растворе Tween 20 или дистиллированной воде, по аналогии с предыдущими экспериментами. После замачивания сегменты стеблей оставляли ещё на 1 час при комнатной температуре. Инокуляцию проводили при помощи прокалывания стерильной иглой стебля на глубину около 2 мм и нанесения на травму 20 мкл бактериальной суспензии плотностью  $10^6$  КОЕ/мл. Сегменты стеблей помещали на стерильные предметные стекла, установленные в чашки Петри и инкубировали в термостате при  $28^{\circ}\text{C}$  в течение 3 суток в условиях влажной камеры. Опыт проводили в трехкратной повторности. Степень заражения оценивали путем измерения электронным штангенциркулем протяженности мацерированной части стебля.

*Оценку защитного действия эфирных масел и растительных экстрактов по отношению к эпифитной популяции возбудителей черной ножки картофеля проводили с применением метода отпечатков листьев картофеля сорта Гала, предварительно отобранных, продезинфицированных, обработанных веществами растительного происхождения на агаризированную питательную среду YD, аналогично методике описанной в 2.4. Инокуляцию проводили через 2 часа после обработки листьев из расчета 100 мкл бактериальной суспензии патогенов плотностью  $10^6$  КОЕ/мл на лист. Площадь, занимаемую бактериальными колониями, оценивали спустя 24 часа инкубации в термостате при  $28^{\circ}\text{C}$  и выражали в процентах от общей площади листовой поверхности, используя программу LeafDoctor (Pethybridge, Nelson, 2015), как было описано ранее. Исследование проводили в трехкратной повторности.*

## **2.6. Использование бактериофагов в защите картофеля от возбудителей мягкой гнили клубней**

В работе были использованы бактериофаги и штаммы пектолитических бактерий из коллекции лаборатории молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (Evseev

et al., 2020; Lukianova et al., 2020; Shneider et al., 2020; Bugaeva et al., 2021) и коллекции лаборатории защиты растений РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева (Карлов и др., 2010), описанные ранее.

*Специфичность бактериофагов* была определена для ряда штаммов пектолитических бактерий из родов *Pectobacterium* и *Dickeya* с использованием метода двухслойного агара согласно описанному протоколу (Evseev et al., 2020) с модификациями.

По чашкам Петри разливали нижний агар, состоящий из среды YD с 1,5% содержанием агара. Затем добавляли 200 мкл ночной бактериальной культуры в концентрации  $10^8$  КОЕ/мл, предварительно выращенной на среде YD, к 5 мл верхнего агара, состоящего из среды YD с 0,75% содержанием агара. После застывания среды наносили на верхний агар капли фаговых культур в SM-буфере по 10 мкл в концентрации около  $10^8$  бляшкообразующих единиц (БОЕ)/мл и инкубировали в термостате при 28°C в течение 24 часов. По окончании инкубации просматривали чашки Петри на наличие зон лизиса бактериальных клеток. Фрагменты агара из зон лизиса помещали в 1 мл SM-буфера (10 mM Трис-HCl; pH 7,5; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl) с добавлением 250 мкл хлороформа, затем оставляли на 15 минут при комнатной температуре, периодически вортексируя смесь. Остатки бактериальных клеток осаждали путем центрифугирования при  $10000 \times g$  в течение 20 мин с последующей фильтрацией супернатантов через мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм (Millex-GV, Ирландия). Фильтраты фагов концентрировали ультрацентрифугированием при  $22000 \times g$  при 4°C в течение 40 мин с использованием ротора Beckman SW28 (Beckman Coulter, США). Полученный концентрат ресуспендировали в SM-буфере до концентрации около  $10^8$  БОЕ /мл и хранится при 4 ° C до дальнейшего использования.

*Эксперименты по оценке эффективности применения бактериофагов* по отношению к возбудителям мягкой гнили оценивали на ломтиках и клубнях картофеля сорта Гала (Zaczek-Moczydłowska et al., 2020).

Ломтики картофеля помещали в чашки Петри во влажную камеру, на каждый ломтик наносили 5 мкл суспензии бактерий в концентрации  $10^8$  КОЕ/мл и

оставляли до впитывания на 20 мин. После впитывания суспензии на то же место наносили суспензию фага в концентрации  $10^8$  БОЕ/мл в первом варианте в количестве 10 мкл, во втором - 20 мкл. Также включали положительный контроль с внесением SM-буфера.

Помимо опыта на ломтиках, был проведен опыт на половинках клубня картофеля. Клубни картофеля поверхностно стерилизовали путем замачивания в 70% этаноле в течение 10 минут, трижды промывали стерильной дистиллированной водой и сушили в стерильном ламинарном боксе. После чего клубни разрезали продольно на две части. На каждую половинку клубня наносили 50 мкл суспензии бактерий в концентрации  $10^8$  КОЕ/мл и оставляли до впитывания на 30 мин. После впитывания суспензии на то же место наносили суспензию фага в концентрации  $10^8$  БОЕ/мл в первом варианте в количестве 100 мкл, во втором - 200 мкл. Также включали положительный контроль с внесением SM-буфера. После впитывания фага в ткань клубня половинки соединяли, оборачивая каждый клубень пищевой пленкой. Клубни картофеля помещали в стерильный и герметичный пластиковый бокс в условия влажной камеры.

Ингибирующее действие фильтрата бактериофага оценивали путем измерения диаметра мацерации после инкубации при  $28^{\circ}\text{C}$  в течение 48 ч для ломтиков картофеля и в течение 72 ч – для клубней. Эксперименты проводили трехкратно.

## **2.7. Оценка устойчивости сортов картофеля к возбудителям черной ножки и мягкой гнили**

Для искусственного заражения были использованы 3 вида пектолитических бактерий выделенных из естественно зараженных растений картофеля: *Dickeya dianthicola* (штамм D9) из коллекции лаборатории защиты растений РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева (Карлов и др., 2010), *Pectobacterium atrosepticum* (F004) и *Pectobacterium brasiliense* (F126) из коллекции лаборатории молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (Lukianova, 2021).

В работе использовали семенные клубни 16 сортов картофеля, полученные с Полевой опытной станции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, урожая 2021 и 2022 гг. для экспериментов, соответственно, в 2022 и 2023 гг. Информация об их характеристиках (Таблица 3) взята из Государственного реестра селекционных достижений (<https://gossortrf.ru/>; дата обращения 4 мая 2024 года). Сорт Шарвари пирожка, не прошедший сортоиспытания на территории РФ (по состоянию на май 2024 г.), охарактеризован на основании данных, предоставленных Полевой опытной станцией РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева (<https://www.timacad.ru/about/struktura-universiteta/nauchnye-podrazdeleniia/polevaia-opytnaia-stantsiia>; дата обращения 4 мая 2024 года).

*Клубневую оценку устойчивости сортов картофеля к мягкой гнили* проводили аналогично анализу вирулентности штаммов, описанному ранее в разделе 2.2. Герметично закрытые чашки Петри с ломтиками клубней картофеля инкубировали в термостате в течение 120 ч при двух температурах – 13,5 и 22,0 °С, подобранных в предварительных экспериментах, как наиболее дифференцирующие реакцию растений разных сортов к широкому набору штаммов исследуемых патогенов. Диаметр зоны мацерации измеряли электронным штангенциркулем каждые 24 ч на протяжении 5 суток. Опыты проводили в 4-кратной повторности каждого варианта.

Для постановки опытов по *оценке устойчивости сортов картофеля на вегетирующих растениях* семенные клубни всех сортов предварительно проращивали в темноте во влажных опилках в течение 2 недель при температуре 18 °С до появления проростков. Затем, сформировавшиеся проростки укореняли в торфо-перлитовом субстрате (Велторф, Великие Луки, Россия) в пластиковых горшках объемом 0,5 л. Полученные растения выращивали в условиях стеклянной теплицы при температуре 28/22 °С (день/ночь), относительной влажности воздуха 70–75%, естественном освещении, с ежедневным поливом равными объемами воды. Через 4 недели после укоренения проростков стебли растений инокулировали аналогично методу, используемому при оценке патогенности штаммов в разделе 2.2.

Таблица 3. Список сортов картофеля, используемых в работе

Сорт	Оригинатор	Группа спелости	Устойчивость по описанию*				Регион допуска* *
			к возбу- дителю рака кар- тофеля	к золотис- той карто- фельной нематоды	к возбудителю фитофтороза		
					по ботве	по клубням	
Айл оф Джура	Cygnets PB Ltd	средне- ранняя	У	У	В	УВ	3
Альвара	Saatzucht Fritz Lange KG	средне- ранняя	У	У	УУ	УУ	2, 6
Варяг	ФГБНУ ФИЦ картофеля им. А. Г. Лорха	средне- спелая	У	В	У	У	3, 5
Винета	Europlant Pflanzenzucht GmbH	ранне- спелая	У	У	В	УВ	3, 4, 5, 6, 7, 9
Голубизна	ФГБНУ ФИЦ картофеля им. А. Г. Лорха	средне- спелая	У	В	УВ	УВ	3, 4, 5, 6
Жуковский ранний	ФГБНУ ФИЦ картофеля им. А. Г. Лорха	ранне- спелая	У	У	В	В	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12
Красавчик	ФГБНУ ФИЦ картофеля им. А. Г. Лорха	средне- ранняя	У	В	У	УВ	5
Кумач	ФГБНУ ФИЦ картофеля им. А. Г. Лорха	средне- спелая	У	У	УВ	УВ	3
Невский	ФГБНУ ФИЦ картофеля им. А. Г. Лорха	средне- ранняя	У	В	УВ	УВ	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10



Пламя	ФГБНУ ФИЦ картофеля им. А. Г. Лорха	средне- спелая	У	У	УВ	УВ	3, 5
Ред Скарлетт	HZPC Holland B.V.	ранне- спелая	У	У	УВ	УВ	2, 3, 4, 5, 7, 8, 12
Ривьера	Agrico U.A.	ранне- спелая	У	У	В	В	3, 5, 6, 8
Розара	Saka Pflanzenzucht GBR	ранне- спелая	У	У	В	УВ	2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12
Снегирь	ФГБНУ ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха; ФГБУ ИОГЕН РАН им. Н. И. Вавилова	ранне- спелая	У	В	УВ	УУ	1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 12
Удача	ФГБНУ ФИЦ картофеля им. А.Г. Лорха	ранне- спелая	У	В	УВ	УУ	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12
Шарвари пирошка	Венгрия, по данным Госсорт- комиссии проходит сортоиспыта ния в РФ	ранне- спелая	У	У	УУ	УУ	-

*Примечание:* \*У – устойчив, УУ – умеренно-устойчив, УВ – умеренно-восприимчив, В – восприимчив;

\*\*1 – Северный, 2 – Северо-Западный, 3 – Центральный, 4 – Волго-Вятский, 5 – Центрально-Черноземный, 6 – СевероКавказский, 7 – Средневожский, 8 – Нижневожский, 9 – Уральский, 10 – Западно-Сибирский, 11 – Восточно-Сибирский, 12 – Дальневосточный.

После заражения растения выдерживали трое суток под укрывным материалом спанбонд СУФ-60 («Эксперт», Волоколамск, Россия) для создания повышенной влажности. Учеты проводили 8 раз с 5-го по 31-й день после инокуляции. Степень поражения растений выражали в баллах от 0 до 7, где 0

баллов – отсутствие симптомов заболевания, 7 – полное увядание растения (Рисунок 6).



Рисунок 6. Динамика симптомов черной ножки картофеля после искусственного заражения растений (1 - пожелтение менее 50% листьев, 1 балл поражения; 2 – пожелтение более 50% листьев, 2 балла поражения; 3 – скручивание листьев, 3 балла поражения; 4 – почернение менее 2 см стебля, 4 балла поражения; 5 – почернение более 2 см стебля, 5 баллов поражения; 6 – гниль стебля, частичное увядание, 6 баллов поражения; 7 – полное увядание, 7 баллов; 8 – отсутствие симптомов заболевания, 0 баллов поражения)

## 2.8. Статистический анализ

Статистический анализ полученных данных проводили с применением методов оценки линейной и ранговой корреляции, факторного и дисперсионного многофакторного анализа (MANOVA) (Kim, Mueller, 1978) с использованием программы Statistica 12.0 (StatSoft, TIBCO, США). Средние значения сравнивали по критерию Дункана (Duncan, 1955). Для описания интенсивности роста популяции патогенов использовали метод расчета площади под кривой роста развития болезни (Schneider, 1976) и расчет второй производной, адаптированный из работ Лелекова и др. (2016) и Sánchez et al. (2023). Графики, представленные в работе, были построены в программе GraphPad Prism v. 9.2.0 (GraphPad Software Inc., США).

## ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Разнообразие возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля

Исследования генетической изменчивости фитопатогенных бактерий важны для выяснения возможных взаимосвязей между отдельными популяциями патогена и регионом их первоначального обнаружения (Scortichini, 2005), что имеет фундаментальное значение для разработки соответствующих стратегий борьбы с болезнями и является необходимым условием для контроля заболевания (Игнатов и др., 2021).

В связи с вышесказанным в данном разделе представлена генетическая характеристика возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля, обнаруженных в различных регионах РФ в 2020–2021 гг., а также проведено сравнение методов ПЦР-диагностики данных патогенов.

В ходе выделения штаммов пектолитических бактерий было проанализировано 18 образцов (от 15 до 100 клубней в каждом образце) картофеля из 11 регионов РФ. По итогам исследования было отобрано около 400 изолятов, разжижающих пектат на полуселективной среде CVP-SL (Рисунок 7) и проявляющих пектолитическую активность на ломтиках картофеля. По итогам дальнейшего исследования фенотипических и биохимических признаков были отобраны около 60 изолятов, предварительно отнесенных к *Pectobacterium/Dickeya* sp. При культивировании в течение 24 часов при температуре 28°C на среде YD изоляты представляли собой блестящие, округлые колонии, кремового цвета. Данные изоляты были отмечены как грамотрицательные при взаимодействии с 3%-м раствором КОН и не проявляли флуоресценции на среде King's B.

Дальнейшая молекулярно-генетическая идентификация бактериальной коллекции была проведена с применением ПЦР-диагностики с родоспецифичными праймерами на *Dickeya* и *Pectobacterium* sp. (ADE1/ADE2 и Pect1F/Pect2R), коммерческими наборами для дифференциальной диагностики «ФИТОСКРИН» (Синтол, Москва, Россия), а также праймерами gir1/gir2 на ген

«домашнего хозяйства» *gyrB* с последующим секвенированием и сравнением полученных последовательностей в базе данных BLAST (Таблица 4).

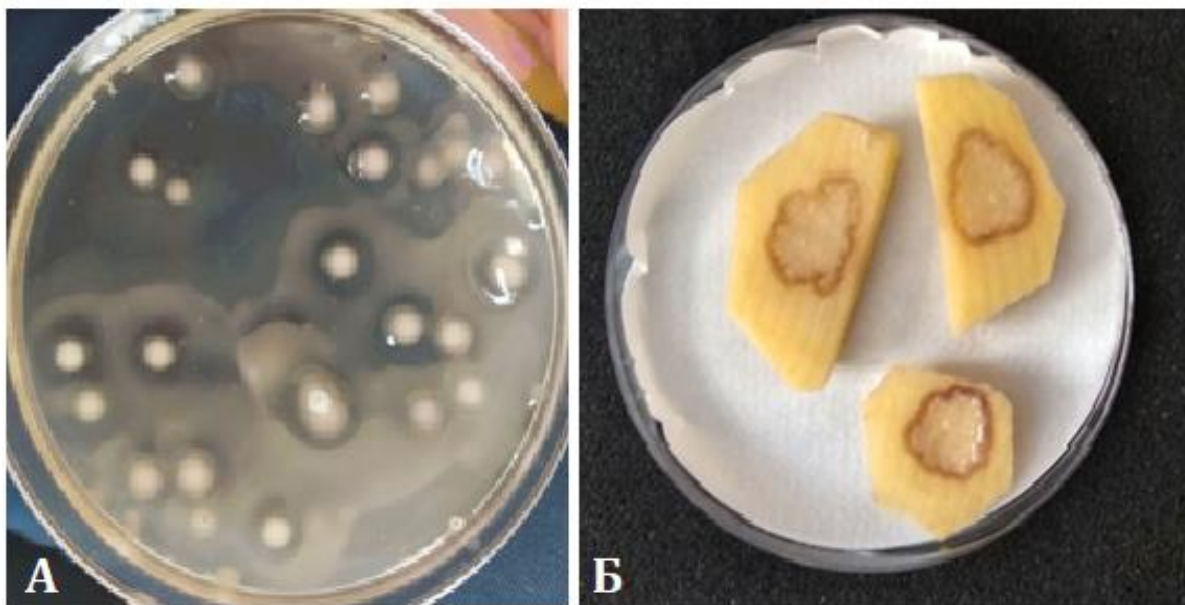


Рисунок 7. Проявление пектолитической активности изолятов *Pectobacterium* sp. (А – бактериальные колонии на среде CVP-SL; Б – результат пектолитической активности при инокуляции ломтиков картофеля суспензией патогена)

По результатам проведенного исследования было определено, что все штаммы коллекции относятся к роду *Pectobacterium*, при этом на всех этапах исследования ни один штамм не был отнесен к роду *Dickeya*, что соответствует ранее обнаруженной смене доминирующих видов в популяции возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля (Баранник и др., 2018; Voronina et al., 2019a).

Также примечательно, что амплификация с праймерами Pect1F/Pect2R не всегда позволяла обнаружить продукт реакции при постановке классической ПЦР с детекцией в агарозном геле, в то время как постановка ПЦР-РВ с применением диагностической системы «ФИТОСКРИН» позволяла проводить качественное определение до рода, однако, достоверная видовая идентификация была возможна только по итогам секвенирования по гену *gyrB*. Расхождения в видовой принадлежности можно объяснить большим видовым разнообразием в роде *Pectobacterium*, что необходимо учитывать при разработке праймеров и тест-систем. Например, виды *P. punjabense* и *P. wasabiae* филогенетически являются

близкородственными, в то время как *P. parmentieri* совсем недавно был таксономически отделен от *P. wasabiae* (Khayl et al., 2016), что обуславливает вероятность их неверной идентификации при поточной диагностике с коммерческими наборами (Таблица 4).

Таблица 4. 56 оригинальных штаммов *Pectobacterium* sp., выделенных в данной работе

Штамм	Источник выделения (регион, сорт)	Год выделения	Реакция с родоспецифичными праймерами на <i>Dickeya</i> / <i>Pectobacterium</i> sp.	Результат диагностики «ФИТО-СКРИН»	Результат, согласно данным секвенирования по гену <i>gyrB</i>
В-3	Брянская область	2020	- / +	<i>P. carotovorum</i>	
В-9			- / -	<i>P. sp.</i>	<i>P. versatile</i>
В-22			- / +	<i>P. carotovorum</i>	
ККТ-3	Красноярский край, Тимошевский район	2021	- / +	<i>P. versatile</i>	
ККТ-8				<i>P. carotovorum</i>	
ККТ-17					
ККТ-20					
КА-1	Кемеровская область, Кемеровский район, сорт Королева Анна	2021	- / +	<i>P. sp.</i>	<i>P. punjabense</i>
КА-3				<i>P. brasiliense</i>	
КА-4				<i>P. wasabiae</i>	<i>P. punjabense</i>
КА-5				<i>P. wasabiae</i>	- *
КА-10			- / -	<i>P. sp.</i>	<i>P. versatile</i>
КА-13				<i>P. sp.</i>	<i>P. punjabense</i>
КА-14				<i>P. wasabiae</i>	<i>P. punjabense</i>
КА-17				<i>P. sp.</i>	<i>P. punjabense</i>
КА-21			- / +	<i>P. brasiliense</i>	
КА-22				<i>P. sp.</i>	<i>P. punjabense</i>
КА-23				<i>P. sp.</i>	<i>P. brasiliense</i>
КІВ-6			Кемеровская область, Яшкинский район, сорт Кибиц	2021	- / -
КІВ-9	<i>P. sp.</i>	<i>P. versatile</i>			
КІВ-12	<i>P. carotovorum</i>	<i>P. versatile</i>			
LKE-2	Кемеровская область, Яшкинский район, сорт Леди Клер	2021	- / +	<i>P. brasiliense</i>	
LKE-4					
LKE-6					
LKE-9					
LKE-22					

LKRS-4	Кемеровская область, Яшкинский район, сорт Леди Клер	2021	- / +	<i>P. carotovorum</i>		
LKRS-5						
LKRS-7						
LKRS-8						
SATUR N	Московская область, сорт Сатурна	2021	- / +	<i>P. sp.</i>	-*	
SAT -6				<i>P. odoriferum</i>	<i>P. versatile</i>	
SAT -8				<i>P. sp.</i>	<i>P. punjabense</i>	
SAT -9				<i>P. odoriferum</i>	<i>P. versatile</i>	
P-2	Московская область	2021	- / -	<i>P. sp.</i>	<i>P. versatile</i>	
P-4				<i>P. sp.</i>	<i>P. versatile</i>	
P-9				<i>P. sp.</i>	<i>P. versatile</i>	
OTG-4	Омская область, Таврический район, сорт Гала	2021	- / -	<i>P. sp.</i>	<i>P. polaris</i>	
OTG-9				<i>P. sp.</i>	<i>P. brasiliense</i>	
OTG-13				<i>P. sp.</i>	<i>P. polaris</i>	
OTG-16				<i>P. odoriferum</i>	<i>P. odoriferum/ P. carotovorum</i>	
OOG-2	Омская область, Омский район, сорт Гала	2021	- / -	<i>P. sp.</i>	<i>P. versatile</i>	
OOG-3				<i>P. sp.</i>	<i>P. versatile</i>	
OOG-18				<i>P. sp.</i>	<i>P. parmentieri</i>	
S-5	Ставропольский край	2021	- / -	<i>P. sp.</i>	<i>P. versatile</i>	
S-7				- / +	<i>P. brasiliense</i>	
S-14						
T-3	Тверская область, сорт Импала	2020	- / -	<i>P. sp.</i>	<i>P. versatile</i>	
T-8						
T-10						
GAEL-1	Томская область, Томский район, сорт Гала	2020	- / +	<i>P. odoriferum</i>	<i>P. odoriferum/ P. carotovorum</i>	
GAEL - 2				<i>P. carotovorum</i>		
GAEL - 9				<i>P. odoriferum</i>	<i>P. odoriferum/ P. carotovorum</i>	
TU-5	Тульская область, сорт Гала	2020	- / +	<i>P. carotovorum</i>	<i>P. versatile</i>	
TU-8				<i>P. carotovorum</i>	<i>P. versatile</i>	
TU-20				<i>P. carotovorum</i>	<i>P. versatile</i>	

Примечание: -\* при дальнейших исследованиях были идентифицированы как *P. punjabense* по гену 16S рРНК согласно разделу 3.3.

На основании анализа коллекции было определено присутствие возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля, как минимум в 9 субъектах РФ, при этом штаммы возбудителей *P. punjabense*, обнаруженные на территории Московской и Кемеровской областей, впервые были зафиксированы на территории Российской Федерации в ходе данной работы (Vasilyeva et al., 2024). Примечательно также обнаружение на территории Омской области штаммов ранее уже встречавшихся в России видов *P. polaris* и *P. parmentieri* (Voronina et al., 2021; Ngoc Ha et al., 2019). Основными же видами возбудителей черной ножки в РФ остаются представители видов *P. versatile* и *P. carotovorum* (Рисунок 8), что подтверждается многочисленными сообщениями об их обнаружении на картофеле в течение последних 10 лет (Voronina et al., 2019a; Ngoc Ha et al., 2019; Shirshikov et al., 2018).



Рисунок 8. Географическое распространение штаммов возбудителей черной ножки картофеля в составе исследуемой коллекции (на основании данных секвенирования по гену *gvrB*, представленных в Таблице 4)

Обработка результатов сэнгеровского секвенирования позволила получить частичные последовательности гена *gyrB*, часто применяющиеся для анализа филогенетической позиции представителей рода *Pectobacterium* (Sawada et al., 2024) для 54 изолятов (Рисунок 9).

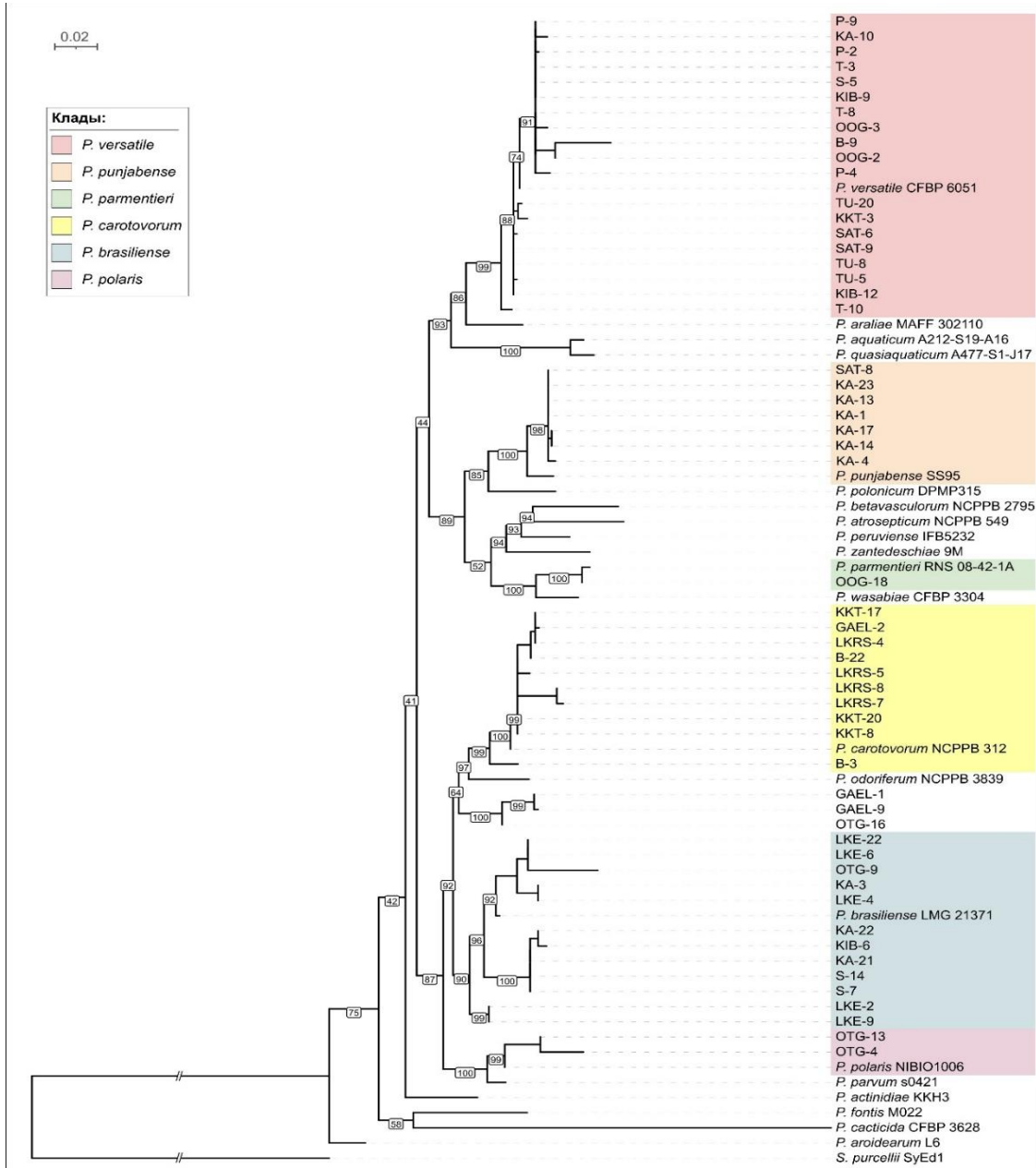


Рисунок 9. Филогенетическое дерево, построенное с помощью метода максимального правдоподобия на основе сравнения результатов секвенирования гена *gyrB* и известных последовательностей гена *gyrB* типовых штаммов *Pectobacterium*. Последовательность *gyrB Symbiopectobacterium purcellii* SyEd1<sup>T</sup> использовалась в качестве внешней группы. Для построения использовали IQ-TREE 2.2.5 с автоматическим подбором лучшей модели (TIM2+F+I+G4) и бутстрэп-анализом (1000 повторностей). Значения бутстрэпа указаны у соответствующих веток, шкала показывает количество замен на сайт. Клады, соответствующие разным видам, выделены цветами, указанными в легенде.



Филогенетический анализ с использованием последовательностей гена *gyrB* типовых штаммов и 54 последовательностей, полученных в результате секвенирования, показал, что 51 изолят можно уверенно отнести к представителям 6 видов *Pectobacterium*, включая *P. brasiliense*, *P. carotovorum*, *P. parmentieri*, *P. polaris*, *P. punjabense* и *P. versatile*. Три изолята (GAEL-1, GAEL-9 и OTG-16) родственны *P. odoriferum*, образуя отдельную кладу, сестринскую по отношению к большой кладе, включающей *P. carotovorum* и *P. odoriferum*. Самое большое количество изолятов относится к виду *P. versatile* (19 изолятов). Также широко представлен *P. brasiliense* (12 изолятов), *P. carotovorum* (10 изолятов) и *P. punjabense* (7 изолятов). *P. polaris* представлен двумя изолятами и *P. parmentieri* – одним.

### **3.2. Характеристика возбудителей черной ножки картофеля из рода *Pectobacterium***

Род *Pectobacterium* чрезвычайно обширен и насчитывает на данный момент более 17 видов. При этом своевременное обнаружение и исследование распространения новых видов *Pectobacterium* патогенных для сельскохозяйственных растений имеют большое значение для мониторинга болезней, совершенствования молекулярно-генетических методов диагностики патогенов, и предотвращения возможных эпифитотии в регионах возделывания картофеля. Однако, некоторые недавно описанные виды, такие как *Pectobacterium punjabense* остаются недостаточно изученными (Cigna et al., 2021; Sarfraz et al., 2018), в связи с чем одной из наших задач являлась характеристика штаммов *Pectobacterium punjabense*, патогенных для картофеля и обнаруженных на территории РФ, а также сравнение их биологических свойств с более распространенными возбудителями черной ножки картофеля.

В ходе работы из клубней картофеля с симптомами мягкой гнили среди штаммов, принадлежавших к ранее описанным в РФ видам, были выделены и отобраны для дальнейших исследований 3 штамма бактериальных фитопатогенов, предположительно относящихся к новой группе *Pectobacterium* sp. (КА-4, КА-5 и SATURN), а также 4 штамма наиболее распространенных в России видов

*Pectobacterium* (*P. versatile* (F002), *P. atrosepticum* (F048), *P. brasiliense* (F126), *P. parmentieri* (F148)) из коллекции лаборатории молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН.

Биохимические особенности штаммов оценивали при помощи тест-системы API 20E, представляющей собой стрип с микролунками, содержащими дегидрированные субстраты, при добавлении бактериальной суспензии к которым по изменению цвета лунок можно судить о положительном или отрицательном прохождении той или иной реакции (Рисунок 10).

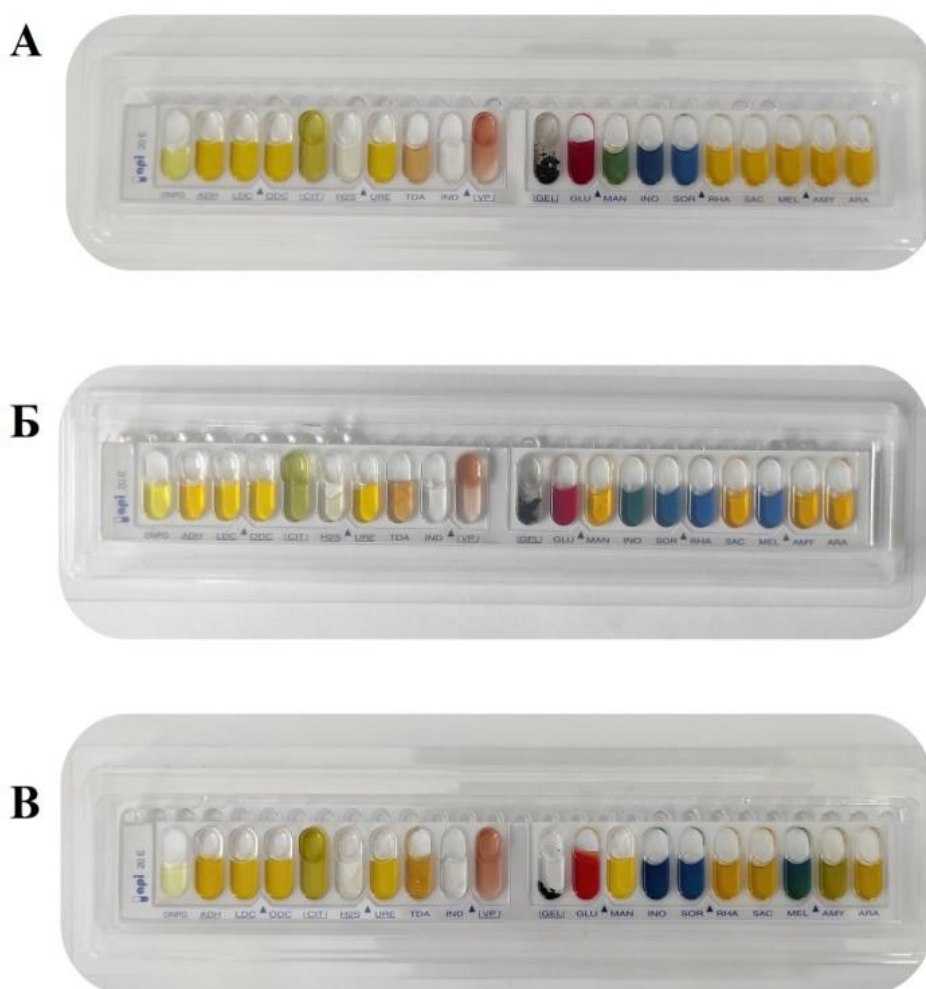


Рисунок 10. Реакции штаммов, возбудителей черной ножки картофеля в тест-системе API 20E (А - *P. punjabense* SATURN; Б - *P. versatile* F002; В - *P. parmentieri* F148)

Все изученные штаммы были положительными по галактоидазе и отрицательными по уреазе, индолу, декарбоксилазе и не продуцировали сероводород, что в целом согласуется с показателями характерными для *Pectobacterium* (Babinska et al., 2021; Ossowska et al., 2022). Штаммы дифференцировались по активности к триптофандеаминазе, гидролизу желатина и способности к образованию кислоты из мелибиозы. В то же время все штаммы демонстрировали способность окислять глюкозу, сахарозу и амигдалин, а также восстанавливать нитрат (Таблица 5).

Таблица 5. Результаты анализа API 20E с панелью видов *Pectobacterium*

Химическая реакция	<i>P. punjabense</i> SATURN	<i>P. punjabense</i> KA-4	<i>P. punjabense</i> KA-5	<i>P. versatile</i> F002	<i>P. atrosep- ticum</i> F048	<i>P. brasi- liense</i> F126	<i>P. parmen- tieri</i> F148
В - галактоидаза	+	+	+	+	+	+	+
Аргининди- гидралаза	-	-	-	-	-	-	-
Лизиндекар- боксилаза	-	-	-	-	-	-	-
Орнитиндекар- боксилаза	-	-	-	-	-	-	-
Утилизация цитрата	-	-	-	-	-	-	-
Образование сероводорода	-	-	-	-	-	-	-
Уреазы	-	-	-	-	-	-	-
Триптофан- деаминаза	-	-	-	-	+	-	+
Образование индола	-	-	-	-	-	-	-
Образование ацетона	+	+	+	+	+	+	+
Гидролиз желатина	+	-	-	+	-	+	-
Образование к-ты из глюкозы	+	+	+	+	+	+	+
Образование к-ты из маннитола	-	-	-	+	+	+	+
Образование к-ты из инозитола	-	-	-	-	-	-	-
Образование к-ты из сорбитола	-	-	-	-	-	-	-

Образование к-ты из рамнозы	+	+	+	-	+	+	+
Образование к-ты из сахарозы	+	+	+	+	+	+	+
Образование к-ты из мелибиоза	+	+	+	-	-	+	-
Образование к-ты из амигдалина	+	+	+	+	+	+	+
Образование к-ты из арабинозы	+	+	+	+	-	+	+
Восстановление нитрата до нитрита	+	+	+	+	+	+	+

Несмотря на общее сходство биохимических профилей различных видов *Pectobacterium*, все три штамма *P. punjabense* отличались от других видов по неспособности к окислению маннитола (Рисунок 10), что противоречит некоторым исследованиям данного вида (Loc et al., 2022). В то же время, в отличие от других видов *Pectobacterium*, у штаммов *P. punjabense* не была отмечена способность к окислению мелибиозы, что довольно противоречиво, поскольку не соответствует данным, описывающим типовой штамм *P. punjabense* SS95 (Sarfraz и др., 2018), но согласуется с исследованиями Cigna et al. (2021). Ввиду вышеописанного использование биохимических тестов не может быть пригодно для дифференциации штаммов *P. punjabense* от других видов *Pectobacterium*, однако, представляет научный интерес для характеристики и сравнительной оценки различных штаммов внутри вида *P. punjabense*.

При анализе *вирулентности* пектолитических бактерий на ломтиках картофеля все штаммы проявляли пектолитическую активность спустя 24 часа после инокуляции. На ломтиках отрицательного контроля обработанных стерильной водой мацерация не развивалась (Рисунок 11Б).

Статистический анализ средних показателей показал, что разница в повреждениях, вызываемых большинством штаммов, была незначительной. Однако штамм F126 из *P. brasiliense* показал самый высокий средний диаметр некроза - 19,3 мм (Рисунок 11А). У остальных штаммов диаметр мацерации варьировал от 16,5 до 17,5 мм.

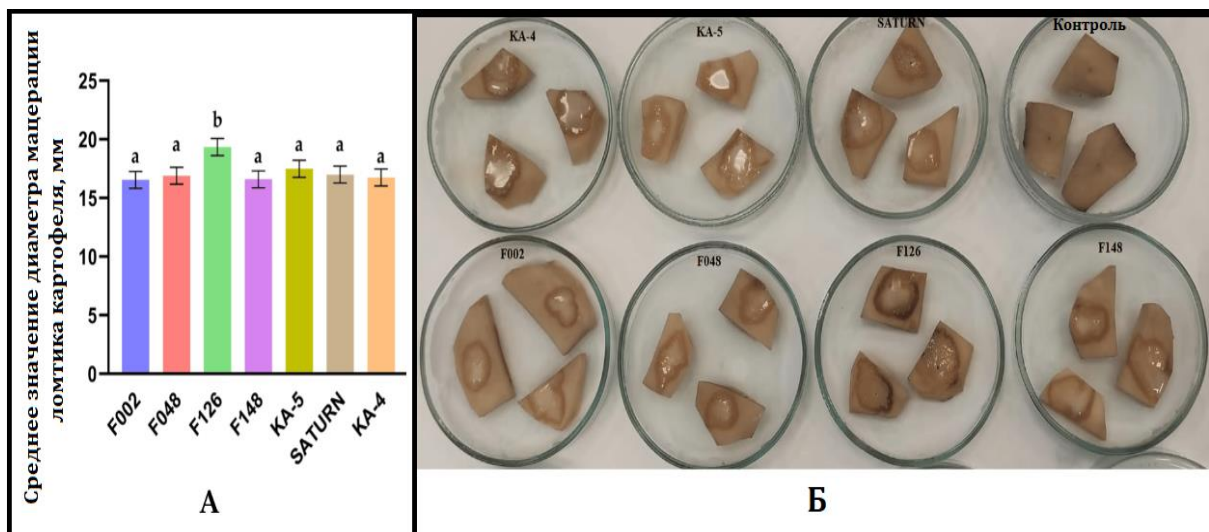


Рисунок 11. Оценка средних диаметров мацерации на ломтиках картофеля, инокулированных возбудителями черной ножки и мягкой гнили картофеля, (А – средние значения диаметров мацерации ломтиков картофеля, мм. Разные буквы над столбцами указывают на группы со статистически значимыми различиями (критерий Дункана,  $P = 0,05$ ); Б - симптомы мягкой гнили на ломтиках картофеля, наблюдаемые через 24 ч после инокуляции штаммами *Pectobacterium* и инкубации в анаэробных условиях при 28 °С)

Рост и размножение бактерий можно считать важным фактором вирулентности пектобактерий, который в значительной степени зависит от температуры и плотности популяции (Du Raan et al., 2016). Основными целями этого исследования была оценка влияния трех переменных: температуры (16, 20, 24 и 28 °С), генотипа бактерий (семь штаммов четырех разных видов) и времени после первоначальной инокуляции (24 и 48 ч), на диаметр ломтиков картофеля при мацерации в контролируемых условиях. Результаты расчета динамики мацерации на инокулированных ломтиках картофеля показывают, что в среднем за 48 ч инкубации скорость роста диаметра некроза составляла 0,81 мм/ч. Одновременно с этим наибольшее расширение зоны мацерации наблюдалось в течение первых 24 часов инкубации при 28 °С. Однако, последующая инкубация ломтиков картофеля через 24–48 ч при этой температуре характеризовалась наименьшей скоростью увеличения некроза (0,12 мм/ч). Минимальная скорость развития некроза в течение 48 часов инкубации была зарегистрирована, как и ожидалось, при температуре 16 °С и составила 0,77 мм/ч. При дальнейшем изучении этого варианта инкубации

было обнаружено, что в течение инкубационного периода от 24 до 48 ч при этой температуре наблюдался максимальный рост некроза по сравнению с другими температурами (0,26 мм/ч). Причина такой динамики, зависящей от температуры, может заключаться в развитии реакции растения по отношению к патогену или в накоплении бактериальных метаболитов, подавляющих рост патогенов.

Рисунок 12А иллюстрирует, что для штаммов *P. punjabense* в большей степени, чем для штаммов F002 *P. versatile* и F048 *P. atrosepticum*, но в меньшей степени, чем для штамма F126 *P. brasiliense*, характерно увеличение агрессивности при повышении температуры в первые 24 часа инкубации. Таким образом, диаметры некроза ломтиков картофеля при инокуляции штаммами *P. punjabense* при последующей инкубации при 28°C варьируют в пределах 17,1–17,6 мм, что на 25,7–29,4% больше, чем при инокуляции штаммами F002 и F048. В то время как измерения, проведенные через 24 ч после инокуляции при 16°C, показали расхождение в 5,7–23,5% в пользу штаммов *P. versatile* и *P. atrosepticum*.

При рассмотрении результатов инкубации зараженных ломтиков картофеля по истечению 48 часов (Рисунок 12Б) максимальные диаметры мацерации отмечаются при инкубации ломтиков при 20°C для штаммов КА-4 и SATURN и при 28°C для штамма КА-5 и составляют 20,5–21,0 и 19,9 мм, соответственно. Что касается штаммов F002 и F048, для них максимальные диаметры некроза за 48 часов инкубации отмечаются при температуре 20°C для штамма *P. atrosepticum* и при 28°C для штамма *P. versatile* и составляют 21,0 и 20,4 мм, соответственно.

При проверке *патогенности* исследуемых штаммов на вегетирующих растениях типичные симптомы черной ножки в виде почернения и водянистой гнили стебля в месте инокуляции суспензией патогенов проявлялись уже через 72 часа после заражения (Рисунок 13). У растений отрицательного контроля, обработанных стерильной водой, симптомы заболевания не развивались.

Реизолированные из инфицированной ткани стебля картофеля штаммы бактерий показали биохимические и морфологические характеристики, родственные *Pectobacterium*, что соответствует постулатам Коха.

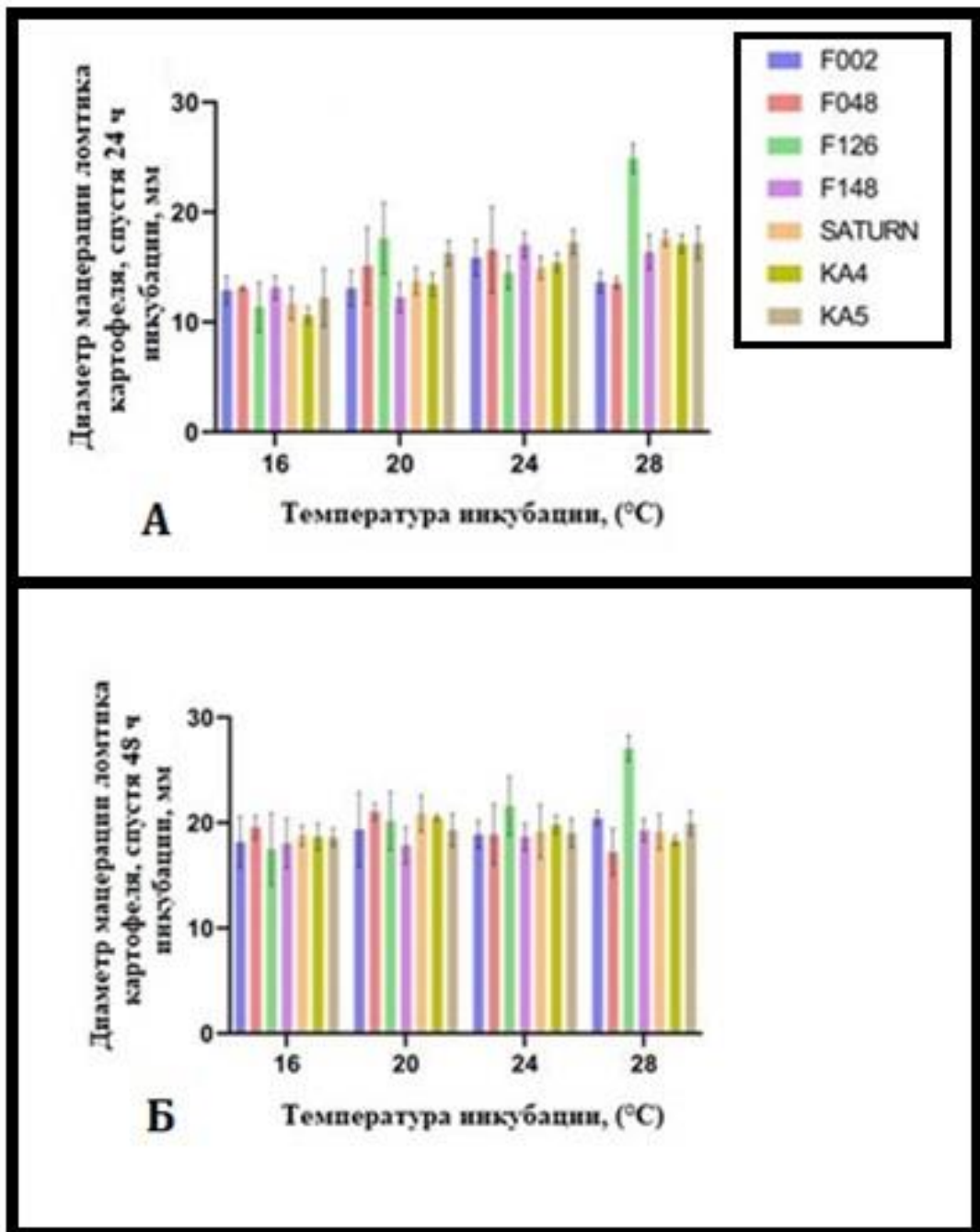


Рисунок 12. Диаметры зон мацерации на ломтиках картофеля, инокулированных штаммами *Pectobacterium* при различных температурах инкубации, мм. Значения в столбцах представляют средние значения трех независимых тестов, а столбики ошибок представляют стандартные отклонения (А - результаты инкубации ломтиков в течение 24 часов; Б - результаты инкубации ломтиков в течение 48 часов)



Рисунок 13. Симптомы черной ножки, наблюдаемые на стеблях растений картофеля через 72 часа после инокуляции штаммами *Pectobacterium*

Для оценки интенсивности накопления биомассы патогенов при различных температурах инкубации была проведена их культивация в биореакторе с жидкой питательной средой при температурах от 18 до 33°C в течение 30 часов. По итогам культивирования были получены данные изменения оптической плотности среды, которые были использованы для расчета площади под кривой роста плотности биомассы (ПКРБ) (Рисунок 14) и точки входа в фазу экспоненциального роста, определенной с использованием локального максимума второй производной кривой роста плотности бактерий (Рисунок 15). В контрольных колбах, в которые не вносили суспензии бактерий перед культивированием, оптическая плотность оставалась неизменной на протяжении всех экспериментов и составляла  $O.P._{600}=0.0$ .



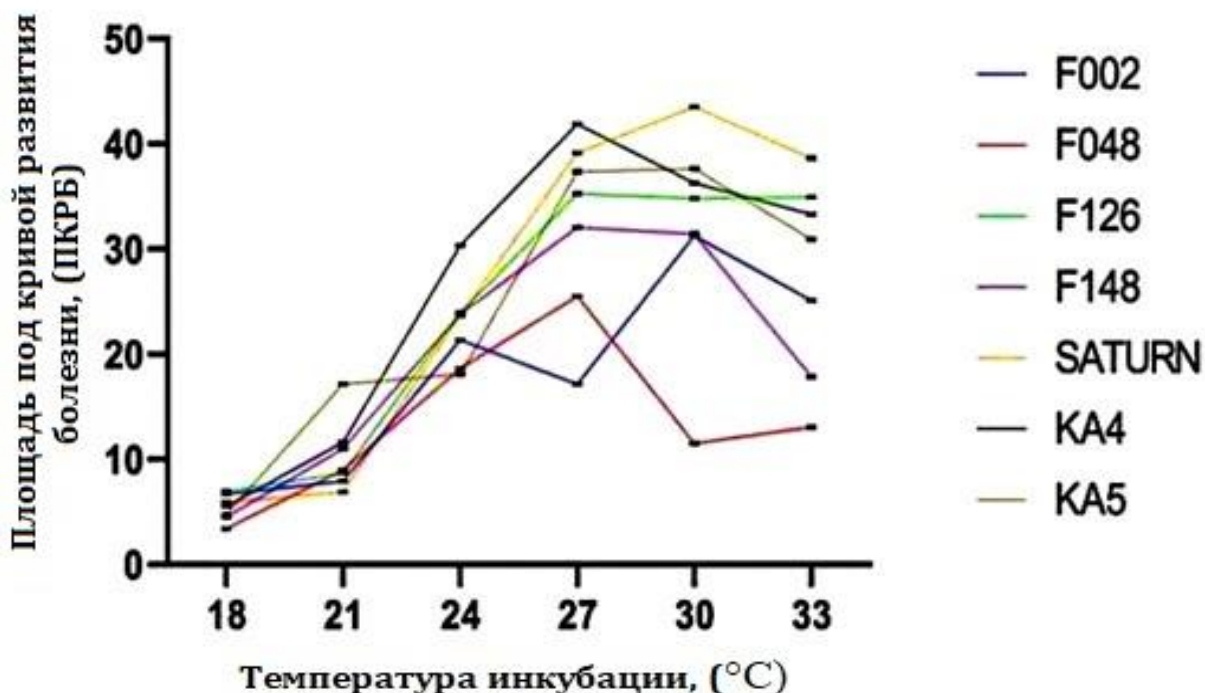


Рисунок 14. График площади под кривой развития болезни (ПКРБ), описывающий динамику роста популяции штаммов *Pectobacterium* при различных температурах, согласно изменениям оптической плотности в жидкой питательной среде (здесь и для Рисунка 15 - кривые графика представляют собой средние значения трех независимых испытаний, а столбцы ошибок представляют собой стандартное отклонение)

Согласно Рисунку 14, наибольшее значение оптимальной температуры ПКРБ среди всех штаммов при всех анализируемых температурах отмечается на штамме SATURN по итогам культивирования при 30°C и составляет 43,5 у. У двух других штаммов *P. punjabense* также значения ПКРБ превышают оптимумы характерные для других штаммов несмотря на то, что температуры 27-30°C оптимальны для всех исследуемых штаммов. Так, пик для штамма КА-4 отмечается на уровне 41,9 у при температуре культивирования 27°C, а для штамма КА-5 – на уровне 37,6 у при 30°C. Однако, исключение составляет *P. brasiliense* F126, у которого начиная с 27°C наблюдается выход на плато и таким образом при культивировании при 33°C его оптимум превышает значения ПКРБ для КА-4 и КА-5 на 4,86 и 12,9%, соответственно. Также примечательно, что для штамма *P. atrosepticum* F002 отмечается два оптимума – при 24 и 30°C. Следует отметить и поведение штамма

*P. atrosepticum* F048, у которого единственного наблюдается увеличение значения ПКРБ на 13,36% при переходе от 30 к 33°C.

При определении точки входа в экспоненциальную фазу роста биомассы патогена была использована вторая производная (Рисунок 15), позволяющая оценить скорость нарастания инфекции в пределах определенного временного периода, соответствующего наиболее интенсивному накоплению биомассы патогенов, т. е. определенному по двум точкам локальных минимальных значений второй производной, соответствующих максимальной вогнутости производной и, следовательно, максимальной выпуклости кривой роста плотности бактерий (Sánchez et al., 2023). Такой подход наиболее адекватен, поскольку позволяет определить экспоненциальную фазу в пределах наибольшей скорости роста, а не по всему графику роста, для которого характерны интенсивное нарастание инфекции в начале и замедление роста в конце экспоненциальной фазы (Лелеков и др., 2016).

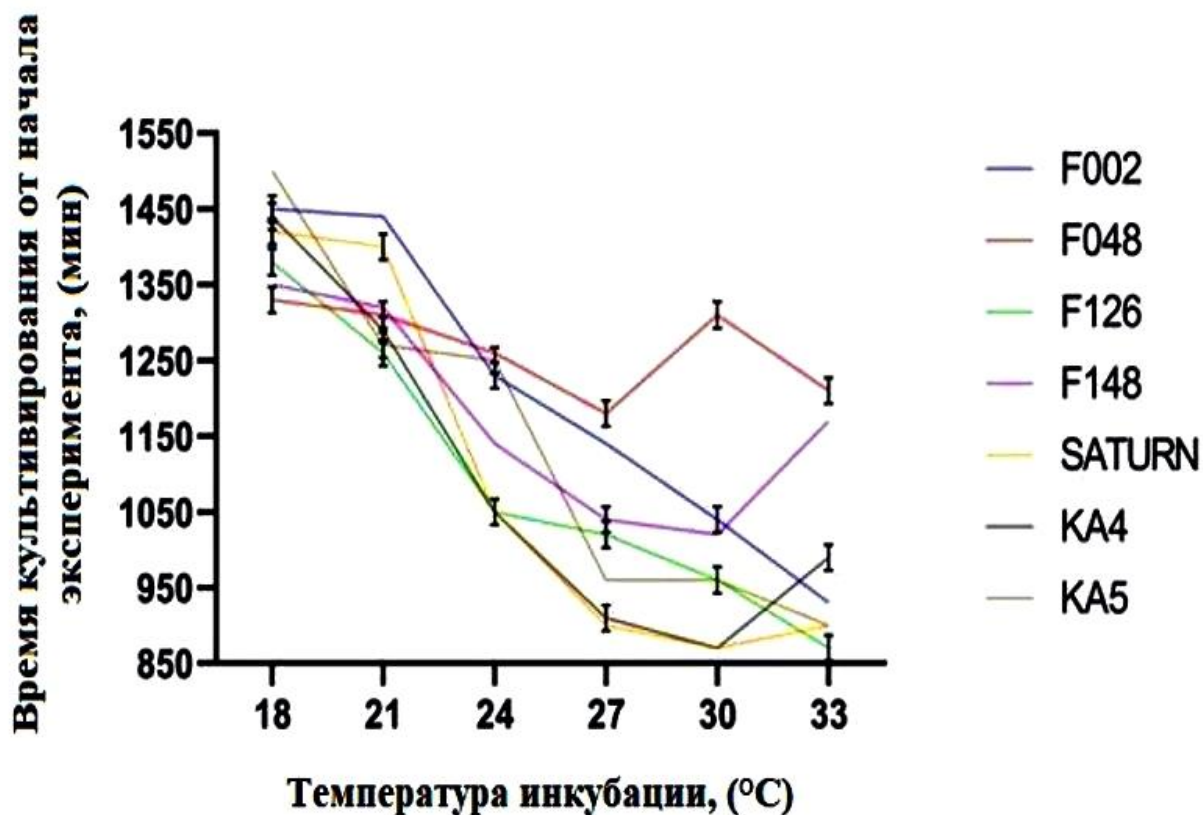


Рисунок 15. График выхода биомассы патогенов на фазу экспоненциального роста в минутах от начала эксперимента

Анализируя график выхода биомассы патогенов на экспоненциальную фазу роста (Рисунок 15), можно отметить, что максимальная среди всех вариантов скорость роста биомассы патогена наблюдается по прошествии 14,5 часов с начала эксперимента при культивировании штамма *P. brasiliense* F126 при 33°C и штаммов *P. punjabense* SATURN и КА-4 при 30°C. Штамм КА-5 среди всех температур инкубации быстрее всего набирает биомассу при 33°C и выходит на экспоненциальную фазу спустя 15 часов от начала культивирования. Минимальная скорость выхода на экспоненциальный рост в диапазоне с 24 до 33°C наблюдается при культивировании штамма *P. atrosepticum* F048, при этом его минимальное значение наблюдается при 30°C и составляет 1310 минут с начала эксперимента.

Таким образом, было определено, что оптимальный температурный диапазон при оценке ПКРБ у всех штаммов был одинаковым и находился в пределах 27–30°C. Однако максимальные значения, описывающие динамику роста популяции, наблюдались для трех штаммов *P. punjabense*, при этом самое высокое значение наблюдалось для штамма SATURN. Одновременно скорость роста инфекции для штаммов *P. punjabense* была наибольшей при инкубации в течение 14,5 ч при 30 °C для штаммов SATURN и КА-4, и 15 ч при 33°C для штамма КА-5. Также можно отметить, что штамм *P. brasiliense* наиболее сходен со штаммами *P. punjabense*, как с точки зрения достижения экспоненциальной фазы роста при 33°C, так и с точки зрения значений ПКРБ, превышающих значения штаммов КА-4 и КА-5 при культивировании при 33°C. Исходя из вышесказанного, можно предположить, что *P. punjabense* может быть более приспособлен к высоким температурам, чем *P. versatile*, *P. atrosepticum* и *P. parmentieri*, но менее или столь же активен, как *P. brasiliense*. Это вызывает серьезную озабоченность в свете недавних климатических изменений, вызванных глобальным потеплением с ежегодным повышением среднегодовой температуры.

### **3.3. Разработка системы ПЦР-РВ для диагностики возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля *Pectobacterium punjabense***

Недавнее развитие технологий секвенирования нового поколения значительно улучшило знания в области геномики бактерий, в том числе рода

*Pectobacterium*. Стало очевидным, что этот род очень разнообразен, а NGS-анализ также привел к улучшению идентификации штаммов в коллекциях культур и описанию нескольких новых видов *Pectobacterium*.

Редкая встречаемость *P. punjabense* в сочетании с его патогенностью (все выделенные на данный момент штаммы данного вида изолированы с симптоматических растений картофеля), безусловно, вызывает удивление. Однако, многими исследователями было подтверждено, что использование классических родоспецифичных праймеров Y1/Y2, применяемых для обнаружения различных видов *Pectobacterium* не приводит к положительному результату в случае со штаммами *P. punjabense* (Cigna et al., 2021; Czajkowski et al., 2015a; Van der Wolf et al., 2021a), что также ограничивает возможность обнаружения новых штаммов, принадлежащих к данному виду и обуславливает необходимость разработки видоспецифичной ПЦР-диагностики для обнаружения и мониторинга распространения данного вида фитопатогена.

Молекулярно-генетическую характеристику штаммов КА-4, КА-5 и SATURN, проведенная при помощи секвенирования гена 16S рРНК с классическими праймерами 27F и 1492R (Lane, 1991) позволила подтвердить принадлежность штаммов к *P. punjabense*. По результатам сравнения фрагментов 16S рДНК с наиболее близкими последовательностями, обнаруженными с помощью BLASTN, нуклеотидная идентичность вышеописанных штаммов по сравнению с типовым штаммом *P. punjabense* SS95 (регистрационный номер NCBI GenBank: CP038498.1) составила около 99,9%.

По результатам секвенирования генома штамма *P. punjabense* SATURN были получены нуклеотидные последовательности, на основании которых были проведены расчеты средней идентичности нуклеотидов (ANI). Используя значения ANI, метод объединения соседей сгруппировал все известные штаммы *P. punjabense*, штамм IFB5596 *P. sp.* и штамм SATURN в отдельной кладе с ANI 98,6% и выше (Рисунок 16). На основании порога определения видов прокариот, равного 96% (Maderankova et al., 2019), штамм SATURN (а также *P. sp.* IFB5596) можно отнести к *P. punjabense*.

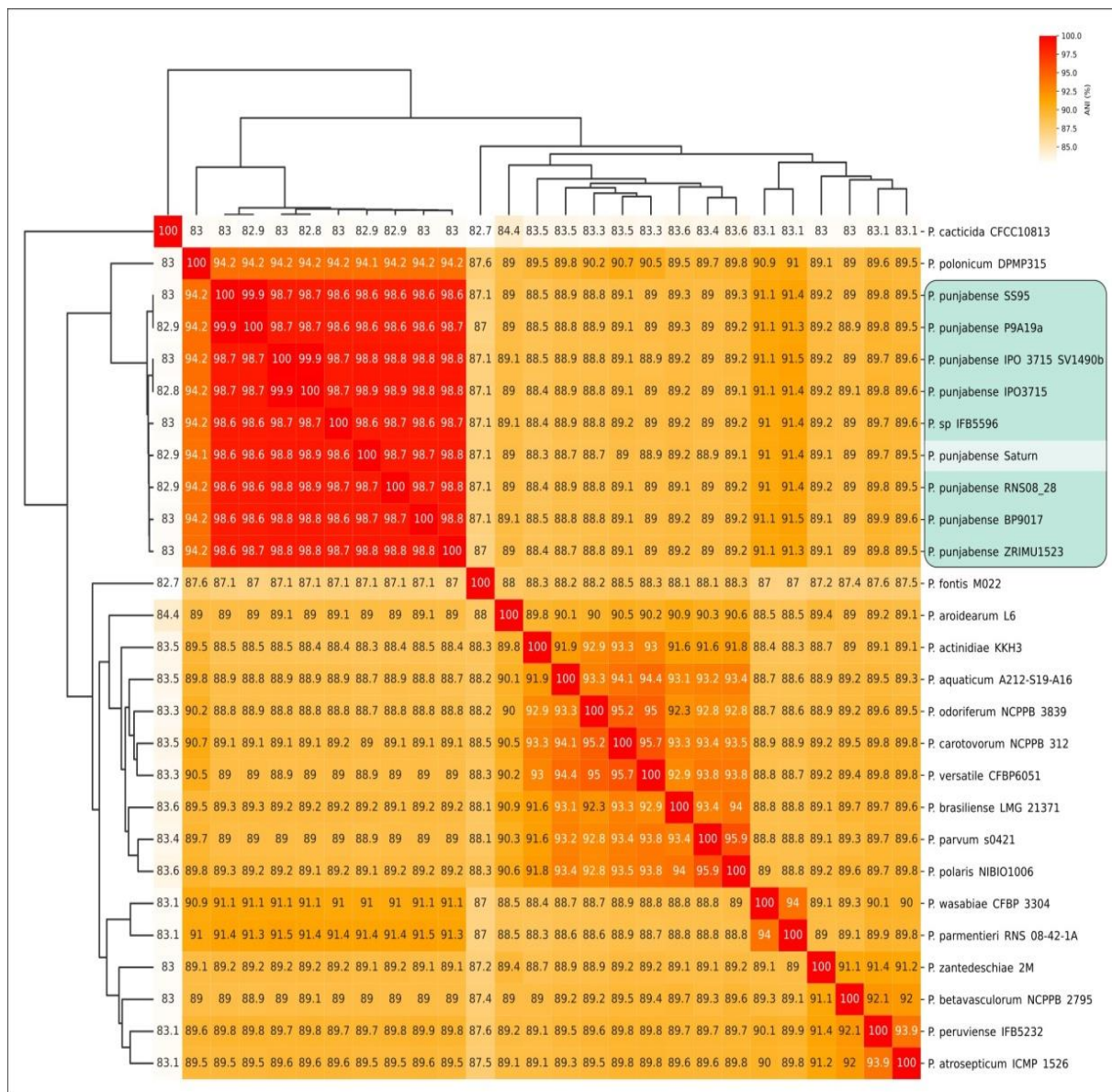


Рисунок 16. Матрица сходства и дерево объединения соседей, построенные с использованием значений ANI на основании геномных последовательностей, отнесенных к роду *Pectobacterium* (здесь и для Рисунка 17 штаммы, которые можно отнести к *P. punjabense*, показаны на зеленом фоне)

Результаты *филогенетического анализа*, проведенного на основании полученных конкатенированных выравниваний 81 основной последовательности генов, извлеченных из 465 геномов *Pectobacterium*, загруженных из базы данных генома NCBI (Рисунок 17) (Du Raan et al., 2016; Moh et al., 2012) также подтвердили таксономическую принадлежность штамма SATURN к виду *P. punjabense*.

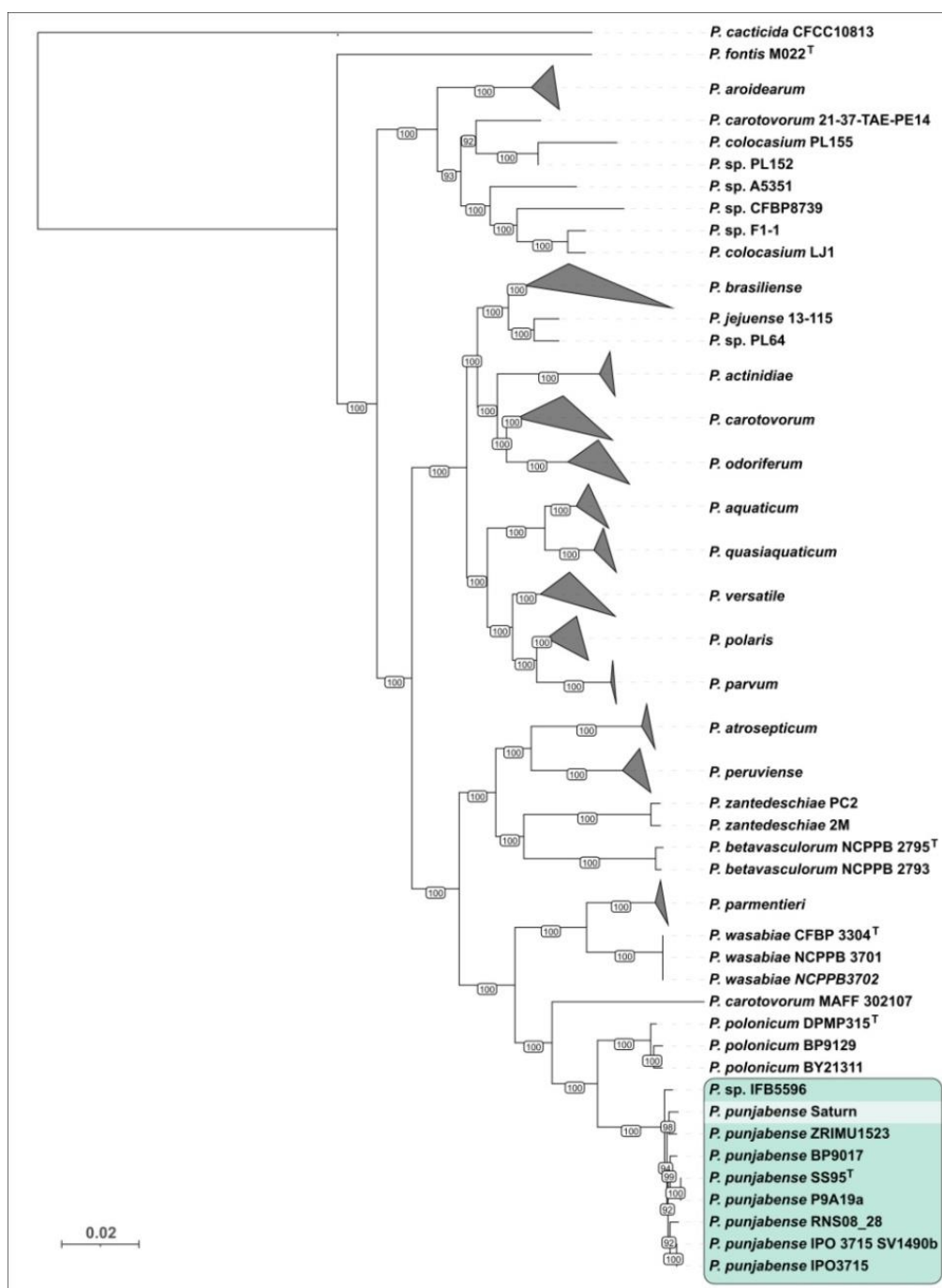


Рисунок 17. Филогенетическое дерево, построенное на основании нуклеотидных последовательностей, отнесенных к роду *Pectobacterium* (масштабная линейка показывает 0,02 нуклеотидные замены на сайт)

Для разработки видоспецифичной ПЦР-диагностики на основании последовательностей гена, кодирующего *ShlB/FhaC/HecB* семейство белков секреции гемолизина (регистрационный номер NCBI GenBank: WP\_010681414.1), связанного с системой секреции V типа и присутствующего в единичной копии у всех ранее известных штаммов *P. punjabense* (Zhou et al., 2022), была

сконструирована пара праймеров РесrunF/РесrunR (Таблица 1). Данный ген соседствует с генами, кодирующими белок внешней мембраны комплекса целлюлозо-синтазы (Architecture of the cellulose synthase outer membrane) и другие белки, участвующие в биосинтезе целлюлозы, которые, в свою очередь, способствуют стабильности образуемых грамотрицательными бактериями биопленок, что существенным образом может способствовать вирулентности фитопатогенных бактерий (Carezzano et al., 2023).

При постановке классической ПЦР с разработанными праймерами были получены ампликоны ожидаемой молекулярной массы около 500 п.н. для трех целевых штаммов *P. punjabense*. Продукты неспецифической амплификации не наблюдались (Рисунок 18). Дальнейшую оценку чувствительности метода проводили при помощи ПЦР-РВ с использованием зонда Taqman.

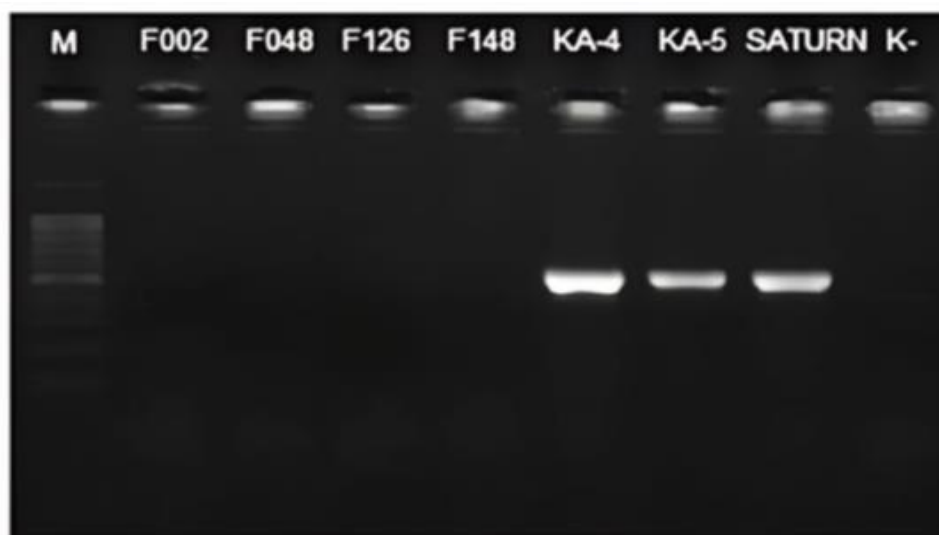


Рисунок 18. Специфичность классической ПЦР с праймерами РесrunF/РесrunR, визуализированная в 1,5% агарозном геле (М – маркер молекулярного веса 1 kb (Евроген, Москва, Россия); F002, F048, F126, F148 – реакция с ДНК штаммов нецелевых патогенов, принадлежащих роду *Pectobacterium*; KA-4, KA-5, SATURN - реакция с ДНК штаммов *P. punjabense*; K- – отрицательный контроль без внесения ДНК)

Специфичность праймеров (РесrunR/РесrunF) и зонда (Ресrun) оценивали с использованием коллекции наиболее распространенных в РФ видов энтеробактериальных возбудителей черной ножки и мягкой гнили (Lukianova et al., 2021), которые филогенетически родственны или потенциально могут находиться

в одной экологической нише с *P. punjabense*. Анализ qPCR Taqman дал сильный сигнал (значения Ct в диапазоне от 27,56 до 28,17) с ДНК, экстрагированной из штаммов *P. punjabense*, но не с ДНК 12 других штаммов, принадлежащих четырем различным видам *Pectobacterium* и трем видам *Dickeya* (концентрации всех ДНК были откалиброваны по 10 нг/мкл) (Таблица 6).

Таблица 6. Анализ специфичности ПЦР в реальном времени, разработанной для обнаружения ДНК *Pectobacterium punjabense*

Штамм	Регион обнаружения патогена	Среднее значение порогового цикла (Ct)	± стандартное отклонение
<i>P. punjabense</i> SATURN	Кемеровская область	28,04	0,09
<i>P. punjabense</i> КА-4	Московская область	28,17	0,15
<i>P. punjabense</i> КА-5	Московская область	27,56	0,12
<i>P. versatile</i> F002	Московская область	NA	0,0
<i>P. versatile</i> F016	Рязанская область	NA	0,0
<i>P. versatile</i> F135	Московская область	NA	0,0
<i>P. atrosepticum</i> F048	Тверская область	NA	0,0
<i>P. atrosepticum</i> F162	Шотландия	NA	0,0
<i>P. atrosepticum</i> F163	Республика Беларусь	NA	0,0
<i>P. brasiliense</i> F126	Самарская область	NA	0,0
<i>P. brasiliense</i> F157	Московская область	NA	0,0
<i>P. parmentieri</i> F148	Московская область	NA	0,0
<i>D. solani</i> DFil	Воронежская область	NA	0,0
<i>D. chrysanthemi</i> DSM 4610 <sup>T</sup>	США	NA	0,0
<i>D. dadantii</i> DSM 18020 <sup>T</sup>	Коморы	NA	0,0

Примечание: «NA» – not amplification, амплификация отсутствует.

По результатам определения порогового уровня чувствительности с использованием десятикратных разведений ДНК штамма *P. punjabense* SATURN,



был определен предел обнаружения геномной ДНК в 0,005 нг/мкл со средним значением порогового цикла (Ct) ниже 40 (Рисунок 19Б). Рисунок 19А иллюстрирует стандартную кривую для пяти серийных разведений ДНК, проанализированной с использованием анализа qPCR TaqMan. Наклон кривой составил -3,416, что соответствует эффективности реакции ПЦР 96,21%, рассчитанной в линейной зоне, согласно рекомендациям MIQE (Bustin, 2009).

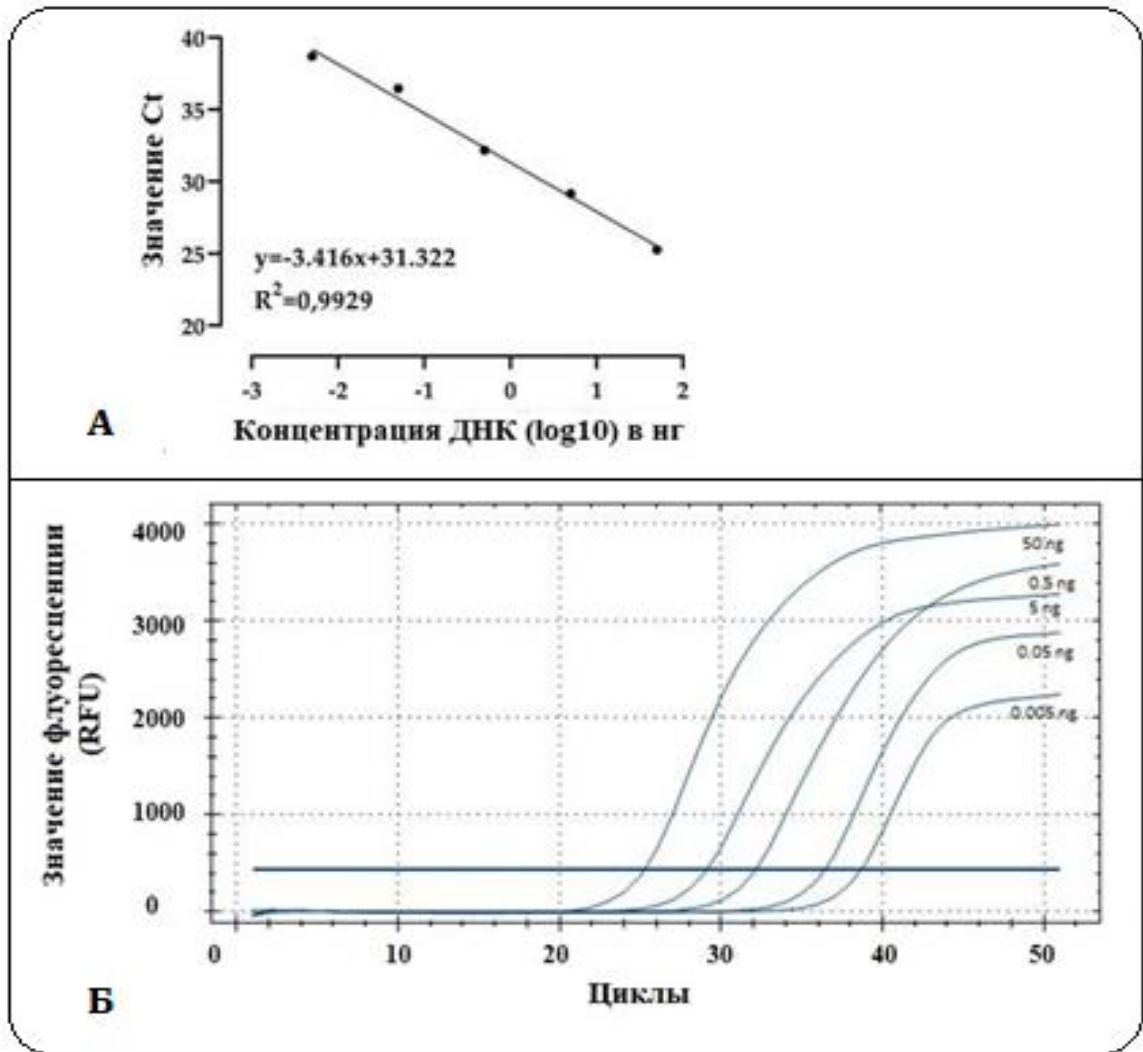


Рисунок 19. Чувствительность обнаружения ДНК *P. punjabense* при постановке ПЦР в реальном времени (А - стандартная кривая, показывающая зависимость Ct от концентрации ДНК патогена в реакции, построенная на основе пороговых циклов; Б - кривые флуоресценции, полученные для серии десятикратных разведений геномной ДНК штамма SATURN)

Согласно научной литературе для обнаружения штаммов *P. punjabense* уже была разработана диагностическая система ПЦР-РВ (Cigna et al., 2021), однако, предел её чувствительности несколько выше, чем у представленной в данной

работе. Диагностическая система, описанная Signa et al. имеет порог чувствительности при концентрации целевой ДНК в реакционной смеси в количестве 0,02 нг/мл, что соответствует  $C_t = 34,52$ , при этом, дальнейшее снижение концентрации ДНК до 0,005 нг/мл не приводило к амплификации. Диагностическая же система, разработанная в данном исследовании, имеет предел обнаружения при минимальной концентрации геномной ДНК 0,005 нг/мл при  $C_t = 36,45$  (Таблица 7). Таким образом, данный анализ может быть использован как эффективный инструмент ранней дифференциальной диагностики *P. punjabense* при проведении мониторинга распространения данного вида возбудителя.

Таблица 7. Чувствительность диагностической тест-системы ПЦР в реальном времени при обнаружении ДНК штамма SATURN *P. punjabense*

Концентрация ДНК в реакционной смеси	Среднее значение порогового цикла ( $C_t$ )	$\pm$ стандартное отклонение
50 нг	25,27	0,17
5 нг	29,15	0,87
0,5 нг	32,18	0,08
0,05 нг	36,45	0,05
0,005 нг	38,7	0,07

#### **3.4. Использование медьсодержащих фунгицидов в защите картофеля от возбудителей черной ножки**

С учетом биологии возбудителей черной ножки, способных не только распространяться через зараженный семенной материал, но и сохраняться в эпифитных популяциях (Мыца и др., 2014), использование сертифицированного семенного материала не может полностью исключить риск возникновения заболеваний, и наиболее эффективным средством защиты картофеля по-прежнему являются пестициды. Лишь полноценная химическая защита, включающая в себя как предпосадочную обработку клубней, так и обработку по листу в течение вегетации, может обеспечить подавление болезней и получение полноценного урожая.

В последнее время на картофеле все чаще фиксируется комплексное поражение культуры фитофторозом, альтернариозом и бактериальными гнилями, защита от которых подразумевает применение препаратов с расширенным спектром действия. Однако многие применяемые ранее в сельском хозяйстве препараты оказались токсичными и экологически небезопасными (Karjalainen et al., 2000; Kastelein, 2021), а современный ассортимент препаратов для предпосадочной обработки клубней и опрыскивания посевов в период вегетации достаточно ограничен. В этой связи особый интерес представляют медьсодержащие препараты, способные оказывать противогрибное и антибактериальное действие при низких концентрациях (Abd El-Rahman, 2018). В этой связи, в данном разделе проводили оценку антибактериального действия медьсодержащих фунгицидов в отношении возбудителей черной ножки картофеля.

По результатам оценки бактерицидных свойств фунгицидов было установлено, что добавление фунгицида Ридомил Голд Р в питательную среду в концентрации 0,28 г/л и более (по действующему веществу хлорокись меди) препятствовало росту колоний типового штамма *Dickeya chrysanthemi*. Бактериостатический эффект препарата проявлялся при снижении концентрации фунгицида в среде до 0,14 г/л, о чем свидетельствовало уменьшение числа бактериальных колоний на 30% по сравнению с контролем (Таблица 8).

Таблица 8. Сравнение бактерицидного действия фунгицидов Ридомил Голд Р и Курзат Р на типовом штамме DSM4610 *Dickeya chrysanthemi*

Концентрация препарата, %	Ридомил Голд Р (оксихлорид меди, г/л раб. р-ра)	Биологическая эффективность Ридомил Голд Р, %	Курзат Р (хлорокись меди, г/л раб. р-ра)	Биологическая эффективность Курзат Р, %
0,1	0,142	30	0,69	0
0,2	0,284	100	1,38	30
0,4	0,568	100	2,76	35
0,6	0,852	100	4,14	40
1	1,42	100	6,9	100

Внесение Курзата Р в питательную среду препятствовало росту бактериальных колоний только при концентрации действующего вещества хлорокись меди 6,9 г/л, что превышало более чем в 48 раз аналогичную эффективную концентрацию меди в составе Ридомила Голд Р.

Дальнейшее же снижение концентрации Курзата (Рисунок 20) в среде вызывало бактериостатический эффект вплоть до достижения концентрации действующего вещества 0,69 г/л, при которой биологическая эффективность Курзата снизилась до 0% и сравнялась с контролем.

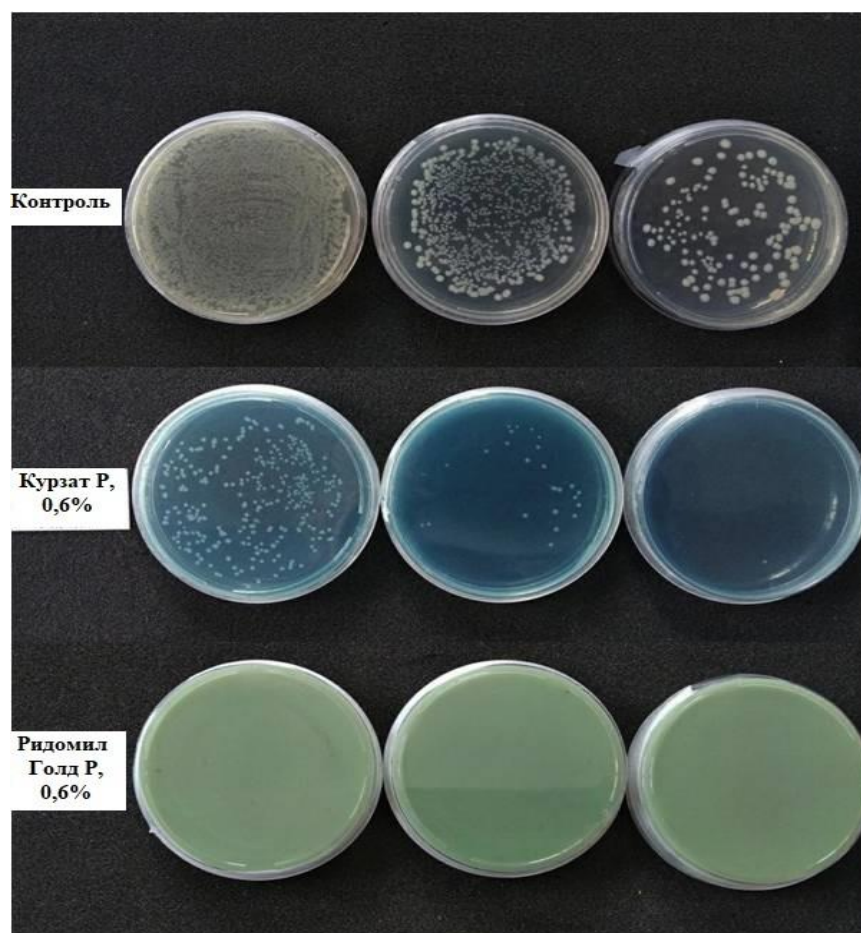


Рисунок 20. Оценка антибактериального действия фунгицидов по отношению к референтном штамму возбудителей черной ножки картофеля DSM4610 *Dickeya chrysanthemi* при равных концентрациях препаратов в среде

Поскольку биологическая эффективность препарата Ридомил Голд Р значительно превышала эффективность Курзата Р при скрининге по отношению к контрольному штамму, дальнейшие исследования проводились без сравнения с Курзатом Р.

Дальнейший этап скрининга включал оценку биологической эффективности фунгицида Ридомил Голд Р по отношению к штаммам, принадлежащим к 4 различным видам возбудителей черной ножки картофеля, распространенных на территории РФ (Таблица 4).

Как отмечено в Таблице 9, при всех опытах *in vitro* фунгицид показал себя также эффективно, как и при исследованиях с типовым штаммом *Dickeya chrysanthemi*. Внесение препарата в питательную среду в концентрации 0,284 г/л и более препятствовало росту бактериальных колоний. Понижение концентрации фунгицида в среде до 0,142 г/л привело к снижению биологической эффективности препарата с 100 до 30% в отношении изолята ОТГ-16 *Pectobacterium brasiliense*. По отношению ко всем остальным изолятам возбудителей черной ножки картофеля биологическая эффективность препарата Ридомил Голд Р составила 100% при всех исследуемых концентрациях рабочего раствора фунгицида.

Таблица 9. Биологическая эффективность препарата Ридомил Голд Р по отношению к различным видам возбудителей черной ножки картофеля

Концентрация рабочего раствора, %	Биологическая эффективность препарата, %								
	<i>P. brasiliense</i>			<i>P. carotovorum</i>			<i>P. versatile</i>		<i>P. punjabense</i>
	S-7	ОТГ-9	КА-3	ККТ-17	GAEL-2	В-22	Т-10	Р-9	КА-5
0,1	100	30	100	100	100	100	100	100	100
0,2	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,6	100	100	100	100	100	100	100	100	100
1,0	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Для оценки способности возбудителей черной ножки сохраняться на листовой поверхности нами были проведены опыты с применением метода отпечатков листьев картофеля на питательные среды.

На селективной среде CVP-SL учитывали гидролизующие пектатный гель колонии, по которым можно судить о наличии пектолитических бактерий (Рисунок

21). При этом на среде King's B было обнаружено множество колоний различных форм и размеров, что говорит о неполной стерилизации листьев от сопутствующей микробиоты перед началом эксперимента. Наличие на средах King's B и CVP-SL колоний *Dickeya* sp. было подтверждено методом ПЦР в реальном времени с использованием диагностического набора Фитоскрин (РН-031, Синтол, Москва, Россия). В варианте с внесением фунгицида Ридомил Голд Р в питательную среду в концентрации 1% (по препарату) рост колоний бактерий в чашках не наблюдался.

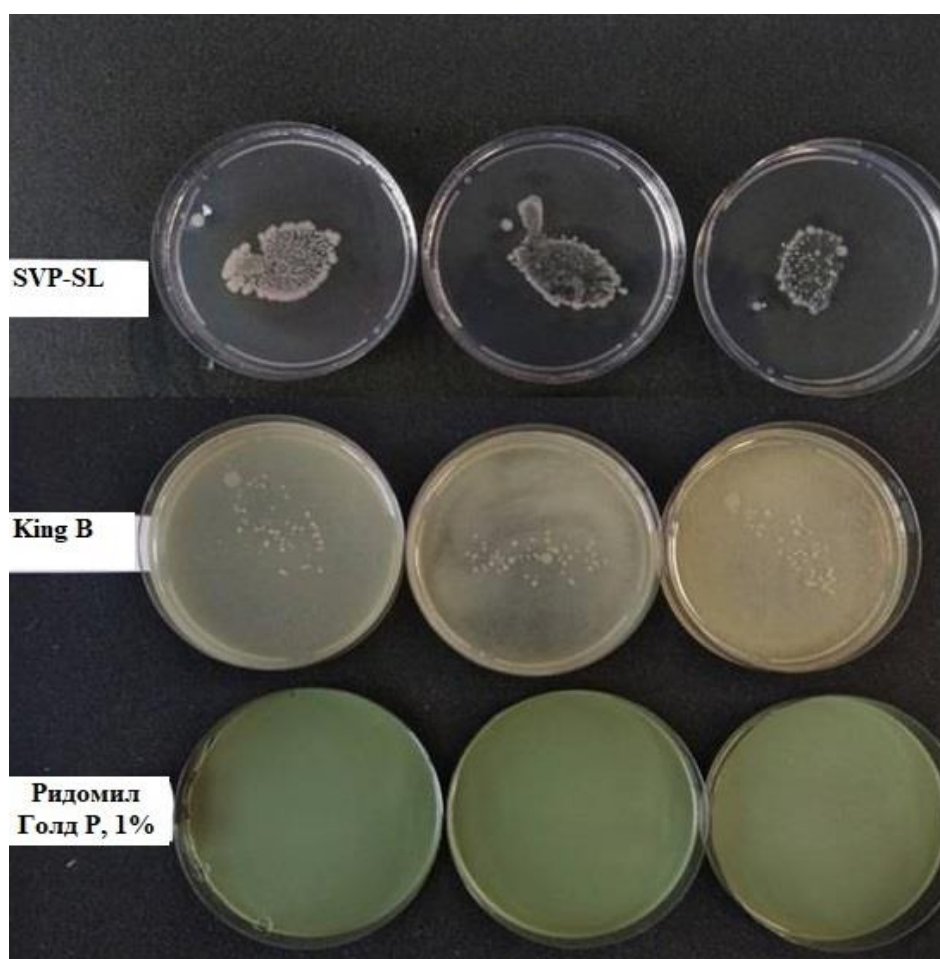


Рисунок 21. Чашки Петри после проведения опытов с отпечатками с листьев картофеля, обработанных суспензией возбудителя черной ножки картофеля DSM4610 *Dickeya chrysanthemi* в концентрации  $10^6$  КОЕ/мл

На следующем этапе эксперимента *оценивали защитные свойства фунгицида при предварительной обработке по листу*. Так при обработке листьев картофеля суспензиями патогена в концентрациях  $10^8$ ,  $10^6$ ,  $10^4$  КОЕ/мл площадь покрытия листьев картофеля бактериальными колониями в контроле составляла

40,9 ± 4,8, 18,5 ± 2,4 и 6,0 ± 2,9 % от общей площади листа (Рисунок 22). В вариантах же с обработкой Ридомилом, напротив, роста бактериальных колоний не наблюдалось при всех используемых концентрациях бактериальных суспензий.

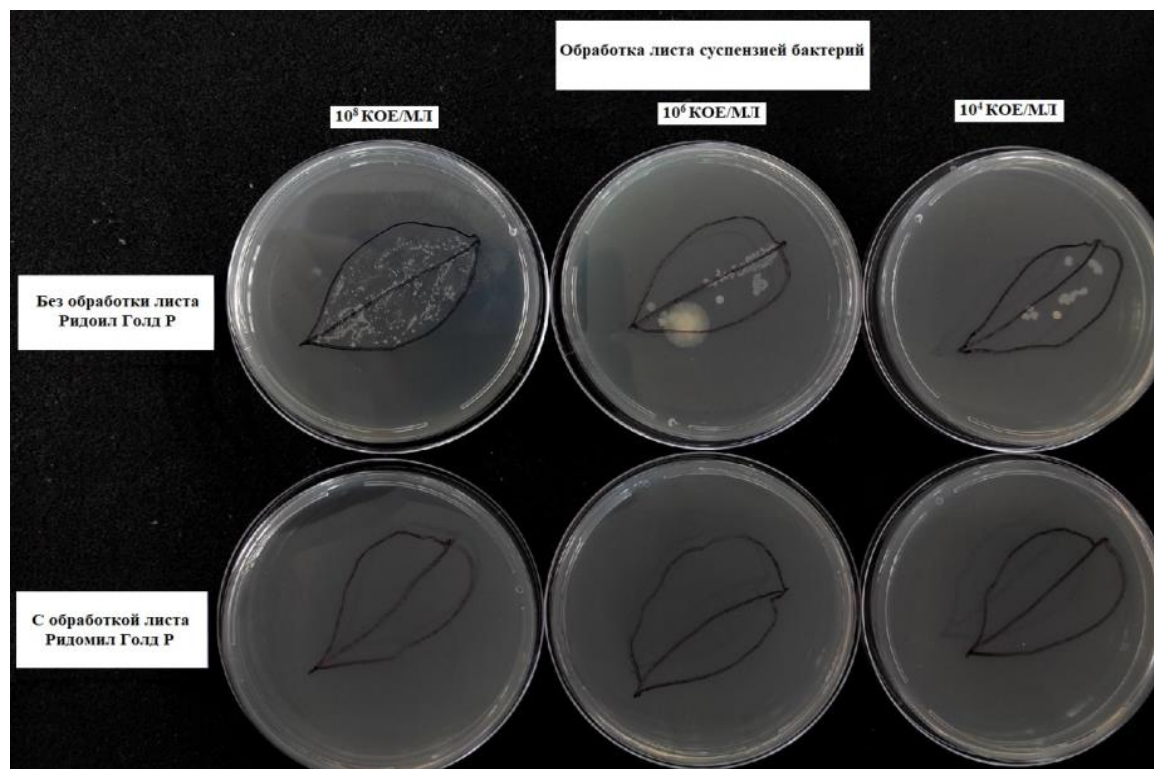


Рисунок 22. Оценка бактерицидного действия Ридомил Голд Р, по отношению к популяции возбудителя черной ножки картофеля DSM 4610 *Dickeya chrysanthemi* методом отпечатков (верхний ряд – отпечатки листьев контроля, не обработанных перед инокуляцией фунгицидом, нижний ряд – отпечатки листьев, обработанных перед инокуляцией фунгицидом)

Для принятия оптимальных мер защиты картофеля от черной ножки картофеля была проведена *оценка возможных путей передачи патогенов*. Было составлено три модели: первая - позволяла оценить вероятность передачи патогена от зараженного листа к здоровому, путем соприкосновения листовых пластин друг с другом; вторая модель описывала возможность пектобактерий передаваться на здоровые растения через воду, собранную с предварительно зараженного листа картофеля; и третья модель описывала возможность патогена длительное время сохраняться на частях орудий труда и таким образом способствовать перезаражению здоровых растений.

Исходя из результатов экспериментов, представленных в Таблице 10, было определено, что применение фунгицида Ридомила Голд Р при обработке по листу позволяет снизить площади покрытия листьев картофеля колониями патогенных бактерий с 19,3% (при передаче патогена через механический контакт) и 6,9% (при передаче патогена посредством воды) в контроле до 0% в варианте с предварительной обработкой фунгицидом.

Таблица 10. Влияние предварительной обработки препаратом Ридомил Голд Р на площадь покрытия листа картофеля колониями возбудителя чёрной ножки DSM4610 *Dickeya chrysanthemi*

Степень покрытия колониями возбудителя листа при искусственном заражении, %	Степень покрытие колониями возбудителя листа в контроле, %	Покрытие колониями возбудителя листа, обработанного фунгицидом, %
(среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)		
Передача от листа к листу		
46,4 $\pm$ 2,8	19,3 $\pm$ 2,1	0,0 $\pm$ 0,0
Передача через воду		
30,7 $\pm$ 1,5	6,9 $\pm$ 3,2	0,0 $\pm$ 0,0

Третья модель демонстрировала возможность патогена длительное время сохраняться на металлических и пропиленовых частях орудий труда (Таблица 11). В ходе эксперимента было установлено, что в течение первых суток после инокуляции пластин площади покрытия их колониями патогенов составляли более 17%, при этом на металлических пластинах единичные колонии бактерий сохранились даже спустя сутки после контакта с патогеном. Предварительная же обработка пластин фунгицидом позволила снизить площади их покрытия колониями патогенов до 0%.

По результатам оценки интенсивности поражения листьев и побегов картофеля при поверхностной инокуляции суспензией патогенов была отмечена способность пектобактерий не только сохраняться на поверхности растения, но и вызывать мацерацию листовых пластин и стеблей побегов картофеля (Таблица 12).



Таблица 11. Влияние предварительной обработки препаратом Ридомил Голд Р на площадь заселения пластин штаммом возбудителя чёрной ножки DSM4610 *Dickeya chrysanthemi*

Период инкубации, сутки	Площадь покрытия колониями возбудителя пластины контроля, %	Площадь покрытия колониями возбудителя пластины, обработанной фунгицидом, %
	(среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)	
Металлическая пластина		
1	20,1 $\pm$ 3,6	0,0 $\pm$ 0,0
2	3,2 $\pm$ 1,6	0,0 $\pm$ 0,0
Полипропиленовая пластина		
1	17,9 $\pm$ 0,6	0,0 $\pm$ 0,0
2	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

Таблица 12. Динамика интенсивности поражения листьев и побегов картофеля при поверхностной инокуляции штаммом возбудителя чёрной ножки DSM4610 *Dickeya chrysanthemi*

Период инкубации, сутки	Интенсивность поражения в положительном контроле, балл	Интенсивность поражения в отрицательном контроле, балл	Интенсивность поражения при обработке фунгицидом, балл
	(среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)		
Листья картофеля			
1	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2	1,33 $\pm$ 0,52	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
Побеги картофеля			
1	0,16 $\pm$ 0,41	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
2	1,57 $\pm$ 0,53	0,00 $\pm$ 0,00	0,16 $\pm$ 0,41
3	1,83 $\pm$ 0,41	0,00 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,52

Несмотря на то, что в первые сутки после инокуляции листьев картофеля суспензией патогена мацерация не отмечалась, уже на второй день эксперимента было зафиксировано поражение всех листьев в положительном контроле, проявляющееся в виде размягчения растительной ткани с характерным потемнением сосудистой части листовой пластины. На листьях картофеля в отрицательном контроле и варианте с предварительной обработкой фунгицидом Ридомил Голд Р мацерация листа не была замечена ни в одной повторности (Рисунок 23).



Рисунок 23. Оценка способности возбудителя черной ножки картофеля штаммом DSM4610 *Dickeya chrysanthemi* вызывать мацерацию листовой пластины на 2-й день после инокуляции (1 - обработка суспензией патогена, 2 – обработка стерильной водой, 3 – предварительная обработка Ридомил Голд Р + бактериальная суспензия патогена)

По итогам эксперимента с инокуляцией побегов картофеля штаммом возбудителя черной ножки *Dickeya chrysanthemi* были получены результаты аналогичные результатам опыта по заражению листовой пластины (Таблица 12). Спустя сутки после инокуляции в одной из повторностей в варианте положительного контроля отмечалось пожелтение листьев, однако по мере продолжения эксперимента симптомы нарастали, проявляясь в потемнении и размягчении нижней части стебля, распространяющихся вверх с переходом на листья, и уже на 2 день эксперимента были зафиксированы во всех повторностях. В варианте же с предварительной обработкой фунгицидом на 2 и 3 день эксперимента в двух повторностях было отмечено незначительное пожелтение нескольких листьев побегов, дальнейшее развитие патологического процесса не наблюдалось, что может свидетельствовать о бактериостатическом эффекте фунгицида Ридомил Голд Р по отношению к пектолитическим бактериям.

Следующим этапом эксперимента служила *оценка возможности передачи инфекции*, посредством стекания бактериального экссудата с искусственно зараженных растений с признаками загнивания листьев/побегов на условно здоровые растения картофеля.

По результатам эксперимента был зафиксирован факт передачи инфекции (Рисунок 24).



Рисунок 24. Патогенное влияние популяции возбудителя черной ножки картофеля *Dickeya chrysanthemi* на вегетирующие растения картофеля на 2-й день после искусственной инокуляции суспензией патогена (А, Б – второй день эксперимента, В, Г – третий день эксперимента: 1 – растения предварительно инокулированные патогенами, 2 – здоровые растения, установленные рядом с пораженными)

Интенсивность поражения в обоих вариантах нарастала по мере вегетации (Таблица 13) и уже на 2-й день после соприкосновения побегов пораженных и здоровых растений интенсивность поражения последних составила  $1,41 \pm 0,53$  балла и проявлялась в пожелтение листьев и побегов, а на 3-й день – было отмечено полноценное гниение верхушек побегов с интенсивностью поражения, выраженной в  $2,11 \pm 0,61$  балла. При искусственной инокуляции побегов заболевание развивалось более стремительно, балл поражения к окончанию эксперимента составил  $2,92 \pm 0,71$ .

Таблица 13. Динамика интенсивности поражения растений картофеля в условиях теплицы штаммом возбудителя чёрной ножки DSM4610 *Dickeya chrysanthemi*

Проведение учетов, сутки	Интенсивность поражения растения при искусственной поверхностной инокуляции суспензией патогена, балл	Интенсивность поражения условно здорового растения при моделировании естественного процесса заражения, за счет соприкосновения с искусственно зараженными симптоматичными побегами, балл
	(среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)	
1	2,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
2	2,41 $\pm$ 0,53	1,41 $\pm$ 0,53
3	2,92 $\pm$ 0,71	2,11 $\pm$ 0,61

В ходе эксперимента по оценке защитного действия фунгицида Ридомил Голд Р на вегетирующих растениях картофеля в условиях теплицы на пятый день от заражения растений было отмечено увядание, как на побегах положительного, так и отрицательного контроля, что свидетельствует о факте передачи инфекции (Рисунок 25). Интенсивность поражения в положительном контроле по итогам эксперимента составила  $1,17 \pm 1,69$  балла, в отрицательном –  $0,83 \pm 1,30$ , распространенность в обоих вариантах - 34,78%. В варианте с предварительной обработкой фунгицидом Ридомил Голд Р по итогам эксперимента только на нескольких растениях было зафиксировано незначительное пожелтение отдельных листьев, что согласуется с результатами, полученными в лабораторных условиях при инокуляции побегов. Интенсивность поражения в данном варианте составила  $0,09 \pm 0,28$  баллов при распространенности заболевания в 8,69%



Рисунок 25. Оценка защитного действия Ридомил Голд Р по отношению к возбудителю черной ножки картофеля *Dickeya chrysanthemi* на вегетирующих растениях картофеля на 5-й день эксперимента (1 – предварительная обработка Ридомил Голд Р + бактериальная суспензия патогена; 2 – положительный контроль; 3 – отрицательный контроль)

### 3.5. Использование веществ растительного происхождения в защите картофеля от возбудителей черной ножки

В последнее десятилетие активно разрабатываются научные основы применения ботанических пестицидов в защите растений от вредных организмов. Результаты показывают большие перспективы от применения эфирных масел (Najian-Maleki et al., 2021) и растительных экстрактов (Behidj-Benyounes et al., 2017) в защите растений от пектолитических бактерий.

В данном разделе описаны результаты экспериментов по определению антибактериальной активности различных эфирных масел и растительных экстрактов по отношению к штаммам возбудителей черной ножки картофеля в условиях *in vitro* и *in vivo*.

*Первичный скрининг антибактериальной активности 25 эфирных масел и 7 экстрактов растений методом диффузии в агаре* показал различную степень антибактериальной активности в отношении 4 исследуемых штаммов пектолитических бактерий (Рисунок 26): высокую (зона ингибирования 15,0 мм и более), умеренную (зона ингибирования от 10,0 до 14,9 мм) и низкую (зона ингибирования менее 10,0 мм). При этом диаметр зоны варьировал как в зависимости от тестируемого эфирного масла или экстракта, так и от штамма (Таблица 14).

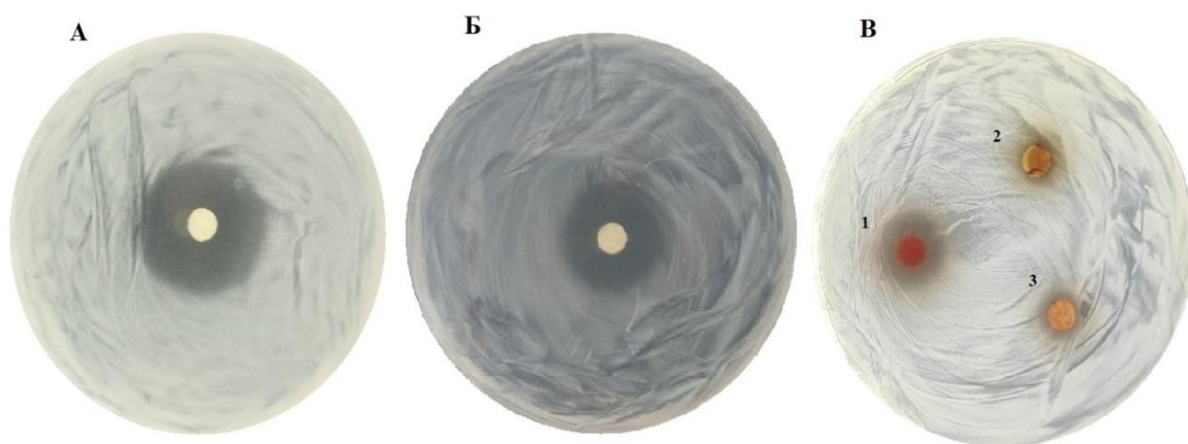


Рисунок 26. Зоны ингибирования бактерии вокруг дисков с эфирными маслами и экстрактами растений на газонах возбудителей чёрной ножки картофеля (А- диск с эфирным маслом коричника китайского на газоне штамма DSM4610 *D. chrysanthemi*, Б – диск с эфирным маслом гвоздичного дерева на газоне штамма DSM 22556 *P. odoriferum*, В – диски с растительными экстрактами ореха манчжурского (1), кедра сибирского (2) и бадана толстолистного (этанольного) (3) на газоне штамма DSM 18020 *D.dadantii*)

Ввиду большого количества образцов и штаммов задачами первичного скрининга являлся отбор наиболее активных веществ и их дальнейшее подробное исследование. В связи с этим для последующих исследований были выбраны эфирные масла душицы обыкновенной, коричника китайского, тмина обыкновенного, пихты сибирской, кориандра посевного, тимьяна обыкновенного, чабера садового и гвоздичного дерева (Таблица 14).

Таблица 14. Значения диаметров зон ингибирования при оценке антибактериальной активности эфирных масел и экстрактов растений против возбудителей черной ножки картофеля методом диффузии на диске, мм

Источник выделения	Диаметр стерильной зоны, мм (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение)			
	<i>D. chrysanthemi</i> DSM 4610	<i>P. odoriferum</i> DSM 22556	<i>D. dadantii</i> DSM 18020	<i>P. carotovorum</i> DSM 30168
Эфирные масла				
Анис обыкновенный	7,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	7,3 $\pm$ 0,6	7,0 $\pm$ 0,0
Гвоздичное дерево	20,6 $\pm$ 1,5	18,0 $\pm$ 1,0	15,3 $\pm$ 0,6	15,6 $\pm$ 0,6
Душица обыкновенная	26,0 $\pm$ 1,7	34,6 $\pm$ 1,1	30,3 $\pm$ 0,6	32,6 $\pm$ 1,1
Кардамон настоящий	9,0 $\pm$ 0,0	9,6 $\pm$ 0,6	8,6 $\pm$ 0,6	8,0 $\pm$ 0,0
Кориандр посевной	11,0 $\pm$ 0,0	14,3 $\pm$ 1,1	16,3 $\pm$ 0,6	15,0 $\pm$ 0,0
Коричник китайский	27,0 $\pm$ 1,7	19,6 $\pm$ 0,6	21,6 $\pm$ 1,5	29,0 $\pm$ 1,0
Лаванда узколистная	10,0 $\pm$ 0,0	7,0 $\pm$ 0,0	9,0 $\pm$ 1,4	8,0 $\pm$ 0,0
Лайм настоящий	12,0 $\pm$ 0,0	9,0 $\pm$ 0,0	10,3 $\pm$ 0,6	7,6 $\pm$ 0,6
Мандарин Клементин	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Мята длиннолистная	9,0 $\pm$ 1,4	9,0 $\pm$ 0,0	10,0 $\pm$ 0,0	10,0 $\pm$ 0,0
Мята перечная	7,5 $\pm$ 0,7	9,0 $\pm$ 1,4	10,0 $\pm$ 0,0	10,0 $\pm$ 1,4
Пижма обыкновенная	10,6 $\pm$ 0,6	8,0 $\pm$ 0,0	9,6 $\pm$ 0,6	9,3 $\pm$ 0,6
Пихта сибирская	11,6 $\pm$ 0,6	17,3 $\pm$ 1,1	20,3 $\pm$ 0,6	18,0 $\pm$ 0,0
Розмарин обыкновенный	12,3 $\pm$ 0,6	10,0 $\pm$ 0,0	13,0 $\pm$ 1,1	14,3 $\pm$ 0,6
Ротанговая пальма	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	14,6 $\pm$ 0,6
Рута душистая	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	10,6 $\pm$ 0,6	0,0 $\pm$ 0,0
Тимьян обыкновенный	22,0 $\pm$ 1,4	15,0 $\pm$ 0,0	21,0 $\pm$ 2,1	23,0 $\pm$ 0,0
Тмин обыкновенный	18,3 $\pm$ 0,6	10,6 $\pm$ 0,6	11,3 $\pm$ 1,1	12,3 $\pm$ 0,6
Тысячелистник обыкновенный	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0

Фенхель обыкновенный	9,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	9,6 ± 0,6	8,6 ± 0,6
Цитрус бергамот	11,0 ± 0,0	13,6 ± 1,1	13,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Чабер садовый	27,3 ± 2,1	14,6 ± 0,5	27,6 ± 0,6	27,6 ± 1,1
Чёрный тмин	8,5 ± 0,6	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0
Чеснок посевной	8,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Шалфей лекарственный	12,3 ± 0,6	0,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Растительные экстракты				
Бадан толстолистный (ВЭ)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,6	14,6 ± 0,6
Бадан толстолистный (ЭЭ)	11,6 ± 0,6	14,7 ± 1,1	9,0 ± 1,0	18,3 ± 1,5
Дуб обыкновенный (ЭЭ)	10,3 ± 0,6	12,0 ± 0,0	11,6 ± 0,6	15,6 ± 1,1
Кедр сибирский (ВЭ)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	9,0 ± 0,0	10,3 ± 0,6
Лук репчатый (ВЭ)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	10,0 ± 1,0	15,3 ± 0,6
Орех манчжурский (ВЭ)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	14,6 ± 0,6	13,6 ± 1,1
Ротанговая пальма (ЭЭ)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	12,6 ± 0,6
Стандарт				
Гентамицин	7,6 ± 1,1	8,5 ± 0,0	9,2 ± 0,6	8,0 ± 0,0

*Примечание:* «ВЭ» - водный экстракт, «ЭЭ» - этанольный экстракт

Среди растительных экстрактов величина зон ингибирования варьировала в основном в умеренном диапазоне. При этом ни один экстракт, кроме экстракта дуба обыкновенного, не проявлял антибактериальных свойств одновременно ко всем исследуемым патогенам. Однако каждый растительный экстракт проявлял умеренную антибактериальную активность по крайней мере к одному из исследуемых видов пектобактерий, в связи с чем было решено использовать все



экстракты на следующем этапе скрининга (Таблица 14).

Стоит также отметить, что отобранные эфирные масла и экстракты растений проявили высокую антибактериальную активность по сравнению с антибиотиком гентамицином, зоны ингибирования которого соответствовали низкой степени антибактериальной активности (от 7,6 до 9,2 мм). В положительном контроле с применением эмульгатора Tween 20 зон ингибирования роста бактерий не наблюдалось.

Для подтверждения данных об антибактериальных свойствах 8 эфирных масел и 7 экстрактов растений определяли наименьшую их концентрацию, ингибирующую рост бактерий (МИК), и минимальную бактерицидную концентрацию, приводящую к гибели бактерий (МБК), методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде (Таблица 15).

Таблица 15. Значения МИК и МБК эфирных масел и экстрактов растений при оценке антибактериальной активности против возбудителей черной ножки картофеля методом разведения в жидкой питательной среде, %

Источник выделения	Минимальная ингибирующая концентрация (МИК), %				Минимальная бактерицидная концентрация (МБК), %			
	<i>D. chrysanthemi</i>	<i>P. odoriferum</i>	<i>D. dadantii</i>	<i>P. carotovorum</i>	<i>D. chrysanthemi</i>	<i>P. odoriferum</i>	<i>D. dadantii</i>	<i>P. carotovorum</i>
	DSM 4610	DSM 22556	DSM 18020	DSM 30168	DSM 4610	DSM 22556	DSM 18020	DSM 30168
Эфирные масла								
Гвоздичное дерево	0,25	0,25	0,25	0,125	0,5	0,5	0,5	0,25
Душица обыкновенная	0,25	0,125	0,25	0,125	0,5	0,25	0,5	0,5
Кориандр посевной	1,0	1,0	0,5	1,0	>1,0	>1,0	1,0	>1,0
Коричник китайский	0,125	0,25	0,125	0,125	0,25	0,5	0,5	0,25
Пихта сибирская	1,0	0,5	0,5	0,5	>1,0	>1,0	1,0	>1,0
Тимьян обыкновенный	1,0	1,0	0,5	0,5	>1,0	>1,0	>1,0	1,0

Тмин обыкновен- ный	0,5	1,0	1,0	1,0	>1,0	>1,0	>1,0	>1,0
Чабер садовый	0,5	1,0	0,5	0,5	>1,0	>1,0	1,0	1,0
Растительные экстракты								
Бадан толстолист- ный (ВЭ)	>10,0	10,0	>10,0	>10,0	не опре- делена	>10,0	не опре- делена	не опре- делена
Бадан толстолист- ный (ЭЭ)	5,0	1,25	5,0	2,5	10,0	2,5	10,0	5,0
Дуб обыкновен- ный (ЭЭ)	5,0	1,25	2,5	2,5	10,0	2,5	5,0	5,0
Кедр сибирский (ВЭ)	>10,0	>10,0	>10,0	10,0	не опре- делена	не опре- делена	не опре- делена	>10,0
Лук репчатый (ВЭ)	>10,0	>10,0	10,0	10,0	не опре- делена	не опре- делена	>10,0	>10,0
Орех манчжур- ский (ВЭ)	>10,0	>10,0	10,0	10,0	не опре- делена	не опре- делена	>10,0	>10,0
Ротанговая пальма (ЭЭ)	>10,0	>10,0	>10,0	10,0	не опре- делена	не опре- делена	не опре- делена	>10,0

Значения МИК тестируемых эфирных масел варьировали в диапазоне от 1,25 до 10,0 мг/мл. При этом только значения эфирных масел душицы обыкновенной, коричника китайского и гвоздичного дерева находились в минимальном диапазоне: от 1,25 до 2,5 мг/мл. Наименьшие показатели МБК по отношению ко всем используемым бактериальным штаммам также были отмечены у трех вышеперечисленных масел, в связи с чем, только эти масла были использованы для последующих исследований.

Антибактериальную активность экстрактов растений оценивали путем культивирования на агаризированной среде аликвот смеси питательного бульона с растительными экстрактами и бактериальным инокулятом, отмечая минимальную концентрацию экстракта, при которой не наблюдался рост бактериальных колоний

(Рисунок 27). Проводили также оценку степени мацерации ломтиков картофеля, инокулированных аликвотами той же смеси (Рисунок 28, Рисунок 29).

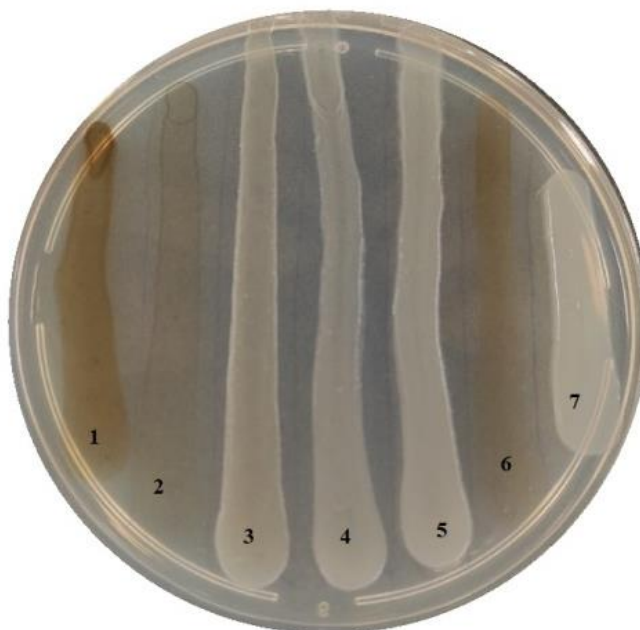


Рисунок 27. Оценка антибактериальной активности экстрактов растений по отношению к возбудителям черной ножки картофеля путем культивирования на агаризированной среде разведений смеси питательного бульона с растительными экстрактами (1-5 - концентрации растительных экстрактов от 10,0 до 0,625 %; 6 - контроль без добавления суспензии бактерий; 7 - контроль без растительного экстракта)

Значения МИК растительных экстрактов оказались значительно выше, чем МИК эфирных масел, и колебались в основном в диапазоне от 12,5 до 100,0 мг/мл (Таблица 15). Экстракты, значения МИК которых по отношению хотя бы к одному из используемых патогенов превышали 100,0 мг/мл, были определены как низкоэффективные и в дальнейших исследованиях не использовались. Таким образом, в качестве наиболее эффективных растительных экстрактов были отобраны этанольные экстракты бадана толстолистного и дуба обыкновенного, значения МИК которых варьировали в диапазоне от 12,5 до 50,0 мг/мл по отношению ко всем исследуемым пектобактериям.

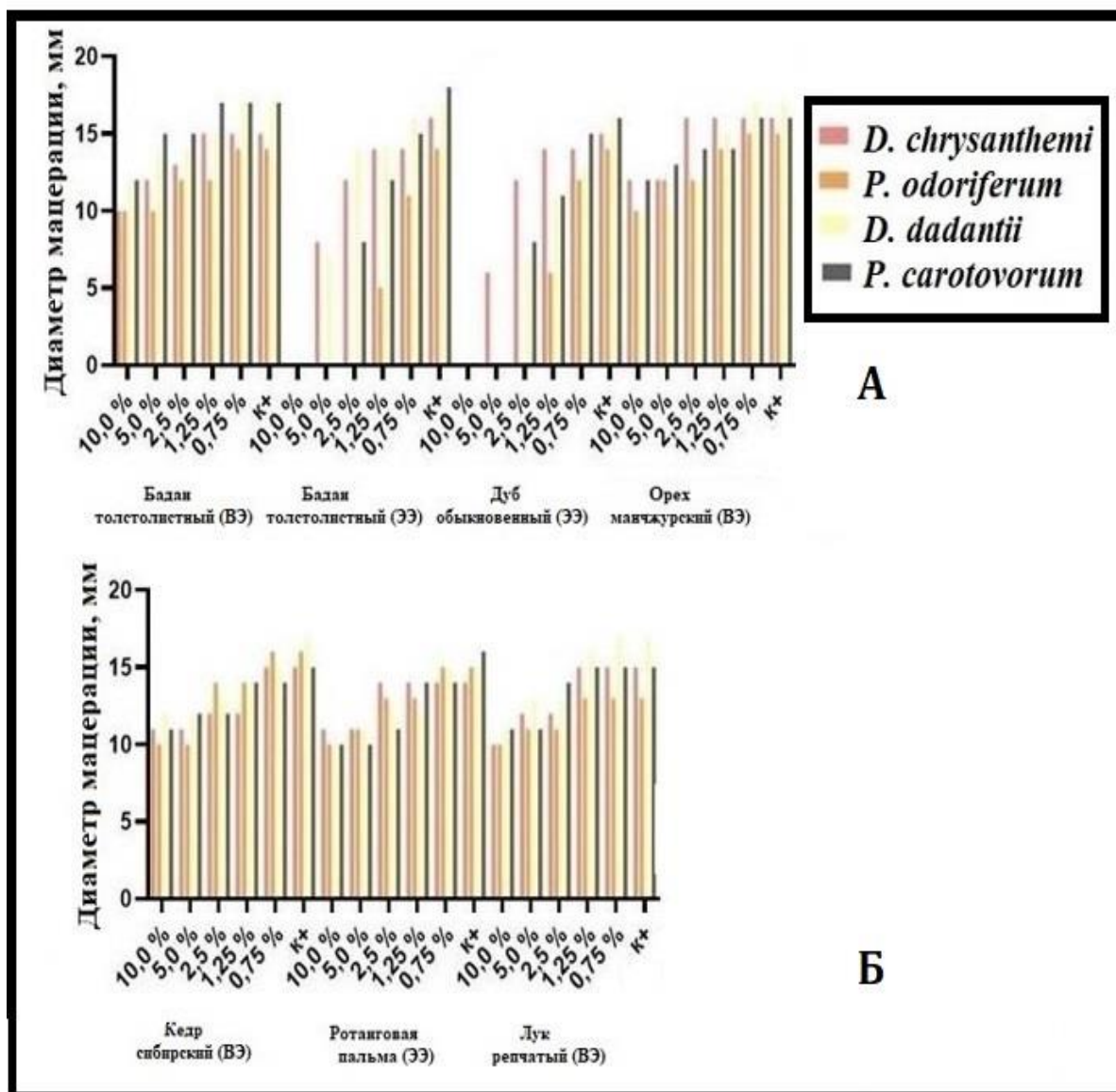


Рисунок 28. Значения диаметров зон мацерации ломтиков картофеля при оценке антибактериальной активности растительных экстрактов против возбудителей черной ножки методом инокуляции ломтиков аликвотами разведений культуры бактерий в смеси жидкой питательной среды с растительными экстрактами, мм (А, Б – результаты исследований с применением различных водных (ВЭ) и этанольных (ЭЭ) растительных экстрактов)

Значения МБК растительных экстрактов подтверждали данные, полученные в результате оценки мацерации ломтиков картофеля и представленные на Рисунке 28. Так, для тех экстрактов, чьи значения МБК были определены, мацерация на ломтиках отсутствовала вплоть до достижения значений МИК. Например, для штамма *P. odoriferum* значения МБК экстракта бадана толстолистного и МБК экстракта дуба обыкновенного составляли 25 мг/мл, а при инокулировании

ломтиков картофеля аликвотами смеси культуры бактерий с экстрактами, в соответствующих концентрациях, зоны мацерации отсутствовали (Рисунок 29). Таким образом, мацерация на ломтиках начинает проявляться лишь с концентраций экстрактов, соответствующих значениям МИК, что подтверждает объективность значений МБК экстрактов.

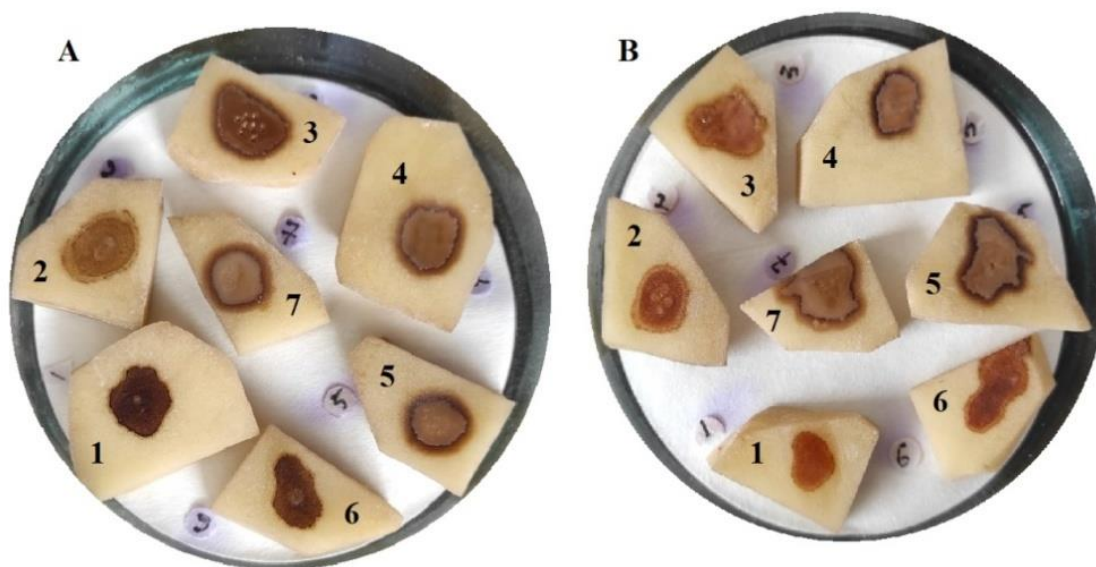


Рисунок 29. Оценка антибактериальной активности экстрактов растений по отношению к возбудителям черной ножки картофеля путем оценки мацерации на ломтиках картофеля, инокулированных аликвотами разведений культуры бактерий в жидкой питательной среде с добавлением растительных экстрактов (А - экстракт дуба обыкновенного + суспензия *P. carotovorum*; Б - экстракт бадана толстолистного + суспензия *P. carotovorum*; 1-5 - концентрации растительных экстрактов от 10,0 до 0,625 %; 6 - контроль без добавления суспензии бактерий; 7 - контроль без растительного экстракта)

Были проведены эксперименты по *оценке профилактического и лечебного действия эфирных масел и растительных экстрактов* против развития черной ножки на клубнях картофеля.

При профилактическом применении эфирных масел против используемых патогенных штаммов была достигнута 100 %-ная биологическая эффективность при использовании эфирного масла душицы обыкновенной в диапазоне концентраций 60-100 мг/мл, эфирного масла коричника китайского в концентрации 40 мг/мл и эфирного масла гвоздичного дерева в концентрации 100 мг/мл (против *P. odoriferum* и *D. dadantii*) (Рисунок 30). При концентрации масла в 10 мг/мл

биологическая эффективность (БЭ) варьировала в основном в диапазоне от 17,6 до 36,5 % (для масел душицы обыкновенной и коричника китайского). Минимальные значения БЭ были отмечены при применении эфирного масла гвоздичного дерева против штаммов *D. chrysanthemi* и *P. odoriferum* и составили 3,1 и 1,6% соответственно.

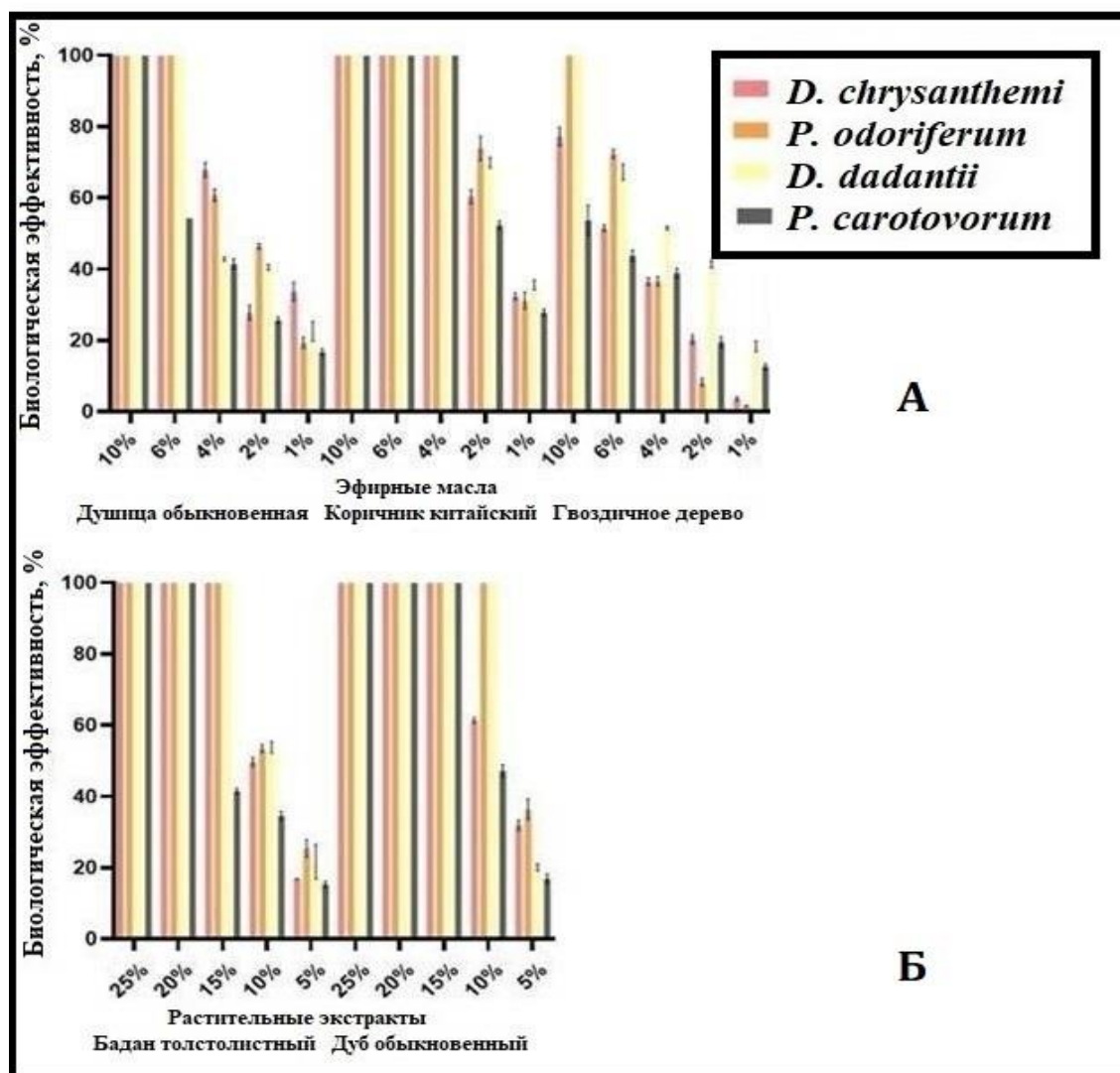


Рисунок 30. Биологическая эффективность в защите клубней от черной ножки при профилактической обработке эфирными маслами и экстрактами, % (А – результаты исследований при применении эфирных масел; Б – результаты исследований при применении растительных экстрактов)

При профилактическом использовании растительных экстрактов на клубнях, обработанных экстрактом бадана толстолистного в диапазоне концентрации 150–200 мг/мл и экстрактом дуба обыкновенного в концентрации 100–150 мг/мл, также

была достигнута 100 %-ная биологическая эффективность. При снижении концентраций экстрактов до минимальной используемой концентрации в 50 мг/мл значения БЭ при профилактическом применении варьировали от 14,3 до 35,8 % (Рисунок 30).

100%-ная биологическая эффективность не была достигнута при лечебном применении растительных экстрактов. Значения БЭ варьировали в диапазоне от 40,2 до 71,3% при концентрации экстрактов 200 мг/мл, когда первое значение отмечено по отношению к *P. carotovorum* с обработкой экстрактом бадана толстолистного, а второе значение - к *D. chrysanthemi* при обработке экстрактом дуба обыкновенного (Рисунок 31).

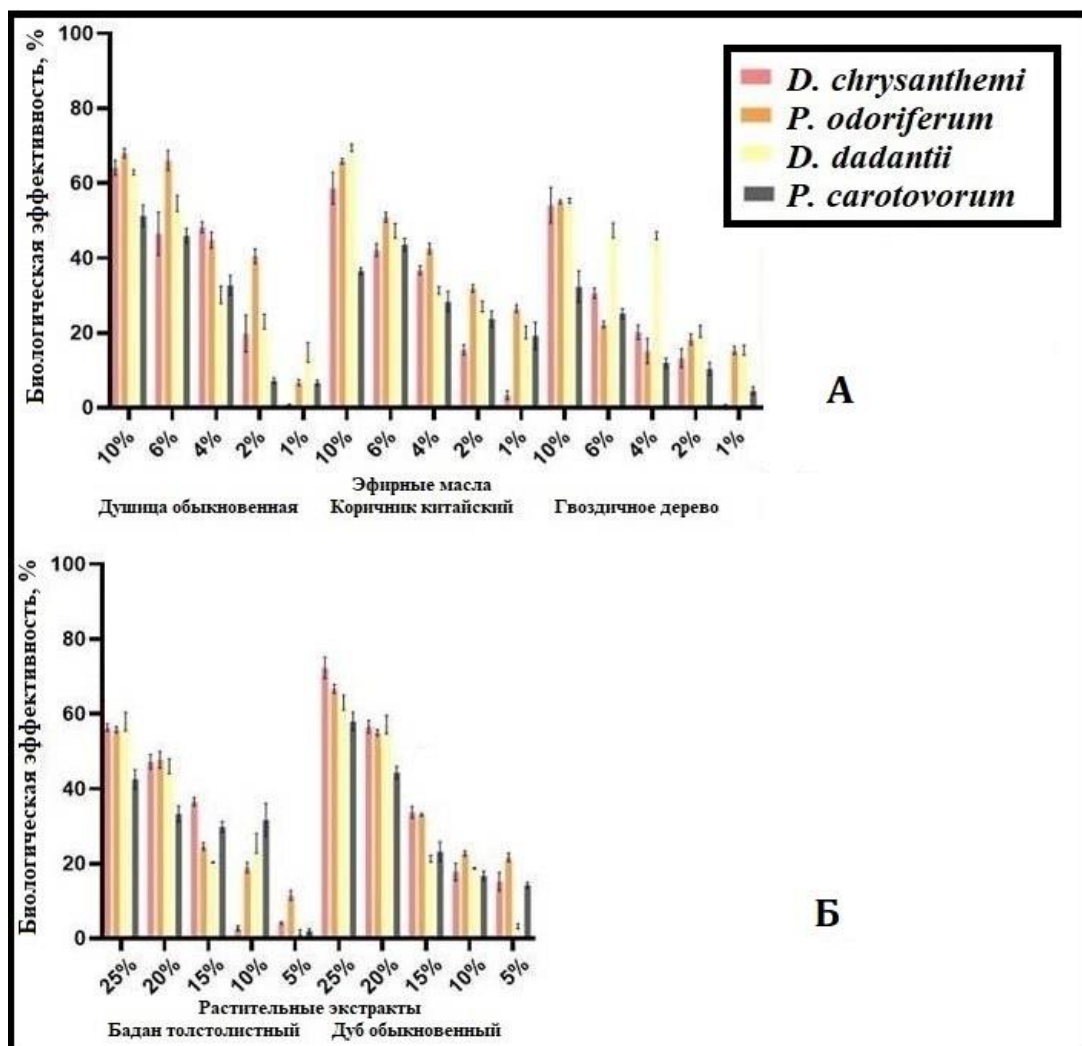


Рисунок 31. Биологическая эффективность от применения обработки эфирными маслами и экстрактами клубней картофеля, предварительно инокулированных возбудителями черной ножки, % (А – результаты исследований при применении эфирных масел; Б – результаты исследований при применении растительных экстрактов)

При использовании растительных экстрактов в концентрации 50 мг/мл биологическая эффективность варьировала от 1,1% для экстракта бадана толстолистного против *P. carotovorum* и до 22,4% - для экстракта дуба обыкновенного против *P. odoriferum* (Рисунок 31).

Биологическая эффективность при лечебном применении эфирных масел оказалась значительно ниже, чем при профилактической обработке. При максимальных из исследуемых концентраций масел биологическая эффективность варьировала в диапазоне от 35,6 до 69,9 %, когда первое значение отмечено по отношению к *P. carotovorum* с обработкой эфирным маслом гвоздичного дерева, а второе значение - к *D. dadantii* в сочетании с обработкой эфирным маслом коричника китайского (Рисунок 31). При снижении концентрации эфирных масел до 10 мг/мл биологическая эффективность варьировала от 0,8 % для *D. chrysanthemi* и обработки эфирным маслом гвоздичного дерева - до 26,9% для *P. odoriferum* с применением эфирного масла коричника китайского.

На обработанных эфирными маслами и растительными экстрактами клубнях наблюдали значительное снижение глубины мацерации по сравнению с необработанными образцами (Рисунок 32).

В вариантах, показавших 100 %-ную биологическую эффективность при профилактической обработке, не отмечалась мацерация. Дальнейшее же снижение концентрации эфирных масел и экстрактов приводило к увеличению глубины проникновения патогена в клубни. Однако даже при концентрации масла 10 мг/мл глубина проникновения мацерации на обработанных клубнях была ниже, чем в контрольном варианте. Например, минимальное значение глубины мацерации (P) при использовании эфирных масел в концентрации 10 мг/мл было зафиксировано против *P. odoriferum* при предварительной обработке маслом коричника китайского и составило лишь 7,2 мм против 14,5 мм в контроле. При снижении концентрации растительных экстрактов до 50 мг/мл значения глубины мацерации варьировали от 7,5 мм для *P. odoriferum* с применением экстракта дуба обыкновенного против 14,5 мм в контроле до 16,0 мм для *D. chrysanthemi* с обработкой экстрактом бадана толстолистного против 19,2 мм в контроле.



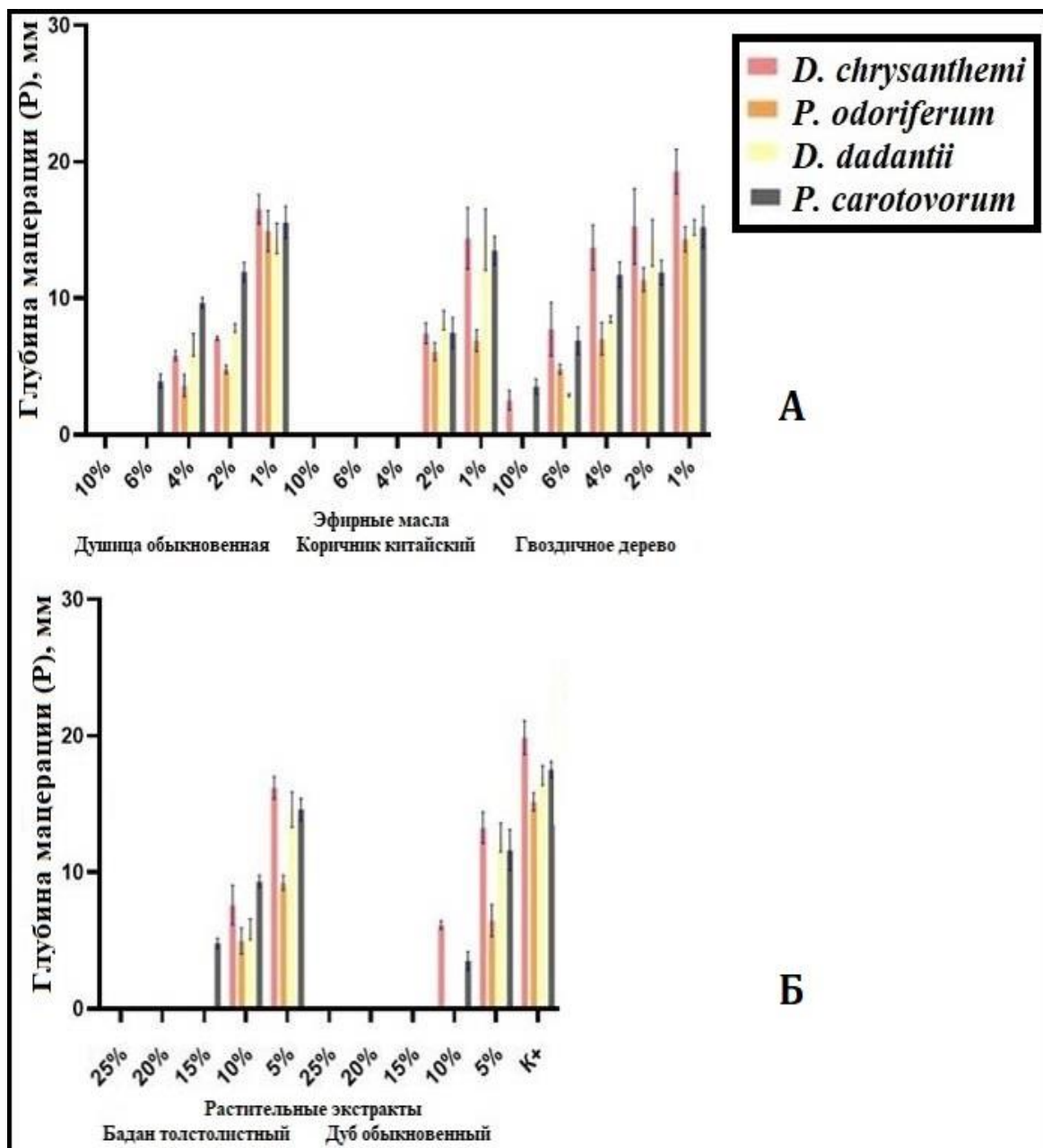


Рисунок 32. Влияние предварительной обработки эфирными маслами и экстрактами на глубину мацерации клубней картофеля, инокулированных возбудителями черной ножки, мм (А – результаты исследований при применении эфирных масел; Б – результаты исследований при применении растительных экстрактов)

В тесте по оценке лечебного действия глубина мацерации клубня при применении эфирных масел и экстрактов при их максимальных из исследуемых концентрациях варьировала от 1,6 до 6,2 мм по сравнению с 17,1–20,4 мм в контрольном варианте, что несколько хуже результатов, полученных при профилактическом действии эфирных масел (Рисунок 33). Минимальное значение

глубины мацерации при обработке эфирными маслами в концентрации 10 мг/мл было зафиксировано на варианте с обработкой маслом коричника китайского против *P. odoriferum* и составило 11,4 мм. Среди экстрактов в концентрации 50 мг/мл диапазон значений *P* варьировал от 11,3 мм для *P. odoriferum* в варианте с обработкой экстрактом дуба обыкновенного до 18,9 мм для *D. chrysanthemi* с обработкой экстрактом бадана толстолистного, что также оказалось ниже соответствующих значений в контроле.

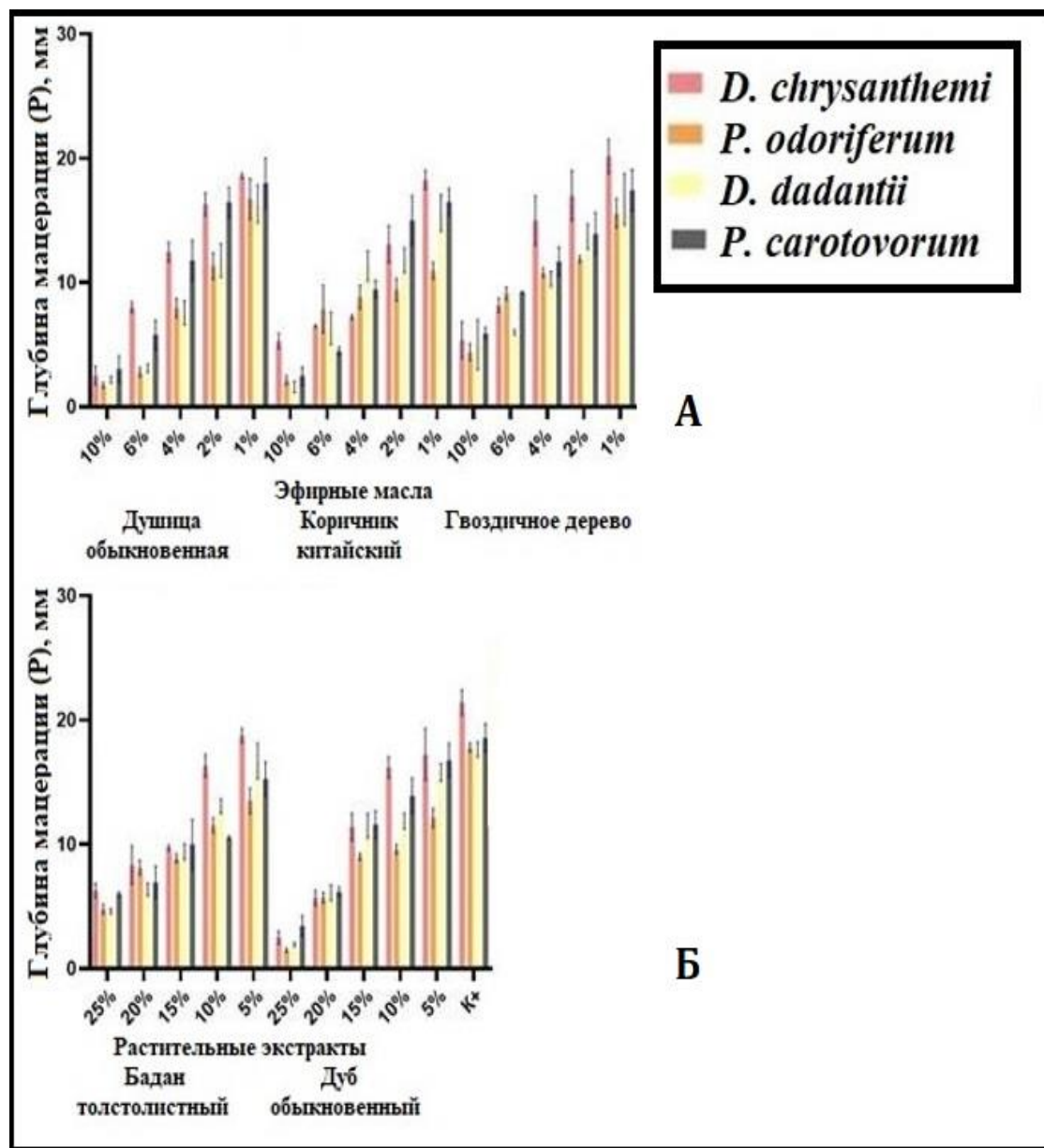


Рисунок 33. Влияние предварительной обработки эфирными маслами и экстрактами на глубину мацерации клубней картофеля, предварительно инокулированных возбудителями черной ножки, мм (А – результаты исследований при применении эфирных масел; Б – результаты исследований при применении растительных экстрактов)

Согласно результатам оценки эффективности применения эфирных масел и экстрактов растений в защите картофеля в период хранения, наилучшие результаты со 100%-ной биологической эффективностью были достигнуты при применении эфирных масел душицы обыкновенной в концентрации 40-60 мг/мл, коричника китайского 20-40 мг/мл и гвоздичного дерева 60-100 мг/мл (для штаммов *P. odoriferum* и *D. dadantii*) (Рисунок 34).

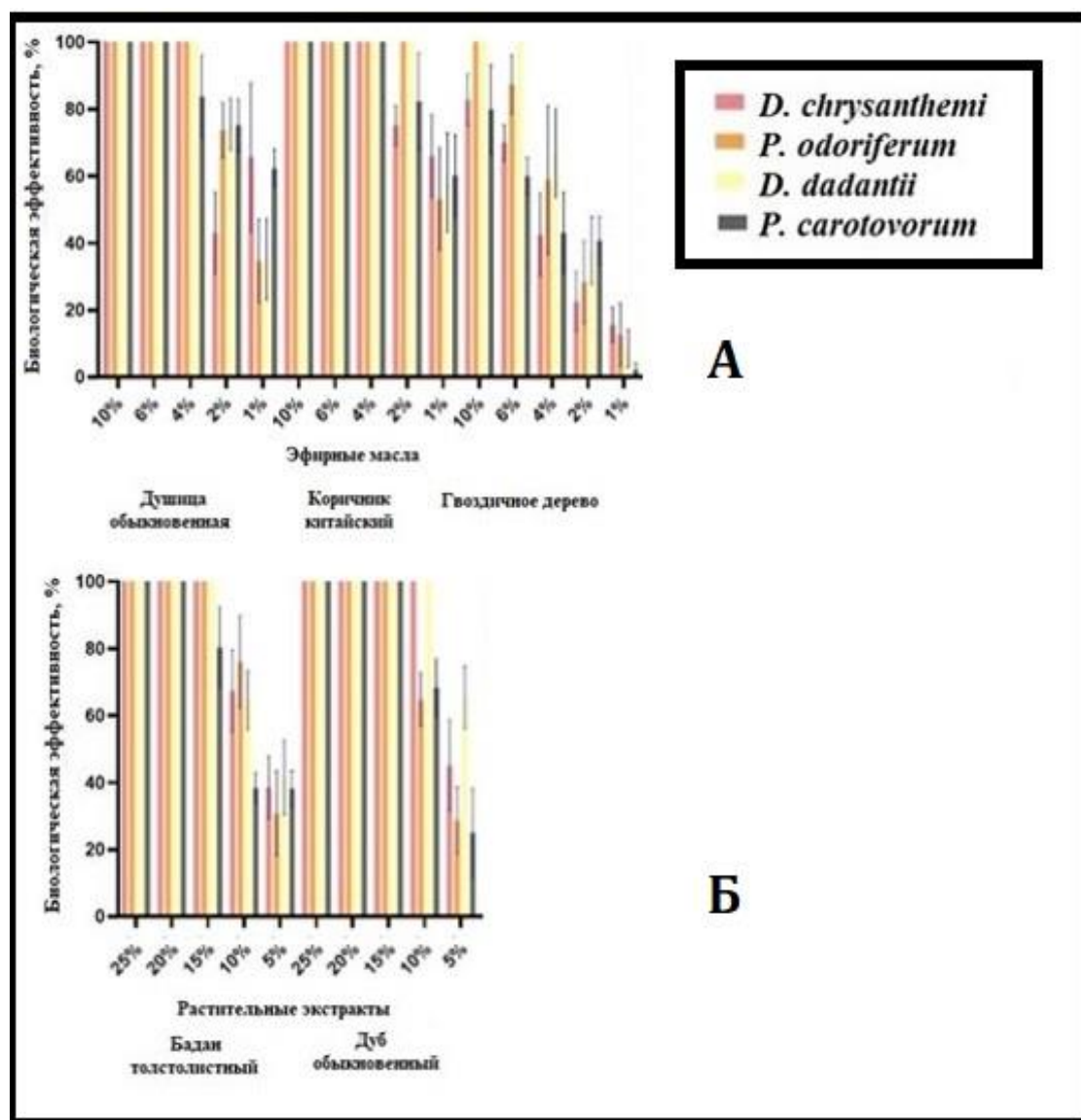


Рисунок 34. Влияние предварительной обработки эфирными маслами и экстрактами растений на снижение заболеваемости клубня, инокулированного возбудителями черной ножки картофеля при закладке на хранение (А – результаты исследований при применении эфирных масел; Б – результаты исследований при применении растительных экстрактов)

Среди растительных экстрактов 100%-ная биологическая эффективность была отмечена при применении экстракта бадана толстолистного в концентрации 150–200 мг/мл и дуба обыкновенного в концентрации 100–150 мг/мл (Рисунок 34). Уменьшение используемых концентраций антибактериальных агентов также влекло за собой снижение биологической эффективности. Например, при использовании эфирного масла душицы обыкновенной в количестве 10 мг/мл, значения БЭ варьировали от 34,6 до 65,6%, а при применении эфирного масла коричника китайского в той же концентрации - от 53,1 до 65,9%. Минимальное снижение заболеваемости наблюдалось при применении эфирного масла гвоздичного дерева и колебалось от 2,1 до 15,6% в зависимости от используемого штамма. При применении экстрактов в концентрации 50 мг/мл снижение заболеваемости варьировало в диапазоне от 30,8 до 41,4% для экстракта бадана толстолистного и от 25,0 до 65,3% для экстракта дуба обыкновенного.

Помимо снижения заболеваемости на клубнях, обработанных эфирными маслами и экстрактами растений также наблюдалось значительное снижение процента потери массы клубня (L), по сравнению с необработанными контрольными образцами (Рисунок 35).

Максимальная потеря массы при обработке эфирным маслом душицы обыкновенной составляла 38,3% для штамма *D. dadantii* при концентрации масла 10 мг/мл, против 57,9% в контроле. А при применении эфирного масла коричника китайского в аналогичной концентрации потеря массы клубня была отмечена как ещё более низкая и составляла 27,3% по сравнению с 52,8% в необработанном контроле. Максимальные значения потери массы клубня среди обработанных вариантов отмечались при применении эфирного масла гвоздичного дерева в концентрации 10 мг/мл и варьировали в диапазоне от 46,1% для штамма *P. odoriferum* до 66,4% для штамма *D. chrysanthemi*. Тем не менее, процент потери массы клубня контрольных вариантов, обработанных суспензиями данных патогенов, был выше и составлял 52,8 и 66,7%, соответственно. При обработке клубней картофеля растительным экстрактом бадана толстолистного и коры дуба в концентрациях 50 мг/мл в варианте, обработанном суспензией штамма *P.*

*carotovorum*, максимальная потеря массы составляла 65,9 и 56,7 %, соответственно, против контрольного варианта с 66,3%.

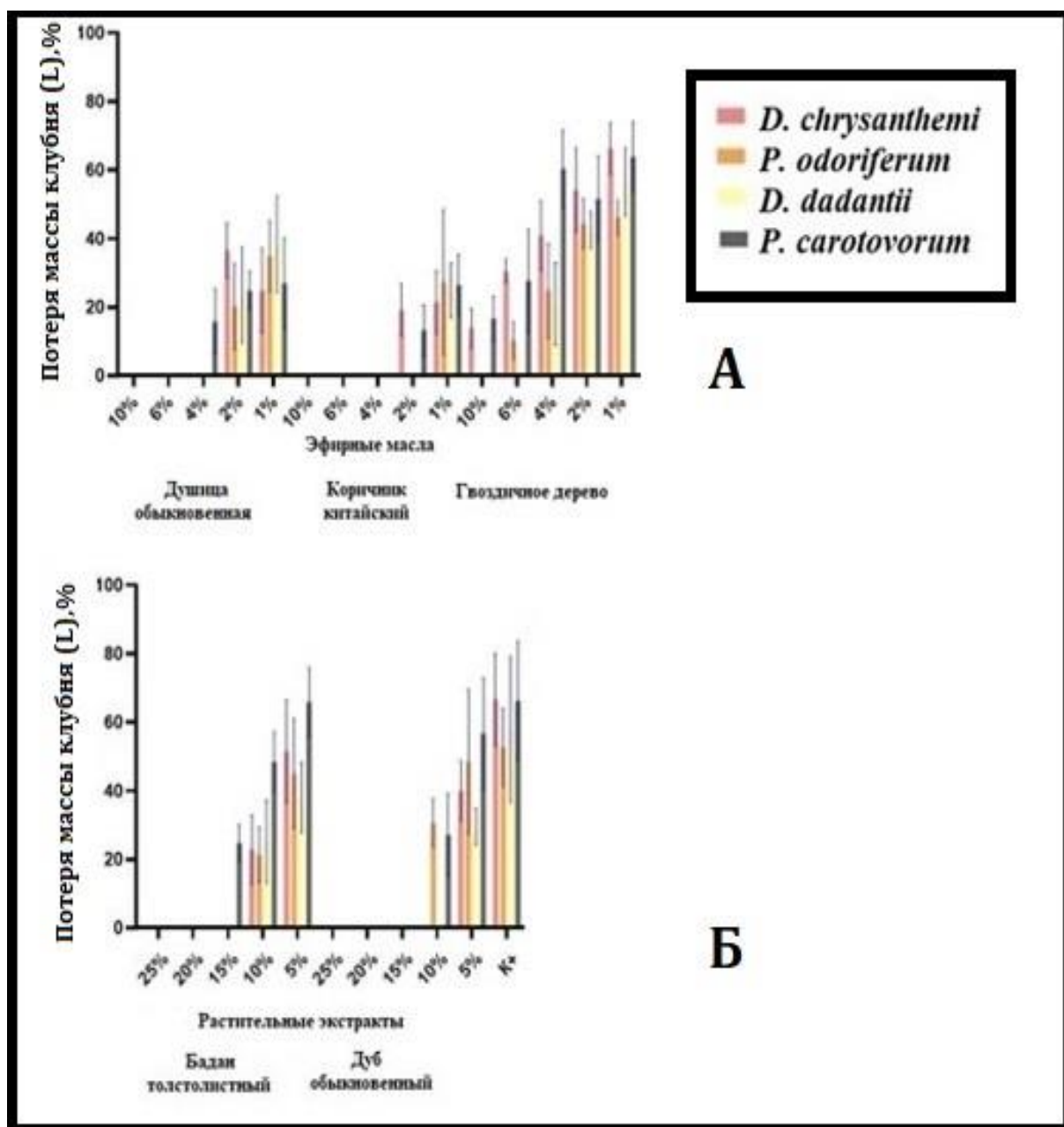


Рисунок 35. Влияние предварительной обработки эфирными маслами и экстрактами растений на степень развития мацерации клубня, инокулированного возбудителями черной ножки картофеля при закладке на хранение (А – результаты исследований при применении эфирных масел; Б – результаты исследований при применении растительных экстрактов)

В результате оценки защитного действия эфирных масел и экстрактов при инокуляции патогенами в сегменты стеблей картофеля было отмечено, что предварительная обработка стеблей эфирными маслами душицы обыкновенной в

концентрации 60-100 мг/мл, коричника китайского в концентрации 40-60 мг/мл и гвоздичного дерева в 60-100 мг/мл (для штаммов *P. odoriferum* и *D. dadantii*) позволяют снизить протяженность мацерированного участка со 100%-ной мацерации в контроле до полного ее отсутствия в описанных вариантах обработки (Рисунок 36, 37).

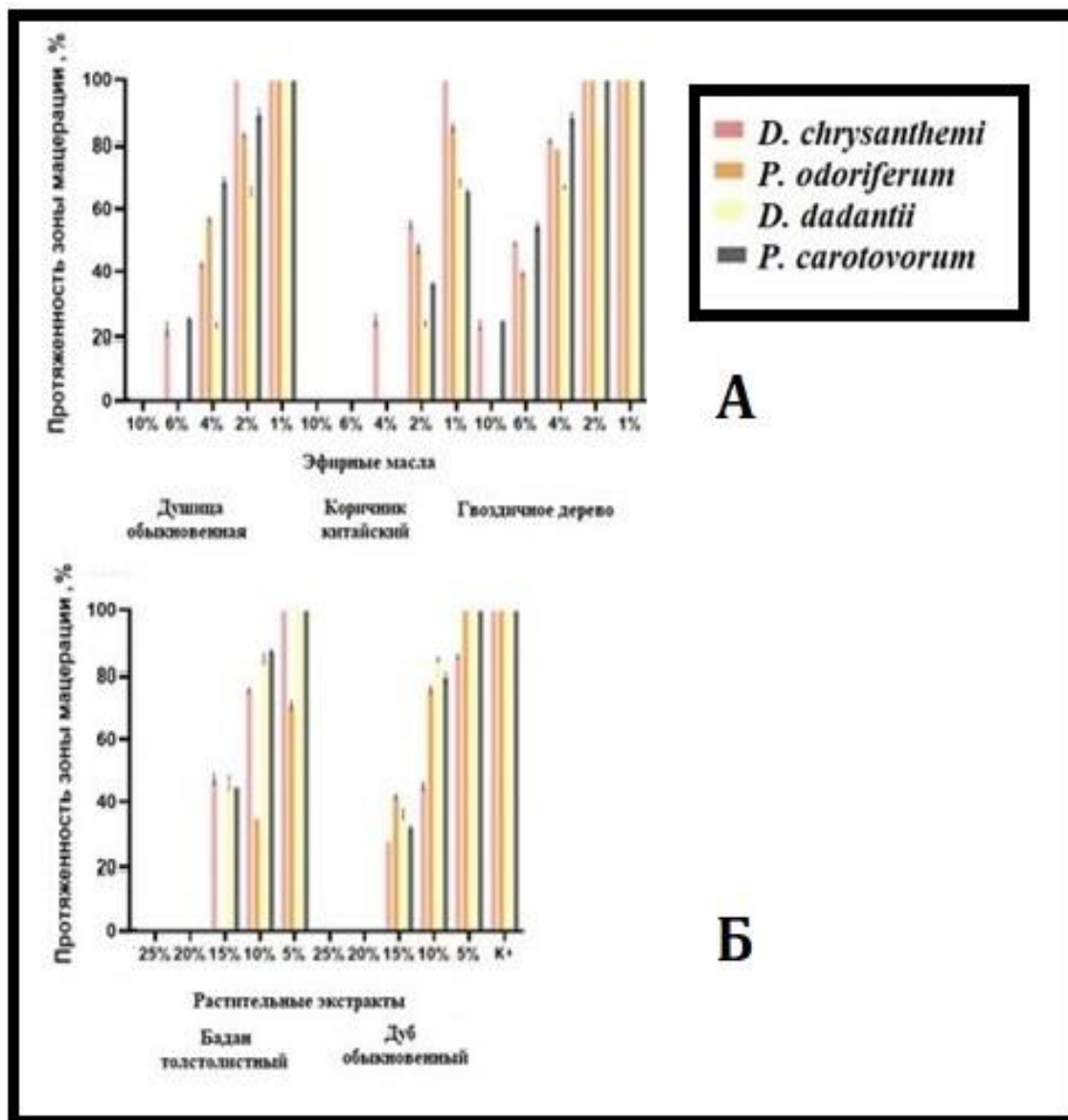


Рисунок 36. Результаты оценки антибактериальной активности эфирных масел и экстрактов растений по отношению к возбудителям черной ножки картофеля, путем фиксирования протяженности мацерации стеблей картофеля при предварительной обработке (А – результаты исследований при применении эфирных масел; Б – результаты исследований при применении растительных экстрактов)

Для штаммов *D. chrysanthemi* и *P. carotovorum* максимальное снижение мацерации при применении эфирного масла гвоздичного дерева зафиксировано при концентрации 100 мг/мл и составила 76,5 и 75,0%, соответственно. Снижение же концентрации эфирных масел до 10 мг/мл отмечается полным отсутствием защитного эффекта и развитием мацерации соразмерно контролю, за исключением варианта с применением масла коричника китайского, при обработке которым наблюдается снижение процента мацерации стебля до 85,4, 68,0 и 65,3% по отношению к штаммам *P. odoriferum*, *D. dadantii*, *P. carotovorum*, соответственно. По отношению к штамму *D. chrysanthemi* снижение концентрации эфирного масла коричника китайского до 10 мг/мл приводит к 100%-ному развитию мацерации на стебле картофеля.



Рисунок 37. Оценка мацерации стебля картофеля, предварительно обработанного эфирным маслом гвоздичного дерева в различных концентрациях, с последующей инокуляцией штаммом возбудителя черной ножки картофеля *P. odoriferum* (1 – концентрация эфирного масла 20 мг/мл; 2 - концентрация эфирного масла 40 мг/мл; 3 - концентрация эфирного масла 60 мг/мл; 4 - концентрация эфирного масла 100 мг/мл)

Предварительная обработка стеблей картофеля экстрактами в концентрации 200–250 мг/мл позволила полностью исключить развитие мацерации (Рисунок 36). Снижение концентрации экстракта бадана толстолистного до 50 мг/мл с последующей инокуляцией штаммом *P. odoriferum* привело к снижению

мацерации стебля на 29,5% по сравнению с контролем. Однако по отношению к трем остальным изолятам данная концентрация экстракта оказалась неэффективна, и мацерация стеблей достигла 100%. Применение экстракта дуба обыкновенного в концентрации 50 мг/мл по отношению ко всем изолятам, кроме варианта инокулированного штаммом *D. chrysanthemi*, в котором процент мацерации снизился на 14,3% по сравнению с контролем, также было отмечено как неэффективное, а процент мацерации обработанных стеблей был равен проценту в контрольном варианте без обработки.

При анализе степени влияния эфирных масел и экстрактов растений на эпифитную популяцию возбудителей черной ножки с применением метода отпечатков листьев было определено, что применение эфирных масел душицы обыкновенной в концентрации 100 мг/мл способно полностью исключить рост популяции штаммов *P. odoriferum* и *D. dadantii*, а применение эфирного масла коричника китайского в аналогичной концентрации помимо вышеописанных штаммов, предотвращает рост штамма *D. chrysanthemi* (Рисунок 38). Аналогичные результаты отмечали при применении растительного экстракта дуба обыкновенного в концентрации 250 мг/мл по отношению ко всем используемым патогенным штаммам. При исследовании действия экстракта бадана толстолистного полное отсутствие роста бактериальных колоний было только у штамма *D. dadantii* при применении экстракта в концентрации 250 мг/мл. Минимальная по сравнению с контролем площадь покрытия листа при применении масла в концентрации 10 мг/мл была отмечена при использовании эфирного масла коричника китайского и варьировала от 65,6 до 85,4%, что на 8,0–29,5% ниже значений в контрольном варианте. Использование экстракта дуба обыкновенного в концентрации 50 мг/мл способствовало снижению площади покрытия бактериальными колониями на 3,1–18,3% по сравнению с контролем.



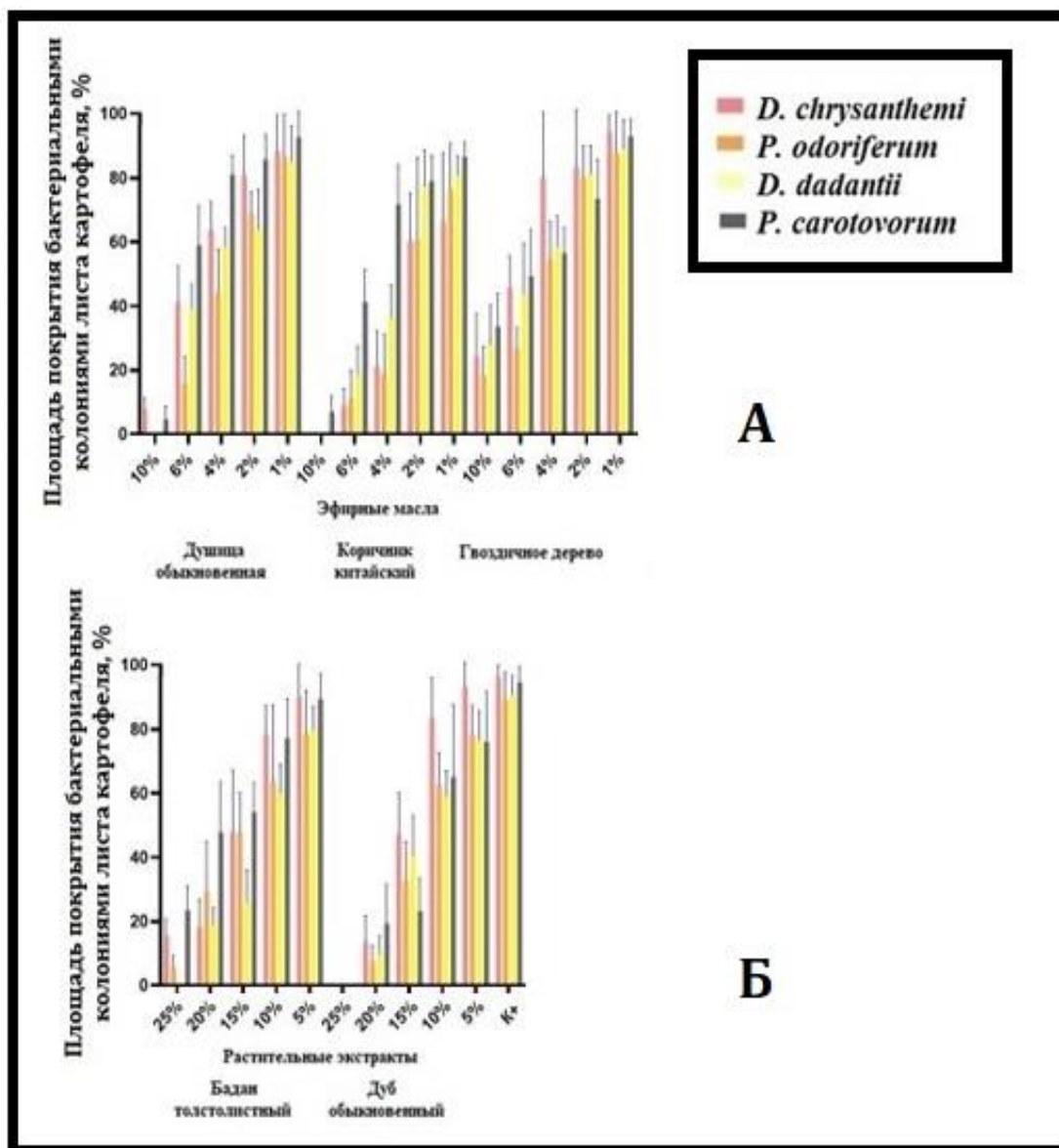


Рисунок 38. Результаты оценки антибактериальной активности эфирных масел и экстрактов растений по отношению к эпифитной популяции возбудителей черной ножки картофеля при защитной обработке по листу (А – результаты исследований при применении эфирных масел; Б – результаты исследований при применении растительных экстрактов)

При качественном и количественном анализе образцов эфирных масел и растительных экстрактов с помощью ГХ-МС и ГХ-ПИД, соответственно, было идентифицировано 24 вещества в составе эфирного масла орегано обыкновенного, 18 - в составе эфирного масла коричника китайского, 16 - в составе эфирного масла гвоздичного дерева, 22 - в составе экстракта бадана толстолистного и 28 - в составе экстракта дуба обыкновенного. Компоненты, преобладающие в составе эфирных масел и экстрактов растений, представлены на Рисунке 39.

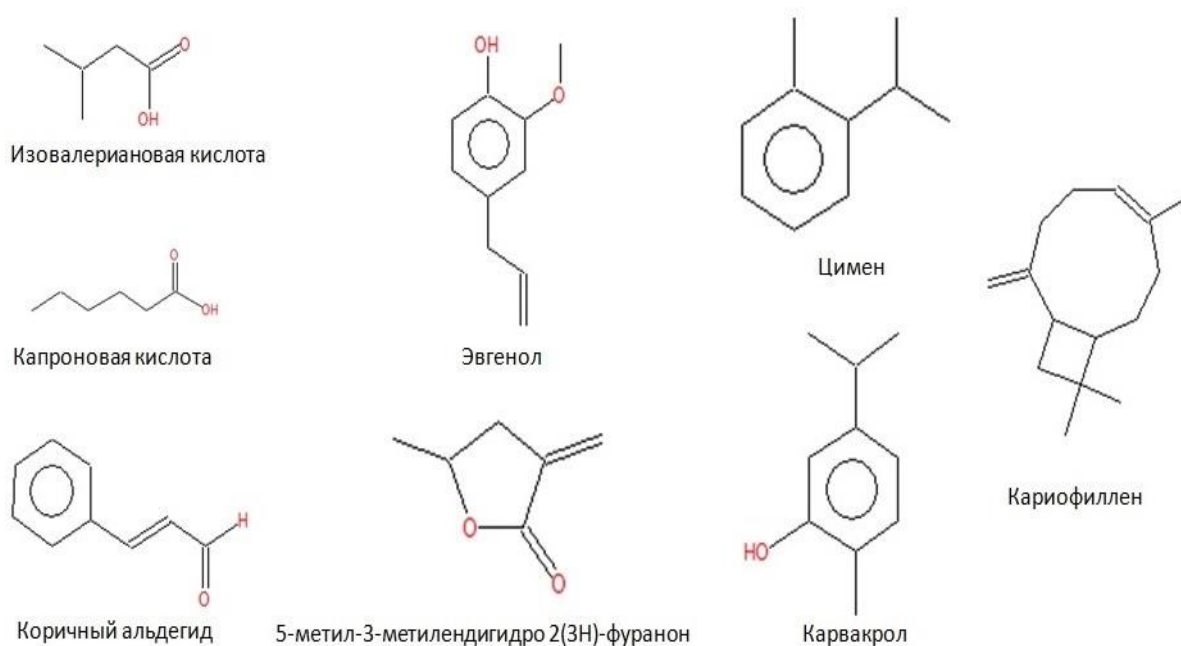


Рисунок 39. Структурные формулы основных соединений, содержащихся в исследуемых эфирных маслах и растительных экстрактах

Для эфирного масла орегано обыкновенного преобладающими компонентами в составе являлись карвакрол (62,32%) и цимен (19,85%), затем гамма-терпинен (4,85%), тимол (3,52%), линалоол (2,53%) и альфа-фенхен (1,65%). В составе эфирного масла коричника китайского в качестве основного компонента был определен коричный альдегид (84,25%), за ним следовали о-метоксикоричный альдегид (6,91%), диметил ацеталь коричного альдегида (3,36%) и циннамил ацетат (2,37%). Для эфирного масла гвоздичного дерева преобладающими в составе веществами являлись эвгенол (76,98%) и кариофиллен (14,91%), а также были обнаружены ацетат эвгенола (2,97%) и хумулен (1,69%). В случае с растительными экстрактами химический состав был более разнородным, так как не наблюдалось явного преобладания какого-то одного или двух компонентов. В составе экстракта бадана толстолистного присутствовали такие вещества как уксусная кислота (27,85%), 5-метил-3-метилендигидро 2(3Н)-фуранон (20,32%) и эвгенол (10,94%), далее следовала капроновая кислота (6,91%), метил салицилат (5,22%), пулегон (4,46%) и тимол (3,32%). В экстракте коры дуба большую часть всех веществ в составе представляли различные кислоты, такие как капроновая (28,52%),

изовалериановая (28,31%) и уксусная (21,88%), после них следовали 3-метилвалериановая (2,19%), пропионовая (2,18%), 2-метилмасляная (1,89%) и валериановая (1,77%) кислоты. Остальные компоненты эфирных масел и растительных экстрактов находились в минимальных количествах, составляющих менее 2% от общего состава образцов.

### **3.6. Использование бактериофагов в защите картофеля от возбудителей мягкой гнили**

Одной из перспективных стратегий защиты растений, активно развивающейся в настоящее время, является применение препаратов на основе бактериофагов для обработки сельскохозяйственных культур. При этом недавние исследования выявили потенциал использования литических бактериофагов в качестве средства борьбы с болезнями растений, вызываемыми возбудителями мягкой гнили (Buttimer et al., 2018). Однако, несмотря на успешные опыты по профилактике и борьбе с мягкой гнилью клубней с применением бактериофагов активных по отношению к *Pectobacterium* и *Dickeya* в экспериментах *in vitro*, *in planta* (Czajkowski et al., 2017) и в полевых условиях (Adriaenssens et al., 2012; Voronina et al., 2019b) существует ряд сложностей, ограничивающих массовое производство препаратов на основе бактериофагов. К таким факторам относятся уровни бактериальных популяций и концентрации бактериофаговых вирионов в месте нанесения препарата (Abedon et al., 2017), температура, pH ризосферы, влажность, содержание органических веществ в почве (Czajkowski et al., 2017) или возможность появления устойчивых к фагам бактериальных мутантов, например, возникающих из-за модификаций фаговых рецепторов или развития нескольких механизмов защиты бактерий (Svircev et al., 2018), что требует проведения дополнительных исследований.

В данном разделе представлен анализ специфичности бактериофагов *Pectobacterium* и *Dickeya* и оценена эффективность их применения в защите картофеля от мягкой гнили.

Для первичного скрининга видоспецифичности бактериофагов была проведена оценка литической способности 10 бактериофагов по отношению к 24 штаммам 7 наиболее распространенных видов возбудителей черной ножки и мягкой гнили на картофеле (Таблица 16).

Таблица 16. Спектр литической активности бактериофагов в отношении штаммов представителей родов *Pectobacterium* и *Dickeya*

Род, вид патогена	Номер штамма в коллекции	PP16	PP35	PP47	PP74	PP99	PP101	Q19	Q50	Q51	160 Arno
<i>P. atrosepticum</i>	F004	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
	F041	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F048	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. brasiliense</i>	F126	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
	F152	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
	F157	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. carotovorum</i>	F118	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
	F160	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>P. parmentieri</i>	F148	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	F149	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>P. versatile</i>	F002	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
	F018	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-
	F022	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
	F135	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>D. diantocola</i>	F072	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	D8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>D. solani</i>	F012	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	F043	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	F082	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	F102	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fil	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «+» - лизис бактериальных клеток, «-» - отсутствие лизиса бактериальных клеток.

По результатам проведенной оценки было установлено, что штаммы видов *P. versatile* и *P. brasiliense* являются самыми восприимчивыми в пределах рода *Pectobacterium*, от 5 до 8 бактериофагов вирулентны к ним, при этом только бактериофаг Q51 способен поражать все 7 штаммов данных видов. Штаммы же рода *Dickeya* наименее восприимчивы к представленным фагам, при этом бактериофаг PP35 активен по отношению сразу к 3 штаммам *D. solani* и не поражает другие виды, в то время как бактериофаг Q51 поражает один из штаммов *D. dianticola*, а также ещё 4 из 5 представленных видов *Pectobacterium*, за исключением 2 штаммов *P. parmentieri*, которые способен поражать бактериофаг PP74.

Для оценки эффективности применения бактериофагов в защите клубней картофеля от мягкой гнили сравнивали диаметры мацерации на ломтиках и клубнях картофеля, предварительно обработанных бактериофагом Q51 с последующей инокуляцией возбудителями (Таблица 17).

Таблица 17. Влияние предварительной обработки бактериофагом Q51 на мацерацию ломтиков и клубней картофеля, инокулированных возбудителями черной ножки и мягкой гнили

Варианты опыта		Диаметр мацерации, см (среднее значение ± стандартное отклонение)				
Количество бактериальной суспензии, мкл	Количество фильтрата фага, мкл	<i>P. atrosepticum</i> F004	<i>P. brasiliense</i> F126	<i>P. carotovorum</i> F118	<i>P. versatile</i> F022	<i>D. dianticola</i> F072
Опыт на ломтиках						
5	0	4,3 ± 1,8	2,0 ± 0,7	3,2 ± 1,3	2,9 ± 0,8	3,5 ± 1,0
5	10	4,0 ± 0,9	1,5 ± 0,3	1,9 ± 0,7	2,0 ± 1,3	3,0 ± 0,7
5	20	2,6 ± 1,4	1,0 ± 0,5	1,5 ± 0,9	1,1 ± 0,4	1,4 ± 0,4
Опыт на клубнях						
50	0	4,6 ± 1,0	1,5 ± 0,3	3,8 ± 1,1	2,7 ± 1,3	3,4 ± 0,7
50	100	3,0 ± 1,2	0,8 ± 0,4	2,4 ± 0,3	1,3 ± 0,8	1,7 ± 0,4
50	200	1,2 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,3

По итогам эксперимента не удалось добиться полного отсутствия мацерации на ломтиках картофеля, однако, было зафиксировано снижение диаметра мацерации на вариантах с использованием фагов (Рисунок 40) по сравнению с вариантами без обработки на 39,5–62,1% при соотношении бактерия/фаг 1:4 и на 7,0–40,6% - при соотношении 1:2.

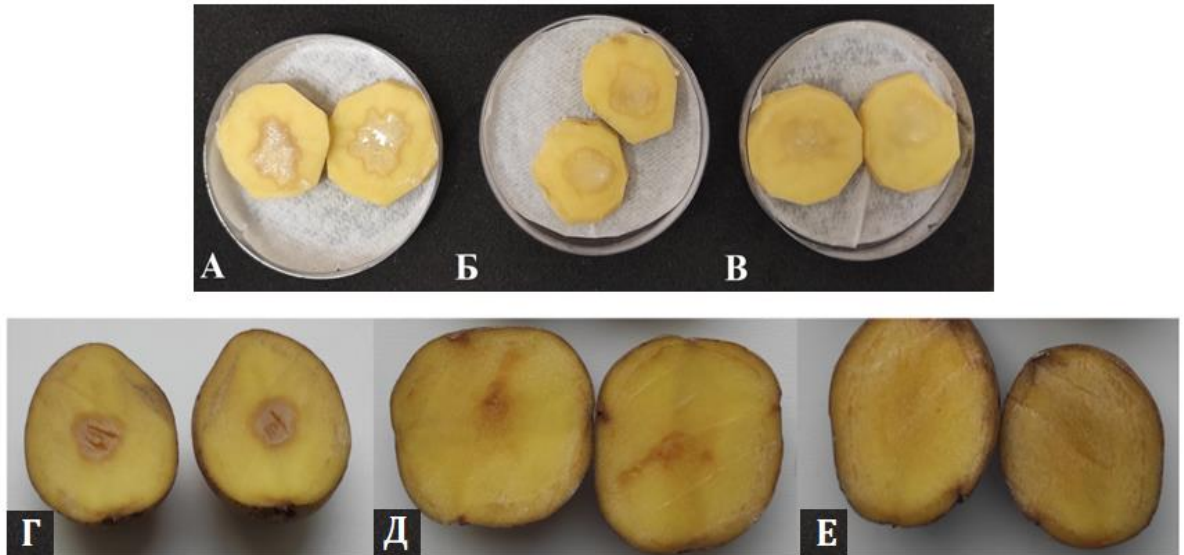


Рисунок 40. Симптомы мягкой гнили на ломтиках/клубнях картофеля, инокулированных штаммом *P. brasiliense* F126 (А, Г - положительный контроль, Б - 10 мкл фильтрата фага + 5 мкл бактериальной суспензии, В - 20 мкл фильтрата фага + 5 мкл бактериальной суспензии, Д - 100 мкл фильтрата фага + 50 мкл бактериальной суспензии, Е - 200 мкл фильтрата фага + 50 мкл бактериальной суспензии)

За счет применения бактериофагов в экспериментах на клубнях картофеля удалось добиться снижения диаметра мацерации до нуля в вариантах с инокуляцией штаммами *P. brasiliense* F126 и *P. versatile* F022, при применении бактериофага в соотношении бактерия/фаг 1:4 и на 34,8–51,8% в среднем по штаммам - при соотношении 1:2.

### **3.7. Оценка устойчивости сортов картофеля к возбудителям черной ножки и мягкой гнили**

Защита картофеля от бактериозов складывается из большого числа различных методов и приемов, необходимых для защиты культуры на всех этапах её производства, большая часть которых имеет профилактическую направленность

(Лазарев, Борисова, 2010). Тем не менее, одним из наиболее перспективных направлений защиты является селекция сортов на устойчивость к бактериальным фитопатогенам, складывающаяся из совокупной оценки на клубневую и стеблевую устойчивость/восприимчивость сортов (Васильева и др., 2024б).

В рамках данного раздела проводили скрининг сортов картофеля, выращиваемых на территории РФ, на комплексную устойчивость к черной ножке картофеля и мягкой гнили клубней с целью выявления наиболее перспективных для селекции сортов.

По результатам *клубневой оценки сортов картофеля на устойчивость к мягкой гнили* был произведен расчета динамики мацерации на инокулированных ломтиках картофеля (Рисунок 41), согласно которому отмечалось, что в среднем за 24 ч инкубации скорость роста диаметра некроза составила 0,37 мм/ч. При этом максимальное в опыте увеличение его зоны происходило при инкубации от 24 до 48 ч и составляло 0,45 мм/ч.

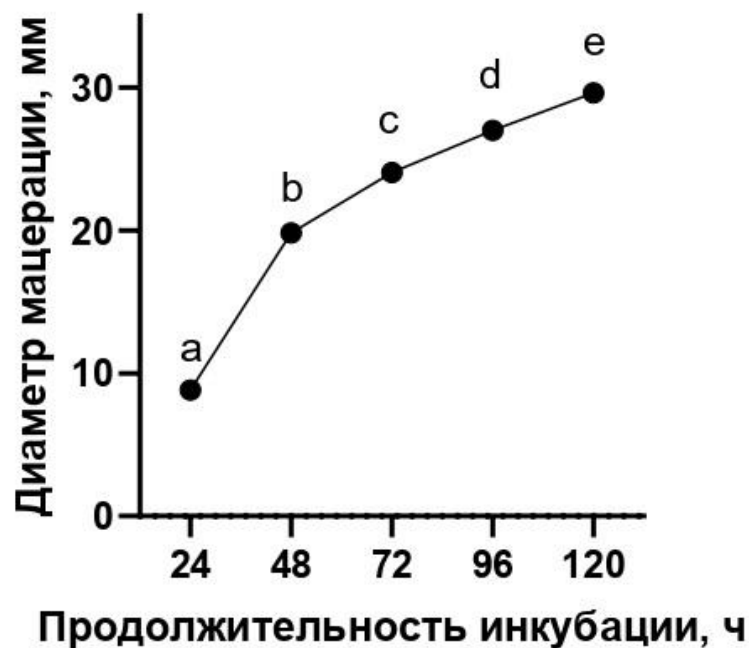


Рисунок 41. Динамика мягкой гнили на ломтиках картофеля, инокулированных штаммами возбудителей черной ножки в зависимости от продолжительности инкубации, мм (здесь и на Рисунке 42, 44 буквы означают принадлежность к статистическим группам по критерию Дункана, между точками графика, обозначенными различными буквами, имеются статистически достоверные различия при 95 %-ном уровне вероятности)

Скорость увеличения диаметра некроза при дальнейшей инкубации с 48 до 120 ч была значительно ниже и составляла 0,14 мм/ч, что свидетельствовало о нецелесообразности продолжительной инкубации при анализе динамики развития мягкой гнили методом инокуляции ломтиков картофеля.

Согласно анализу средних по переменным «сорт» – «температура», диаметры зон мацерации на ломтиках картофеля при температуре инкубации 13,5 °С варьировали от 13,0 до 18,7 мм, при температуре 22 °С – от 21,1 до 28,0 мм (Рисунок 42). Наименьшие величины этого показателя отмечали на сорте Красавчик, наибольшие – Жуковский ранний, при этом крайние значения были справедливы для обеих температур. Кроме того, следует отметить, что на сорте Жуковский ранний зона некроза при температуре 13,5 °С была на 33,2 % меньше, чем при температуре 22 °С, а на сорте Красавчик эта разница составила 38,4 %. Наименьшая разница (27,5 %) отмечена на сорте Розара, что может свидетельствовать о варьировании устойчивости сортов при изменении температурного режима.

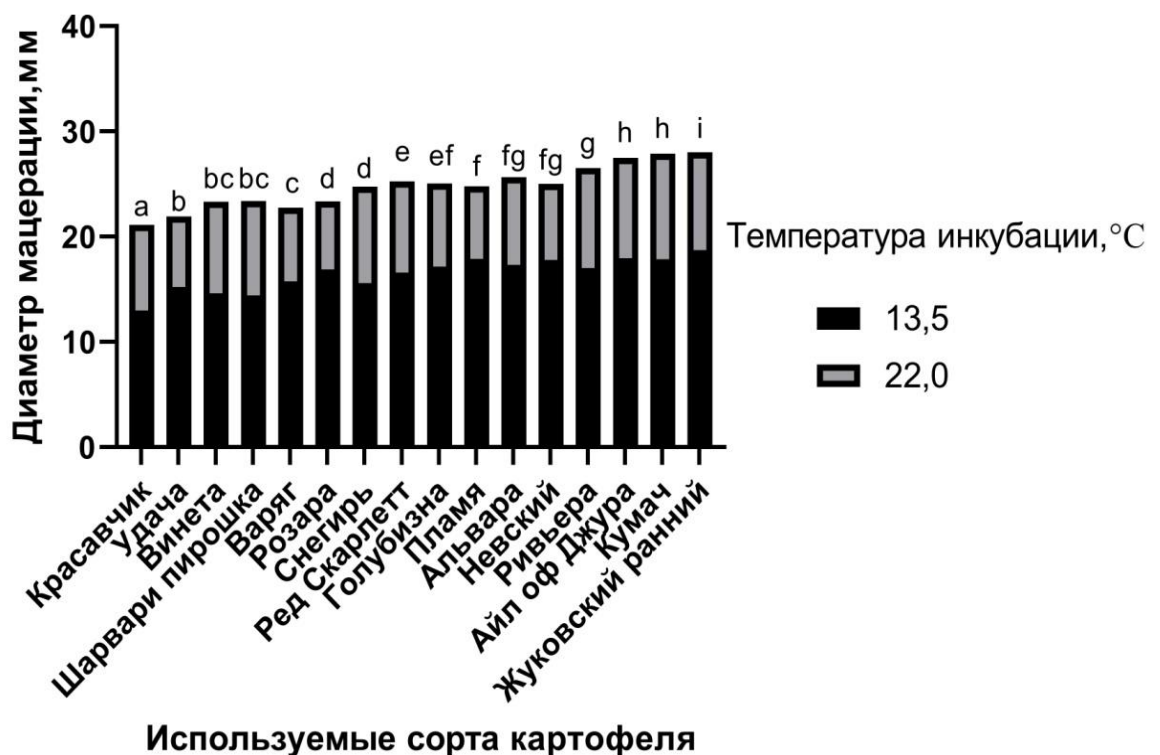


Рисунок 42. Диаметры зон мацерации на ломтиках картофеля, инокулированных штаммами возбудителей черной ножки при различных температурах инкубации, мм



Дальнейший анализ средних величин показал, что наименьшей агрессивностью отличался штамм F126 (*P. brasiliense*), только 2 из 16 изучаемых сортов были к нему высоковосприимчивы. У наиболее агрессивного штамма F004 (*P. atrosepticum*) средний диаметр зоны мацерации был на 14 % больше (Таблица 18). Кроме того, по рангу реакции пониженную восприимчивость к этому штамму проявили только испытанных 3 сорта. Промежуточное положение занимал штамм D9 (*D. dianthicola*), степень агрессивности которого была в среднем на 9 % выше, чем у штамма F126.

Таблица 18. Диаметр зоны мацерации ломтиков картофеля, инокулированных пектолитическими энтеробактериями, мм

Штамм	Вид	Статистическая группа по критерию Дункана		
		А	В	С
F126	<i>Pectobacterium brasiliense</i>	19,1		
D9	<i>Dickeya dianthicola</i>		20,8	
F004	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>			21,8

Достоверные различия между штаммами трех видов свидетельствуют о необходимости использования для объективной оценки реакции сортов картофеля к мягкой гнили клубней патогенов различного видового состава.

При анализе взаимодействия переменных «сорт» - «штамм» генотипы были кластеризованы (Рисунок 43) и разделены по поражаемости на три группы – устойчивые, восприимчивые и средневосприимчивые. Согласно результатам оценки, устойчивостью к штамму F004 характеризовались сорта картофеля Красавчик, Варяг и Удача, средней восприимчивостью – сорта Розара, Ривьера и Шарвари пирожка, остальные были отнесены к восприимчивым. К штамму D9 устойчивость проявили сорта Винета, Красавчик и Шавари пирожка, восприимчивость – Альвара, Голубизна, Айл оф Джура, Ривьера, Жуковский ранний и Кумач, к средневосприимчивым отнесены остальные 6 сортов. Восприимчивость к штамму F126 отмечена у сортов Айл оф Джура и Жуковский ранний, средневосприимчивые – Ред Скарлет, Невский, Пламя и Ривьера, остальные 10 сортов отнесены к устойчивым.

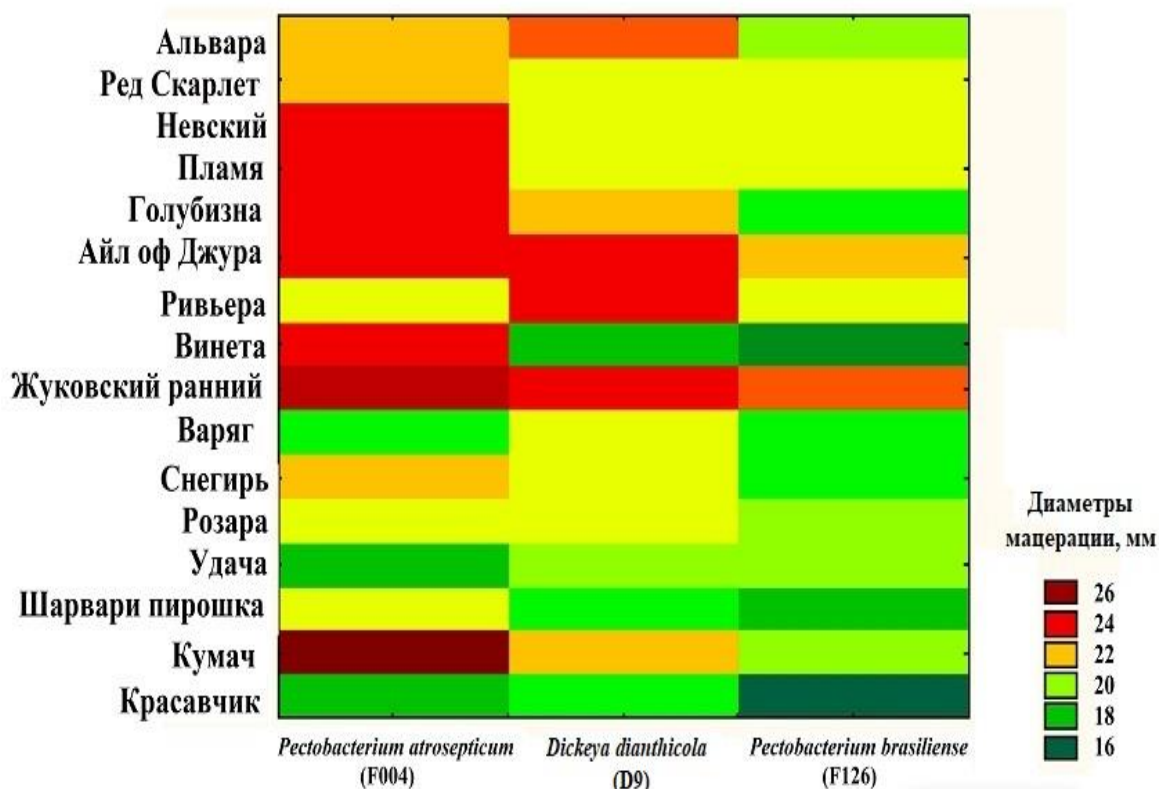


Рисунок 43. Кластеризация сортов картофеля по оценке средних значений диаметров зоны мацерации в зависимости от используемого для инокуляции штамма патогена, мм

В целом к генотипам с наибольшей устойчивостью к мягкой гнили можно отнести сорта Красавчик и Удача, в меньшей степени – Шарвари пирошка и Варяг. Наибольшая восприимчивость отмечена на сортах Жуковский ранний и Айл оф Джура. Также следует отметить специфическую восприимчивость к штамму F004 у сортов Кумач и Винета. В среднем по вариантам разница между диаметрами зон мацерации у устойчивого ко всем трем штаммам сорта Красавчик и восприимчивого к ним же сорта Жуковский ранний составляла около 37 %.

По результатам оценки реакции вегетирующих растений различных сортов картофеля к возбудителям черной ножки средний балл поражения растений в течение 26 дней наблюдений варьировал в пределах от 0,1 до 4,3 (Рисунок 44). Наименьшую скорость нарастания симптомов отмечали в начале опыта с 5-го по 10-й день и в конце эксперимента с 28-го по 31-й день после инокуляции – соответственно 0,08 и 0,1 балла в сутки. Самую высокую скорость поражения наблюдали с 14-й по 17-й день после инокуляции – 0,23 балла в сутки.

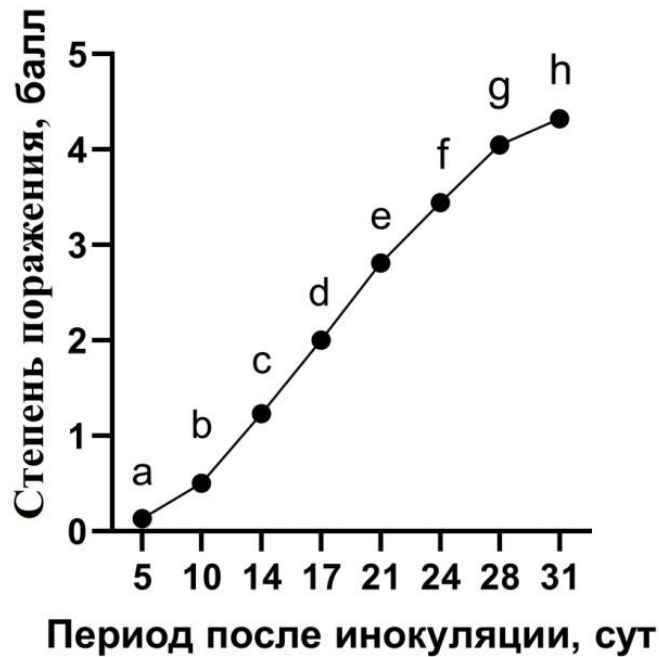


Рисунок 44. Динамика проявления симптомов черной ножки картофеля с 1 по 30 день после инокуляции патогенами, балл

Согласно результатам факторного анализа, проведенного по дням учета, лишь два временных промежутка за всё время учета определяли наибольшую изменчивость полученных данных (75,6 % вариабельности). Результаты наблюдений, полученные на 21–31 день после заражения, определяли 55,3 % изменчивости, а данные, собранные на 5–14 день после заражения – 20,3 %.

Высокая корреляционная зависимость между данными, выраженными в баллах поражения в отдельные дни, была отмечена (от  $r = 0,413$  до  $r = 0,810$ , при уровне значимости  $p < 0,05$ ) только для смежных учетов. Например, коэффициент корреляции между 24-м и 31-м днем измерений составил  $r = 0,81$ , в то время как между 5-м и 31-м днями –  $r = 0,2$ . В целом для отдаленных учетов коэффициент корреляции варьировал от  $r = 0,14$  до  $r = 0,38$  (при уровне значимости  $p < 0,05$ ).

Последующий анализ средних величин баллов поражения свидетельствует о достоверных различиях степени агрессивности трех видов патогена. Наименьшей агрессивностью, как и при анализе ломтиков картофеля, отличался штамм *P. brasiliense* F126 (Таблица 19). По спектру поражаемых сортов он также наименее агрессивен, высокая восприимчивость к нему отмечена только у 3 из исследуемых

генотипов. Штамм *D. dianthicola* D9 проявлял на 28 % большую агрессивность по отношению к вегетирующим растениям, по сравнению с F126, и оказался на 17 % агрессивнее, чем штамм *P. atrosepticum* F004, который был наиболее вредоносным при заражении клубней.

Таблица 19. Степень поражения черной ножкой картофеля на фоне искусственного заражения различными штаммами патогенов, балл

Штамм	Вид	Статистическая группа по критерию Дункана		
		А	В	С
F126	<i>Pectobacterium brasiliense</i>	2,0		
F004	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>		2,3	
D9	<i>Dickeya dianthicola</i>			2,6

По результатам оценки взаимодействия переменных «сорт» - «штамм» (Рисунок 45) высокая восприимчивость к штамму F004 была отмечена для сортов Ривьера, Розара, Кумач, Снегирь, Варяг и Голубизна, относительная устойчивость – для сортов Винета, Жуковский ранний, Ред Скарлет и Красавчик, остальные были среднеустойчивыми. Устойчивость к штамму D9 проявили сорта Красавчик, Ривьера, Жуковский ранний, Пламя, среднеустойчивыми были Розара, Винета, Удача, остальные сорта проявляли восприимчивость к этому штамму. Восприимчивость к штамму F126 отмечали на сортах Голубизна, Кумач и Шавари пирожка, среднеустойчивыми были Ривьера, Розара, Невский, Варяг и Удача, остальные сорта отнесены к устойчивым.

Наиболее устойчивыми ко всем трем штаммам были сорта Красавчик и Жуковский ранний. Самую высокую восприимчивость продемонстрировали сорта Голубизна и Кумач. Отмечена специфическая восприимчивость сортов Ривьера и Розара к штамму F004, сортов Невский, Ред Скарлет, Винета – к штамму D9. Штамм F126 сильно поражал два универсально восприимчивых сорта Голубизна и Кумач, а сорт Шарвари пирожка, характеризовался как устойчивый по отношению к штамму F004 и одновременно восприимчивый для штаммов D9 и F126.

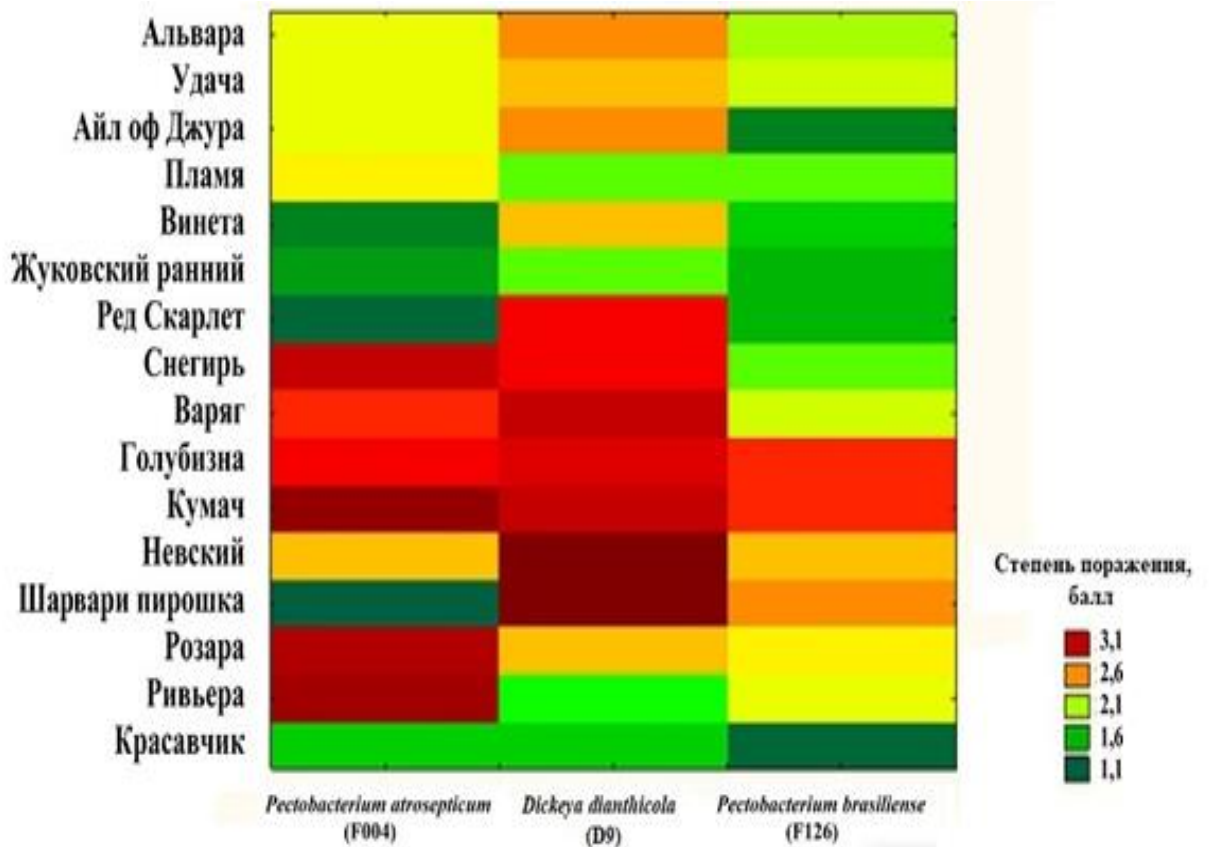


Рисунок 45. Кластеризация сортов картофеля по оценке степени поражения черной ножкой картофеля на фоне искусственного заражения различными штаммами патогенов, балл

Действие и взаимодействие всех факторов (вид патогена, сорт, температура, день учета) эксперимента по оценке реакции клубней картофеля разных сортов на мягкую гниль были статистически существенными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

Влияние факторов «штамм», «сорт», «день учета» и их взаимодействия на степень поражения растений было статистически достоверным ( $p < 0,05$ ). Фактор «год» и его взаимодействия со всеми перечисленными факторами не оказывали статистически значимого влияния ( $p > 0,05$ ), различия между данными полученными в 2022 и 2023 гг. были несущественными.

Для оценки согласованности результатов, полученных при исследовании клубневой и стеблевой устойчивости сортов картофеля, были рассчитаны коэффициенты линейной и ранговой корреляции. Коэффициент линейной корреляции, рассчитанный на основе средних диаметров зон мацерации ломтиков картофеля и двухлетних средних баллов развития заболевания на вегетирующих

растениях был равен 0,248, при уровне значимости  $p < 0,05$ . Коэффициент ранговой корреляции, рассчитанный для сформированных по критерию Дункана гомогенных групп средних значений, составил 0,176, при уровне значимости  $p < 0,05$ . Таким образом было установлено, что устойчивость картофеля к черной ножке и мягкой клубневой гнили не коррелируют между собой, что требует оценки устойчивости по обоим признакам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. На основании проведенного филогенетического анализа оригинальной коллекции штаммов, выделенных нами в 2020–2021 гг. из клубней картофеля различного географического происхождения было определено, что в популяции возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля наблюдается преимущественное преобладание штаммов, относящихся к видам *P. versatile*, *P. brasiliense*, *P. carotovorum*. Наименьшее распространение отмечается среди видов *P. polaris* и *P. parmentieri*, представленных 3 штаммами из Омской области. Также, на основании последовательностей гена *gyrB* были обнаружены три штамма (GAEL-1, GAEL-9 и OTG-16), возможно относящиеся к новому (неизвестному) виду, родственные для *P. odoriferum* и образующие отдельную кладу, сестринскую по отношению к большой кладе, включающей *P. carotovorum* и *P. odoriferum*.

2. В результате бактериологического анализа из клубней картофеля с симптомами мягкой гнили, полученных из Кемеровской и Московской областей, были выделены штаммы, относящиеся к *P. punjabense*, ранее не обнаруживавшемуся на территории РФ. Патогенность выделенных штаммов была подтверждена при инокуляции вегетирующих растений и ломтиков картофеля. Биохимические характеристики этих штаммов, определенные с использованием панелей API 20E, в основном соответствовали характеристикам *Pectobacterium* sp., за исключением неспособности *P. punjabense* к окислению маннитола и способностью к окислению мелибиозы.

3. Разработанная система видоспецифичной диагностики для штаммов *P. punjabense* показала 100% специфичность в отношении целевого вида. Предел обнаружения при проведении ПЦР в реальном времени соответствовал 0,005 нг/мл геномной ДНК, что подтверждает возможность использования данного анализа, как эффективного инструмента ранней дифференциальной диагностики *P. punjabense* при проведении мониторинга распространения данного возбудителя.

4. Было установлено, что фунгицид Ридомил Голд Р, ВДГ (5 кг/га) обладает высокой степенью бактерицидного действия по отношению к эпифитной

популяции возбудителя чёрной ножки картофеля *D. chrysanthemi*. Предварительная обработка фунгицидом позволила снизить площадь заселения листа картофеля фитопатогенными бактериями с более чем 40% в контроле до 0% в варианте с обработкой препаратом. Проведены эксперименты, моделирующие передачу патогенов от листа к листу, через воду и орудия труда, в ходе которых была показана возможность передачи заболевания вышеописанными путями и продемонстрирован защитный эффект от применения фунгицида Ридомил Голд Р, ВДГ.

5. По результатам скрининга эфирных масел и экстрактов растений, была отмечена высокая антибактериальная активность эфирных масел душицы обыкновенной, коричника китайского и гвоздичного дерева, а также этанольных экстрактов бадана толстолистного и дуба обыкновенного по отношению к четырем штаммам возбудителей черной ножки картофеля из родов *Pectobacterium* и *Dickeya*. При лечебном применении данных эфирных масел в концентрации 40 мг/мл и более и растительных экстрактов в концентрации 150 мг/мл и более биологическая эффективность составила 12,4–48,7 %, а при профилактическом применении - 35,3–100%. Полученные данные указывают на потенциал применения эфирных масел и растительных экстрактов в защите картофеля от бактериозов.

6. Устойчивость к мягкой гнили клубней, вызванной тремя видами патогенов (*P. atrosepticum*, *P. brasiliense*, *D. dianthicola*) была отмечена на среднераннем сорте картофеля Красавчик и раннем сорте Удача. Сорт Жуковский ранний при оценке клубней был отнесен к восприимчивым, а при инокуляции патогенов в стебель проявлял устойчивость. Наибольшую агрессивность при инокуляции клубней продемонстрировал штамм *P. atrosepticum* F004, а в условиях вегетационных опытов – *D. dianthicola* D9. Наименьшая агрессивность при обоих методах заражения была отмечена для штамма *P. brasiliense* F126. Между клубневой и стеблевой устойчивостью сортов картофеля к патогенам не выявлено достоверной линейной ( $r = 0,248$ ) или ранговой ( $r = 0,176$ ) корреляции, что доказывает обязательность оценки устойчивости сортов картофеля параллельно этими двумя методами.



## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Диагностическим лабораториям для оценки зараженности картофеля возбудителем черной ножки *Pectobacterium punjabense* рекомендуется использовать разработанную высокочувствительную и специфичную тест-систему на основе метода ПЦР в реальном времени (Vasilyeva et al., 2024).

2. Селекционным учреждениям при выведении сортов картофеля устойчивых к черной ножке и мягкой гнили в качестве перспективного источника генов устойчивости рекомендуется использовать сорта картофеля отечественной селекции Красавчик и Удача.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов Б. В. Нормативное регулирование товарного качества семенного картофеля // Защита и карантин растений. – 2018. – №. 9. – С. 25-27.
2. Анисимов Б.В., Белов Г.Л., Варицев Ю.А., Еланский С.Н., Журомский Г.К., Завриев С.К., Зейрук В.Н., Иванюк В.Г., Кузнецова М.А., Пляхневич М.П., Пшеченков К.А., Симаков Е.А., Склярова Н.П., Сташевски З., Усков А.И., Яшина И.М. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. — М.: Картофелевод. — 2009. - 272 с.
3. Анисимов Б.В., Зебрин С.Н., Зейрук В.Н. Сухие и мокрые гнили клубней и их контроль в семеноводстве картофеля // Защита и карантин растений. – 2017. – №. 5. – С. 30-35.
4. Асланова М.М., Ракитина Д.В., Мания Т.Р., Абрамов И.А., Сергиев В.П. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ возбудителей паразитарных болезней: современное состояние и перспективы // Гигиена и санитария. – 2022. – Т. 101. – №. 5. – С. 583-588.
5. Баранник А.П., Симонов Р.А., Васильев Д.М., Кабанова А.П., Шнейдер М.М., Игнатов А.Н., Мирошников К.А. Дифференцирование пектолитических патогенов картофеля *Pectobacterium* и *Dickeya* spp. генетическим фингерпринтингом // Современные технологии и средства защиты растений-платформа для инновационного освоения в АПК России: Сборник материалов Международной научно-практической конференции, Санкт-Петербург, 8-12 октября. – Санкт-Петербург: ВИЗР. - 2018. – С. 25-26.
6. Белов Г.Л., Зейрук В.Н., Васильева С.В. Бактериальные болезни картофеля и методы их диагностики // Защита и карантин растений. – 2016. – №. 3. – С. 30-32.
7. Белов Г.Л., Зейрук В.Н., Мальцев С.В., Абашкин О.В., Абросимов Д.В. Применение химических и биологических препаратов для защиты картофеля при хранении // Агрехимический вестник. – 2020. – №. 6. – С. 75-78.
8. Белов Д. А., Хютти А. В. Современные фитопатогенные комплексы болезней картофеля и меры по предотвращению их распространения в России // Картофель и овощи. – 2022. – Т. 5. – С. 18-24.

9. Белошапкина О.О., Гриценко В.В., Митюшев И.М., Чебаненко С.И. Защита растений: фитопатология и энтомология: учебник. Ростов н/д.: Феникс, 2017. - 477 с.

10. Варицев Ю.А., Белов Г.Л., Усков А.И., Варицева Г.П., Завриев С.К., Аршава Н.В., Зайцев В.В. Методические указания по диагностике возбудителей черной ножки (*Erwinia carotovora* (Jones) Bergey et al.) и кольцевой гнили картофеля (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieck. et Kotth.) Skaptasson et Burk.) методами иммуноферментного анализа, иммунофлуоресцентной микроскопии и полимеразной цепной реакции // Москва: ВНИИ картофельного хозяйства. – 2003. – 33 с.

11. Варицев Ю.А., Сафенкова И.В., Зайцев И.А., Варицева Г.П. Разработка иммуноферментных диагностических тест-систем для выявления возбудителя черной ножки картофеля (*Pectobacterium atrosepticum*) // Картофелеводство. – 2022. – Т. 24. – №. 1. – С. 139-148.

12. Васильева А.А. Перспективы применения эфирных масел в защите картофеля от черной ножки // V Всероссийский конгресс по защите растений: Сборник тезисов докладов, посвященный 300-летию Российской академии наук, Санкт-Петербург, 16-19 апреля 2024 года. – Санкт-Петербург: Всероссийский институт защиты растений. – 2024а. – С. 121.

13. Васильева А.А., Игнатов А.Н., Джалилов Ф.С.У. Оценка устойчивости различных сортов картофеля к возбудителям черной ножки и мягкой гнили // Достижения науки и техники АПК. – 2024б. – №. 3.– С. 10-16.

14. Васильева С.В., Дервягина М.К., Зейрук В.Н., Белов Г.Л., Киселев А.И., Шабанов А.Э., Пшеченков К.А. Фитопатологическая оценка сортов и гибридов картофеля в условиях Центрального федерального округа Российской Федерации // Защита картофеля. – 2018. – №. 2. – С. 18-25.

15. Виноградова С.В., Кырова Е.И., Игнатов А.Н. Полногеномное секвенирование фитопатогенных бактерий // Защита картофеля. – 2014. – №. 2. – С. 15-17.

16. Воловик А.С., Шнейдер Ю.И. Гнили картофеля при хранении // Москва: Агропромиздат. – 1987. – 93 с.

17. ГОСТ 33996-2016. Межгосударственный стандарт. Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества. – Москва: Стандартинформ, 2017. - 41 с.

18. ГОСТ 53136-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Картофель семенной. Технические условия. – Москва: Стандартинформ, 2009.–10 с.

19. ГОСТ 55329-2012. Картофель семенной. Приемка и методы анализа. – Москва: Стандартинформ, 2013.

20. ГОСТ 59551-2021. Национальный стандарт Российской Федерации. Картофель семенной. Отбор проб и методы диагностики фитопатогенов – Москва: Стандартинформ, 2021.

21. Дацюк А.А. Анализ антибактериальных свойств фунгицида Ридомил Голд Р в отношении возбудителей черной ножки методом *in vitro* // Сборник материалов Международной научной конференции молодых учёных и специалистов, посвящённой 135-летию со дня рождения А.Н. Костякова, Москва, 6-8 июня 2022 года. – Москва: Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева. – 2022а. – С. 173-177.

22. Дацюк А.А. Анализ антибактериальных свойств фунгицида Ридомил Голд Р против эпифитной популяции возбудителей черной ножки картофеля // Аграрная наука – 2022: Сборник материалов Всероссийской конференции молодых исследователей, Москва, 22-24 ноября 2022 года. – Москва: Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева. – 2022б. – С. 1831-1835.

23. Дацюк А.А., Джалилов Ф.С.У. Оценка бактерицидного действия фунгицида Ридомил Голд Р против возбудителей черной ножки картофеля // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2022. – №. 4. – С. 82-93.

24. Дацюк А.А., Тараканов Р.И. Оценка антибактериальных свойств эфирных масел и растительных экстрактов по отношению к возбудителям черной ножки картофеля // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2022. – №. 6. – С. 123-145.
25. Дорожкин Н.А., Бельская С.И. Болезни картофеля // Минск: Наука и техника. – 1979. – 248 с.
26. Ерохова М. Д., Дренова Н. В. Черная ножка-опасное заболевание картофеля // Защита и карантин растений. – 2014. – №. 7. – С. 28-30.
27. Ерохова М. Д., Кузнецова М. А. Аспекты интегрированной защиты картофеля от болезней в современных условиях устойчивой интенсификации сельского хозяйства Европы // Биосфера. – 2022а. – Т. 14. – №. 3. – С. 163-167.
28. Ерохова М. Д., Кузнецова М. А. Опыт Великобритании в защите картофеля от бактериозов // Достижения науки и техники АПК. – 2022б. – Т. 36. – №. 2. – С. 8-13.
29. Ерохова М.Д., Кузнецова М.А. Фитопатогенные бактерии родов *Dickeya* и *Pectobacterium* // Биосфера. – 2023. – Т. 15. – №. 3. – С. 193-203.
30. Ертаева Б.А. Оценка сортов картофеля на устойчивость к черной ножке // Вестник защиты растений. – 2016. – Т. 89. – №. 3. – С. 71-72.
31. Жевора С.В., Зейрук В.Н., Белов Г.Л., Васильева С.В., Деревягина М.К., Анисимов Б.В., Старовойтов В.И., Старовойтова О.А., Мишуров Н.П., Неменуцкая Л.А., Манохина А.А., Пискунова Н.А. Передовые методы диагностики патогенов картофеля // науч. анал. обзор. – Москва: ФГБНУ «Росинформагротех», 2019. – 92 с.
32. Зайцев И.А. Распространение возбудителей чёрной ножки и кольцевой гнили картофеля в Российской Федерации и совершенствование иммунохимических и молекулярных методов их диагностики: дисс. ... канд. биол. наук: 06.01.07. – ФГБНУ ВПО "Федеральный исследовательский центр картофеля А.Г. Лорха", Москва, 2018 – 235 с.
33. Зайцев И.А., Варицев Ю.А., Лазарев А.М., Галушка П.А., Варицева Г.П. Мониторинг скрытых (латентных) форм распространения возбудителей чёрной

ножки и кольцевой гнили картофеля в Российской Федерации // Сельскохозяйственные науки: научные приоритеты учёных. – 2016. – С. 38-55.

34. Зайцев И.А., Сафенкова И.В., Варицев Ю.А., Карлов А.Н., Варицева Г.П., Усков А.И., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Разработка иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем для выявления возбудителей черной ножки картофеля рода *Diskeya* // Картофелеводство: Сборник научных трудов Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию ВНИИКХ «История развития и результаты научных исследований по культуре картофеля», Москва, п. Красково, 5–6 октября 2015 года. – Москва: ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха" (Красково). – 2015. – С. 425-437.

35. Зейрук В.Н., Васильева С.В., Белов Г.Л., Мальцев С.В., Жевора С.В. Пути оптимизации хранения картофеля // Вестник. – 2023. – С. 27.

36. Зейрук В.Н., Васильева С.В., Деревягина М.К., Богословская О.А., Ольховская И.П., Афанасенкова Е.С., Глущенко Н.Н. Влияние предпосевной обработки клубней наночастицами металлов в составе полимерного покрытия на заболеваемость и урожайность картофеля // Российские нанотехнологии. – 2019. – Т. 14. – №. 5-6. – С. 65-73.

37. Зейрук В.Н., Жевора С.В., Васильева С.В., Белов Г.Л., Долженко В.И., Кузнецова М.А., Анисимов Б.В., Еланский С.Н. Атлас болезней, вредителей, сорняков картофеля и мероприятия по борьбе с ними. - Москва: Наука. - 2020. - 322 с.

38. Зейрук В.Н., Пшеченков К.А., Васильева С.В. Подготовка картофеля к хранению // Защита и карантин растений. – 2016. – №. 11. – С. 36-39.

39. Иванюк В.Г., Банадысев С.А., Журомский Г.К. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. — Минск: Белпринт. — 2005. — 696 с.

40. Игнатов А. Н. Необходимо усилить борьбу с бактериозами картофеля // Картофель и овощи. – 2011. – №. 5. – С. 28-28.

41. Игнатов А.Н., Егорова М.С., Ходыкина М.В. Распространение бактериальных и фитоплазменных болезней растений в России // Защита и

карантин растений. – 2015. – №. 5. – С. 6-10.

42. Игнатов А.Н., Карлов А.Н., Джалилов Ф.С., Карандашов А.Е., Князькина М.С., Корнев К.П., Пехтерева Э.Ш. Распространение в России черной ножки картофеля, вызываемой бактериями р. *Dickeya* // Защита и карантин растений. – 2014. – №. 11. – С. 41-43.

43. Игнатов А.Н., Лазарев А.М., Панычева Ю.С., Проворов Н.А., Чеботарь В. Бактериальные патогены картофеля рода *Dickeya*: мини-обзор по систематике и этиологии заболеваний // Сельскохозяйственная биология. – 2018а. – Т. 53. – №. 1. – С. 123-131.

44. Игнатов А.Н., Панычева Ю.С., Воронина М.В., Васильев Д.М., Джалилов Ф.С.У. Динамика видового состава патогенов картофеля в европейской части РФ // Картофель и овощи. – 2019. – Т. 9. – С. 28-32.

45. Игнатов А.Н., Панычева Ю.С., Воронина М.В., Джалилов Ф.С. Бактериозы картофеля в Российской Федерации // Картофель и овощи. – 2018б. – №. 1. – С. 3-7.

46. Игнатов А.Н., Мирошников К.А., Джалилов Ф.С.У., Дацюк А.А. Генетическая коллекция бактериальных патогенов пасленовых культур // Свидетельство о регистрации базы данных № 2021621877 от 06.09.2021. Заявка № 2021621783 от 31.08.2021.

47. Карлов А.Н. Диагностика черной ножки картофеля, вызываемой бактериями *Dickeya*, и генетический полиморфизм штаммов возбудителей: дисс. ... канд. биол. наук: 06.01.07, 03.02.07. – ФГБОУ ВПО "Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К.А. Тимирязева", Москва, 2011а – 129 с.

48. Карлов А.Н., Зотов В.С., Пехтерева Э.Ш., Матвеева Е.В., Джалилов Ф.С.У., Фесенко И.А., Карлов Г.И. *Dickeya dianthicola*-новый для России бактериальный патоген картофеля // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2010. – №. 3. – С. 134-141.

49. Карлов А.Н., Игнатов А.Н., Карлов Г.И., Пехтерева Э.Ш., Матвеева Е.В., Норман Ш., Варицев, Ю.А. Диагностика бактериального патогена картофеля *Dickeya dianthicola* // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. –

2011б. – №. 3. – С. 38-48.

50. Катаева М.М. Устойчивость сортов и сеянцев картофеля к бактериальным болезням //Сборник научных работ НИИСХ ЦЧП. – 1972. – Т. 5. – С. 155-157.

51. Комар Е.И., Шавель М.И., Песнякевич А.Г. Бактерии рода *Dickeya*-новый возбудитель бактериальной гнили картофеля на территории Беларуси. – 2013. - С. 265-268.

52. Лазарев А. М. Новый возбудитель бактериоза картофеля атакует российские поля //Защита и карантин растений. – 2013. – №. 6. – С. 11-15.

53. Лазарев А. М., Хютти А. В. Факторы успешного хранения картофеля //Сельскохозяйственные вести. – 2018. – №. 3. – С. 42-43.

54. Лазарев А.М. Биологические особенности возбудителя черной ножки картофеля в северо-западной зоне РСФСР и методы его диагностики: дисс. ... канд. биол. наук: 06.01.11. - Ленинград, 1985-202 с.

55. Лазарев А.М., Базлеева Т.В. Черная ножка картофеля // Бактериальные болезни картофеля и овощных культур и методы борьбы с ними: Сборник трудов Всероссийской конференции, Большие Вяземы, 1-31 октября 1994 года. – Санкт-Петербург: Всероссийский институт защиты растений. – 1994. – С. 5-16.

56. Лазарев А.М., Борисова И.П. Бактериальные болезни картофеля: диагностика и меры борьбы // Сельскохозяйственные вести. – 2010. – №. 4. – С. 22-24.

57. Лазарев А.М., Мысник Е.Н., Варицев Ю.А., Зайцев И.А., Кожемяков А.П., Попов Ф.А., Волгарев С.А., Чеботарь В.К. Ареалы и зоны вредоносности основных бактериозов растений на территории Российской Федерации и сопредельных стран. // Приложение к журналу «Вестник защиты растений» / СПб.: ВИЗР. – 2017. – №. 24. – 136 с.

58. Лазарев А.М., Хютти А.В. О бактериозах картофеля // Сельскохозяйственные вести. – 2016. – №. 1. – С. 40-41.

59. Лелеков А.С., Геворгиз Р.Г., Гаврилов П.Е. Динамическая модель субстратзависимого роста накопительной культуры микроводорослей //Вопросы современной альгологии. - 2016. - № 2 (12). - С. 1–10.



60. Лукьянова А.А., Мирошников К.А. Оценка терапевтического потенциала фага Q51 для лечения бактериальных инфекций картофеля // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии: Сборник тезисов докладов 19-ой Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева, Москва, 15–16 апреля 2019 года. – Москва: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии». - 2019. – С. 156-157.

61. Лысов А.К., Хютти А.В., Корнилов Т.В. Интегрированная защита при выращивании семенного картофеля // Защита и карантин растений. – 2020. – №. 9. – С. 32-37.

62. Мирошников К.А. Геномика мягкогнилостных бактериозов картофеля: диагностика, мониторинг, стратегии биозащиты // В поисках моделей персонализированной медицины: Сборник материалов V Международной конференции «Постгеном 2018», Казань, 29 октября – 2 ноября 2018. – Казань: Казанский Федеральный Университет. – 2018. – С. 49.

63. Мирошников К.А., Кабанова А.П., Шнейдер М.М., Васильев Д.М., Игнатов А.Н. Биоконтроль бактериальных болезней растений с помощью бактериофагов // Актуальная биотехнология. – 2019. – №. 3. – С. 320-322.

64. Мороз С., Патыка В.П. Бактериальные болезни подсолнечника // Зерно. – 2011. – №. 1. – С. 27-33.

65. Мыца Е.Д., Еланский С.Н., Кокаева Л.Ю., Побединская М.А., Игнатов А.Н., Кузнецова М.А., Козловский Б.Е., Денисов А.Н., Жеребин П.М., Крутяков Ю.А. Новый препарат «зерокс»-оценка фунгицидного и бактерицидного эффекта *in vitro* // Достижения науки и техники АПК. – 2014. – №. 12. – С. 16-19.

66. Надточий И.Н., Лазарев А.М., Зайцев И.А., Варицев Ю.А. К вопросу распространенности и вредоносности черной ножки картофеля, вызываемой бактериями рода *Pectobacterium* // Методы биотехнологии в селекции и семеноводстве картофеля: Сборник материалов Международной научно-практической конференции, Москва, 7-9 июля 2014 года. – Москва: Всероссийский

НИИ картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха. – 2014. – С. 225-231.

67. Попкова К.В., Шкаликов В.А., Стройков Ю.М. Общая фитопатология. Учебник для вузов: 2-е издание, переработанное и дополненное. - М.: Дрофа. - 2005. - 445 с.

68. Попкова К.В., Шнейдер Ю.И. Санаа Рамадан Эль-Хатиб. Изменчивость вирулентных свойств *Pectobacterium phytophthorum* (Appel) Waldee в патогенезе черной ножки картофеля // Известия ТСХА. – 1979. – №. 1. – С. 127-138.

69. Рагозина И.И., Шнейдер Ю.И., Липсиц Д.В. Пектолитические ферменты в культуре *Pectobacterium Phytophthorum* и в пораженных ею тканях картофеля // Comptes rendus de l'Académie des sciences de l'URSS. – 1969. – Vol. 188. – №. 4-6. – P. 937.

70. Райко А.М. Устойчивость селекционного материала картофеля к черной ножке. – 2007. – С. 61-61.

71. Сафенкова И.В., Панферов В.Г., Немченко Н.А., Варицев Ю.А., Зайцев И.А., Галушка П.А., Усков А.И., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографическая тест-система для одновременного контроля десяти патогенов картофеля // Картофелеводство: Материалы научно-практической конференции «Современное состояние и перспективы развития селекции и семеноводства картофеля», Москва, 9-10 июля 2018 года. – Москва: ФГБНУ "Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха" (Красково). – 2018. – С. 232-245.

72. Стацюк Н.В., Кузнецова М.А. Лабораторные методы оценки устойчивости растений и клубней картофеля к возбудителям черной ножки и мягкой гнили клубней // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53. – №. 1. – С. 111-122.

73. Усков А.И. Воспроизводство оздоровленного исходного материала для семеноводства картофеля: 6. Методы лабораторного контроля // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – №. 10. – С. 23-25.

74. Фасулати С.Р., Лазарев А.М., Иванова О.В., Лиманцева Л.А., Хютти А.В., Орина А.С., Козлов Л.П., Гаджиев Н.М., Евдокимова З.З., Лебедева В.А. Успехи

учреждений северо-запада России в селекции сортов картофеля, устойчивых к вредным организмам // Защита картофеля. – 2014. – №. 1. – С. 65-68.

75. Ха В.Т.Н., Джалилов Ф.С.У. Антибактериальная активность эфирных масел и их использование для обеззараживания семян капусты от сосудистого бактериоза // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2014. – №. 6. – С. 59-68.

76. Чэнюе Ш., Горовик Ю.Н., Сидорова С.Г., Евтушенков А.Н. Идентификация пектолитических видов бактерий, выделенных при бактериозах растений в Республике Беларусь // Экспериментальная биология и биотехнология. – 2022. – № 3. – С. 64-72.

77. Шнейдер Ю.И. Бактериозы картофеля, вызываемые бактериями родов *Pectobacterium*, *Pseudomonas* и *Bacillus*: автореф. дисс. ... докт. биол. наук: 06.54.00. – Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 1972 - 74 с.

78. Abd El-Rahman A.F., El-Kafrawy A.A., Abd El-Hafez O.A., El-Ghany A.B.D., Rady E. Evaluation of some fungicides effectiveness in control of blackleg and common scab of potato // Egyptian Journal of Agricultural Research. – 2018. – Vol. 96. – №. 4. – P. 1307-1323.

79. Abd-El-Khair H., Karima H.E.H. Application of some bactericides and bioagents for controlling the soft rot disease in potato // Res J Agric Biol Sci. – 2007. – Vol. 3. – №. 5. – P. 463-473.

80. Abedon S.T., García P., Mullany P., Aminov R. Phage therapy: past, present and future // Frontiers in microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. 981.

81. Adeolu M., Alnajjar S., Naushad S., Gupta, R.S. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2016. – Vol. 66. – №. 12. – P. 5575-5599.

82. Adriaenssens E.M., Van Vaerenbergh J., Vandenhoevel D., Dunon V., Ceysens P. J., De Proft M., Andrew M. Kropinski A.M., Noben J.-P., Maes M., Lavigne R. T4-related bacteriophage LIMEstone isolates for the control of soft rot on potato caused by 'Dickeya solani' // *PloS one*. – 2012. – Vol. 7. – №. 3. – P. e33227.
83. Afek U., Orenstein J. Disinfecting potato tubers using steam treatments // *Canadian Journal of Plant Pathology*. – 2002. – Vol. 24. – №. 1. – P. 36-39.
84. Alam A., Rehman N.U., Ansari M.N., Palla A.H. Effects of essential oils of *Elettaria cardamomum* grown in India and Guatemala on gram-negative bacteria and gastrointestinal disorders // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – №. 9. – P. 2546.
85. Alcorn S.M., Orum T.V., Steigerwalt A.G., Foster J.L., Fogleman J.C., Brenner D.J. Taxonomy and pathogenicity of *Erwinia cacticida* sp. nov // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 1991. – Vol. 41. – №. 2. – P. 197-212.
86. Alfano J.R., Collmer A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense // *Annual review of phytopathology*. – 2004. – Vol. 42. – T. 385-414.
87. Alkan D., Yemenicioğlu A. Potential application of natural phenolic antimicrobials and edible film technology against bacterial plant pathogens // *Food Hydrocolloids*. – 2016. – Vol. 55. – P. 1-10.
88. Alonso-Gato M., Astray G., Mejuto J.C., Simal-Gandara J. Essential oils as antimicrobials in crop protection // *Antibiotics*. – 2021. – Vol. 10. – №. 1. – P. 34.
89. Amri I., Gargouri S., Hamrouni L., Hanana M., Fezzani T., Jamoussi B. Chemical composition, phytotoxic and antifungal activities of *Pinus pinea* essential oil // *Journal of pest science*. – 2012. – Vol. 85. – №. 2. – P. 199-207.
90. Arthi K., Appalaraju B., Parvathi S. Vancomycin sensitivity and KOH string test as an alternative to gram staining of bacteria // *Indian Journal of Medical Microbiology*. – 2003. – Vol. 21. – №. 2. – P. 121-123.
91. Auch A.F., von Jan M., Klenk H.P., Göker M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison // *Standards in genomic sciences*. – 2010. – Vol. 2. – P. 117-134.

92. Azadmanesh S., Mozafari J., Hasanzadeh N., Moslemkhani C. Comparing inoculation methods for in vitro evaluation of resistance to blackleg disease in potato cultivars // *Genetika*. – 2022. – Vol. 54. – №. 2. – P. 705-715.

93. Babinska W., Motyka-Pomagruk A., Sledz W., Kowalczyk A., Kaczynski Z., Lojkowska E. The first polish isolate of a novel species *Pectobacterium aquaticum* originates from a pomeranian lake // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2021. – Vol. 18. – №. 9. – P. 5041.

94. Baharum S.N., Bunawan H., Ghani M.A.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. – №. 10. – P. 7006-7015.

95. Bakay V. The defeat of potato by blackleg: distribution and characteristics of the pathogen population in Belarus // *Agric Selection in Belarus*. – 2014. – Vol. 50. – P. 230-238.

96. Balogh B., Jones J.B., Momol M.T., Olson S.M., Obradovic A., King P., Jackson L.E. Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato // *Plant disease*. – 2003. – Vol. 87. – №. 8. – P. 949-954.

97. Behidj-Benyounes N., N., Letifi S., Slamani L., Itouchene D., Dahmane T. Study of antibacterial activity of a range of plant extracts against the causative agent of potato blackleg disease (*Pectobacterium*) // *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*. – 2017. – Vol. 17. – P. 999-1006.

98. Bell K.S., Sebahia M., Pritchard L., Holden M.T.G., Hyman L.J., Holeva M.C., Toth I.K. Genome sequence of the enterobacterial phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and characterization of virulence factors // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101. – №. 30. – P. 11105-11110.

99. Ben Moussa H., Pédrón J., Bertrand C., Hecquet A., Barny M. *Pectobacterium quasiaquaticum* sp. nov., isolated from waterways // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2021. – Vol. 71. – №. 10. – P. 005042.

100. Bhat K.A., Viswanath H.S., Bhat N.A., Wani T.A. Bioactivity of various ethanolic plant extracts against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot of potato tubers // *Indian Phytopathology*. – 2017. – Vol. 70. – №. 4. – P. 463-470.

101. Bourgault A.M., Lamothe F. Evaluation of the KOH test and the antibiotic disk test in routine clinical anaerobic bacteriology // *Journal of clinical microbiology*. – 1988. – Vol. 26. – №. 10. – P. 2144-2146.

102. Brady C.L., Cleenwerck I., Denman S., Venter S.N., Rodriguez-Palenzuela P. Proposal to reclassify *Brenneria quercina* (Hildebrand, Schroth, 1967) Hauben et al. 1999 into a novel genus, *Lonsdalea* gen. nov., as *Lonsdalea quercina* comb. nov., descriptions of *Lonsdalea quercina* subsp. *quercina* comb. nov., *Lonsdalea quercina* subsp. *Iberica* subsp. nov., and *Lonsdalea quercina* subsp. *britannica* subsp. nov., emendation of the description of the genus *Brenneria*, reclassification of *Dickeya dieffenbachiae* as *Dickeya* A new clade of *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* comb. nov., and emendation of the description of *Dickeya dadantii* // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2012. – Vol. 62. – №.7. – P. 1592-1602.

103. Brewer J.W., Harrison M.D., Winston J.A. Survival of two varieties of *Erwinia carotovora* on *Drosophila melanogaster* Meigen and *Drosophila busckii* Coquillett, (Diptera: Drosophilidae) vectors of potato blackleg in Colorado // *American Potato Journal*. – 1981. – Vol. 58. – P. 439-449.

104. Brierley J., Lees A., Hilton A., Wale S., Peters J., Elphinstone J., Boonham N. Improving decision making for the management of potato diseases using real-time diagnostics // *Potato Council Final Report*. – 2008. – Vol. 253. – P. 2008.

105. Bugaeva E.N., Voronina M.V., Vasiliev D.M., Lukianova A.A., Landyshev N.N., Ignatov A.N., Miroshnikov K.A. Use of a specific phage cocktail for soft rot control on ware potatoes: A case study // *Viruses*. – 2021. – Vol. 13. – №. 6. – P. 1095.

106. Burgess P.J., Blakeman J.P., Pérombelon M.C.M. Contamination and subsequent multiplication of soft rot erwinias on healthy potato leaves and debris after haulm destruction // *Plant Pathology*. – 1994. – Vol. 43. – №. 2. – P. 286-299.

107. Burkholder W.R., McFadden L.A., Dimock E.W.A bacterial blight of *Chrysanthemums* // *Phytopathology*. – 1953. – Vol. 43. – P. 522-526.
108. Bustin S.A. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments // *Clinical Chemistry*. – 2009. – Vol. 55. – P. 4611-622.
109. Buttimer C., Hendrix H., Lucid A., Neve H., Noben J.P., Franz C., O'Mahony J., Lavigne R., Coffey A. Novel N4-Like bacteriophages of *Pectobacterium atrosepticum* // *Pharmaceuticals*. – 2018. – Vol. 11. – №. 2. – P. 45.
110. Carezzano M.E., Paletti Rovey M.F., Cappellari L.D.R., Gallarato L.A., Bogino P., Oliva M.D.L.M., Giordano W. Biofilm-forming ability of phytopathogenic bacteria: a review of its involvement in plant stress // *Plants*. – 2023. – Vol. 12. – №. 11. – P. 2207.
111. Charkowski A.O. The soft rot *Erwinia* // *Plant-associated bacteria*. – 2006. – P. 423-505.
112. Charkowski A.O., Blanco C., Condemine G., Expert T., Franza T., Hayes C., Hugouvieux-Cotte-Pattat N., López Solanilla E., Low D., Moleleki L., Pirhonen M., Pitman A., Perna N., Reverchon S., Rodríguez Palenzuela P., San Francisco M., Toth I., Tsuyumu S., van der Waals J., van der Wolf J., Van Gijsegem F., Yang C.-H., Yedidia I. The role of secretion systems and small molecules in soft-rot *Enterobacteriaceae* pathogenicity // *Annual review of phytopathology*. – 2012. – Vol. 50. – №. 1. – P. 425-449.
113. Chen X.F., Zhang H.L., Chen J. First report of *Dickeya solani* causing soft rot in imported bulbs of *Hyacinthus orientalis* in China // *Plant disease*. – 2015. – Vol. 99. – №. 1. – P. 155.
114. Chuang D., Chien Y., Wu H. P. Cloning and expression of the *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* gene encoding the low-molecular-weight bacteriocin carocin S1 // *Journal of bacteriology*. – 2007. – Vol. 189. – №. 2. – P. 620-626.
115. Cigna J., Laurent A., Waleron M., Waleron K., Dewaegeneire P., van Der Wolf J. M., Hélias V. European Population of *Pectobacterium punjabense*: Genomic

diversity, tuber maceration capacity and a detection tool for this rarely occurring potato pathogen // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9. – №. 4. – P. 781.

116. CLSI - M100-S26 - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 26th informational supplement. / Wayne, USA Clinical and laboratory standards institute. – 2016.

117. Costechareyre D., Balmand S., Condemine G., Rahbé Y. *Dickeya dadantii*, a plant pathogenic bacterium producing cyt-like entomotoxins, causes septicemia in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – №. 1. – P. e30702.

118. Curland R.D., Mainello A., Perry K.L., Hao J., Charkowski A.O., Bull C.T., McNally R.R., Johnson S.B., Rosenzweig N., Secor G.A., Larkin R.P., Gugino B.K., Ishimaru C.A. Species of *Dickeya* and *Pectobacterium* isolated during an outbreak of blackleg and soft rot of potato in northeastern and north Central United States // *Microorganisms*. – 2021. – Vol. 9. – №. 8. – P. 1733.

119. Czajkowski R, Van der Wolf J.M., Krolicka A., Ozymko Z., Narajczyk M., Kaczynska N., Lojkowska E. Salicylic acid can reduce infection symptoms caused by *Dickeya solani* in tissue culture grown potato (*Solanum tuberosum* L.) plants // *European Journal of Plant Pathology*. – 2015b. – Vol. 141. – P. 545-558.

120. Czajkowski R., Perombelon M.C., Van Veen J.A., Van der Wolf J.M. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review // *Plant pathology*. – 2011. – Vol. 60. – №. 6. – P. 999-1013.

121. Czajkowski R., Pérombelon M.C.M., Jafra S., Lojkowska E., Potrykus M., van Der Wolf J.M., Sledz W. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review // *Annals of Applied Biology*. – 2015a. – Vol. 166. – №. 1. – P. 18-38.

122. Czajkowski R., Smolarska A., Ozymko Z. The viability of lytic bacteriophage  $\Phi$ D5 in potato-associated environments and its effect on *Dickeya solani* in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12. – №. 8. – P. e0183200.

123. Da Silva Felix K.C., Da Silva C.L., De Oliveira W.J., De Lima Ramos Mariano R., De Souza E.B. Calcium-mediated reduction of soft rot disease in Chinese cabbage // *European Journal of Plant Pathology*. – 2017. – Vol. 147. – P. 73-84.



124. Dawyndt P., Vancanneyt M., Snauwaert C., De Baets B., De Meyer H., Swings J. Mining fatty acid databases for detection of novel compounds in aerobic bacteria // *Journal of microbiological methods*. – 2006. – Vol. 66. – №. 3. – P. 410-433.
125. De Boer S.H., Allan E., Kelman A. Survival of *Erwinia carotovora* in Wisconsin soils // *American potato journal*. – 1979. – Vol. 56. – P. 243-252.
126. De Boer S.H., Charkowski A.O., Van der Wolf J.M. CHAPTER 33: Detection of *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. in Potato Tubers // *Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material, Second Edition*. – The American Phytopathological Society Press, 2017. – P. 243-247.
127. De Boer S.H., Kelman A. Gram-negative bacteria, B-2 *Erwinia* soft rot group // *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. – 2001. – P. 56-72.
128. De Boer S.H., Li X., Ward L.J. *Pectobacterium* spp. associated with bacterial stem rot syndrome of potato in Canada // *Phytopathology*. – 2012. – Vol. 102. – №. 10. – P. 937-947.
129. De Boer S.H., Sasser M. Differentiation of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* and *E. carotovora* ssp. *atroseptica* on the basis of cellular fatty acid composition // *Canadian Journal of Microbiology*. – 1986. – Vol. 32. – №. 10. – P. 796-800.
130. De Boer S.H., Ward L.J. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue // *Phytopathology*. – 1995. – T. 85. – C. 854-858.
131. De Haan E.G., Dekker-Nooren T.C., Van den Bovenkamp G.W., Speksnijder A.G., Van der Zouwen P.S., Van der Wolf J.M. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates // *European Journal of Plant Pathology*. – 2008. – Vol. 122. – P. 561-569.
132. De Werra P., Bussereau F., Keiser A., Ziegler D. First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* in Switzerland // *Plant Dis.* – 2015. – Vol. 99. – №. 4. – P. 551.
133. Dees M.W., Lysøe E., Rossmann S., Perminow J., Brurberg M. B. *Pectobacterium polaris* sp. nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum*) // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2017. – Vol. 67. – №. 12. – P. 5222-5229.

134. Degefu Y., Potrykus M., Golanowska M., Virtanen E., Lojkowska E. A new clade of *Dickeya* spp. plays a major role in potato blackleg outbreaks in North Finland // *Annals of Applied Biology*. – 2013. – Vol. 162. – №. 2. – P. 231-241.
135. Degrave A., Siamer S., Boureau T., Barny M.A. The AvrE superfamily: ancestral type III effectors involved in suppression of pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity // *Molecular plant pathology*. – 2015. – Vol. 16. – №. 8. – P. 899-905.
136. Dhaliwal H.J.S., Thind T.S., Chander M. Relative activity of essential oils from plants against *Penicillium digitatum* causing post-harvest fruit rot of Kinnow mandarin // *Plant Disease Research (Ludhiana)*. – 2004. – Vol. 19. – P. 140-143.
137. Dobhal S., Boluk G., Stulberg M.J., Rascoe J., Nakhla M.K., Arif M. Comparative genomics reveals signature regions used to develop a robust and sensitive multiplex TaqMan real-time qPCR assay to detect the genus *Dickeya* and *Dickeya dianthicola* // *Journal of Applied Microbiology*. – 2020. – Vol. 128. – №. 6. – P. 1703-1719.
138. Donsì F., Ferrari G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food // *Journal of biotechnology*. – 2016. – Vol. 233. – P. 106-120.
139. Du Raan S., Coutinho T. A., Van der Waals J. E. Cardinal temperature differences, determined in vitro, between closely related species and subspecies of pectinolytic bacteria responsible for blackleg and soft rot on potatoes // *European Journal of Plant Pathology*. – 2016. – Vol. 144. – P. 361-369.
140. Duarte V., De Boer S.H., Ward L.D., De Oliveira A.M.R. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil // *Journal of applied microbiology*. – 2004. – Vol. 96. – №. 3. – P. 535-545.
141. Duncan D.B. Multiple range and multiple F test // *Biometrics*. – 1955. – Vol. 11. – P. 1-42.
142. Dye D.W. taxonomic study of the genus *Erwinia* II. The carotovora group // *NZJ Science*. – 1969. – Vol. 12. – P. 81-97.
143. Dye D.W., Bradbury J., Goto M., Hayward A.C., Lelliott R.A., Schroth M.N. International standards for naming pathovars of phytopathogenic bacteria and a list of

pathovar names and pathotype strains // *Review of Plant Pathology*. – 1980. – Vol. 59. – №. 4. – P. 153-168.

144. El Gendy A.N., Leonardi M., Mugnaini L., Bertelloni F., Ebani V.V., Nardoni S., Mancianti F., Hendawy S., Omer E., Pistelli L. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of wild and cultivated *Origanum syriacum* plants grown in Sinai, Egypt // *Industrial Crops and Products*. – 2015. – Vol. 67. – P. 201-207.

145. Evseev P.V., Lukianova A.A., Shneider M.M., Korzhenkov A.A., Bugaeva E.N., Kabanova A.P., Miroshnikov K.K., Kulikov E.E., Toshchakov S.V., Ignatov A.N., Miroshnikov K.A. Origin and evolution of Studiervirinae bacteriophages infecting *Pectobacterium*: horizontal transfer assists adaptation to new niches // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8. – №. 11. – P. 1707.

146. FAO. World Food and Agriculture—Statistical yearbook – Rome, Italy: FAO, 2022. – P. 380. ISBN. 978-92-5-136930-2

147. Fessehaie A., De Boer S.H., Lévesque C.A. Molecular characterization of DNA encoding 16S 23S rRNA intergenic spacer regions and 16S rRNA of pectolytic *Erwinia* species // *Canadian journal of microbiology*. – 2002. – Vol. 48. – №. 5. – P. 387-398.

148. Fisher K., Phillips C.A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems // *Journal of applied microbiology*. – 2006. – Vol. 101. – №. 6. – P. 1232-1240.

149. Franc G.D., Harrison M.D. The role of contaminated irrigation water in the recontamination of *Erwinia*-free seed potatoes // *American Potato Journal*. - 1987. – Vol. 64. – P. 438-438.

150. Frechon D., Exbrayat P., Helias V., Hyman L.J., Jouan B., Llop P., Lopez M.M., Payet N., Pérombelon M., Toth I. Evaluation of a PCR kit for the detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potato tubers // *Potato research*. – 1998. – Vol. 41. – P. 163-173.

151. Gallois A., Samson R., Ageron E., Grimont P.A.D. *Erwinia carotovora* subsp. *oderifera* subsp. nov, associated with odorous soft rot of chicory (*Chichorium intybus* L) //

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1992. – Vol. 42. – №. 4. – P. 582-588.

152. Gardan L., Gouy C., Christen R., Samson R. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2003. – Vol. 53. – №. 2. – P. 381-391.

153. Gevers D., Cohan F.M., Lawrence J.G., Spratt B.G., Coenye T., Feil E.J., Stackebrandt E., Van de Peer Y., Vandamme P., Thompson F.L., Swings J. Re-evaluating prokaryotic species // Nature Reviews Microbiology. – 2005. – Vol. 3. – №. 9. – P. 733-739.

154. Goto M., Matsumoto K. *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae* subsp. nov. isolated from diseased rhizomes and fibrous roots of Japanese horseradish (*Eutrema wasabi* Maxim.) // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1987. – Vol. 37. – №. 2. – P. 130-135.

155. Gudmestad N.C., Secor G.A. The bionomics of *Erwinia carotovora* in North Dakota // American potato journal. – 1983. – Vol. 60. – P. 759-771.

156. Hajhamed A.A., El-Sayed W.M.A., El-Yazied A.A., El-Ghaffar N.Y.A. Suppression of bacterial soft rot disease of potato // Egyptian Journal of Phytopathology. – 2007. – Vol. 35. – №. 2. – P. 69-80.

157. Hajian-Maleki H., Baghaee-Ravari S., Moghaddam M. Herbal essential oils exert a preservative effect against the potato soft rot disease // Scientia Horticulturae. – 2021. – Vol. 285. – P. 110192.

158. Handique U., Cao Y., Wang D., Zhang R., Li W., Sun Q., Wu J. First report of *Pectobacterium punjabense* causing blackleg and soft rot on potato in hebei and fujian province, China // Plant Disease. – 2022. – Vol. 106. – №. 7. – P. 1977.

159. Harborne J.B. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis // Chapman and Hall. – 1998.

160. Harrison M.D., Franc G.D., Maddox D.A., Michaud J.E., McCarter-Zorner N.J. Presence of *Erwinia carotovora* in surface water in North America // Journal of

Applied Bacteriology. – 1987. – Vol. 62. – №. 6. – P. 565-570.

161. Hauben L., Moore E.R., Vauterin L., Steenackers M., Mergaert J., Verdonck L., Swings J. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae // Systematic and applied microbiology. – 1998. – Vol. 21. – №. 3. – P. 384-397.

162. Hélias V., Andrivon D., Jouan B. Development of symptoms caused by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* under field conditions and their effects on the yield of individual potato plants // Plant Pathology. – 2000. – Vol. 49. – №. 1. – P. 23-32.

163. Hélias V., Hamon P., Huchet E., Wolf J.V.D., Andrivon D. Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya* // Plant pathology. – 2012. – Vol. 61. – №. 2. – P. 339-345.

164. Hibbing M.E., Fuqua C., Parsek M.R., Peterson S. B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle // Nature reviews microbiology. – 2010. – Vol. 8. – №. 1. – P. 15-25.

165. 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.

166. Hu J.H., Hong C.X., Stromberg E.L., Moorman G.W. Mefenoxam sensitivity and fitness analysis of *Phytophthora nicotianae* isolates from nurseries in Virginia, USA // Plant Pathology. – 2008. – Vol. 57. – №. 4. – P. 728-736.

167. Huang D.F., Xu J.G., Liu J.X., Zhang H., Hu Q.P. Chemical constituents, antibacterial activity and mechanism of action of the essential oil from *Cinnamomum cassia* bark against four food-related bacteria // Microbiology. – 2014. – Vol. 83. – P. 357-365.

168. Huber D., Römheld V., Weinmann M. Relationship between nutrition, plant diseases and pests // Marschner's mineral nutrition of higher plants. – Academic Press, 2012. – P. 283-298.

169. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Brochier-Armanet C., Flandrois J.-P., Reverchon S. *Dickeya poaceiphila* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from sugar cane (*Saccharum officinarum*) // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2020. – Vol. 70. – №. 8. – P. 4508-4514.

170. Hugouvieux-Cotte-Pattat N., Jacot-des-Combes C., Briolay J. *Dickeya lacustris* sp. nov., a water-living pectinolytic bacterium isolated from lakes in France // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2019. – Vol. 69. – №. 3. – P. 721-726.

171. Humphris S.N., Cahill G., Elphinstone J.G., Kelly R., Parkinson N.M., Pritchard L., Saddler G.S. Detection of the bacterial potato pathogens *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. using conventional and real-time PCR // Plant pathology: techniques and protocols. – 2015. – P. 1-16.

172. Iacobellis N.S., Lo Cantore P., Capasso F., Senatore F. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils // Journal of agricultural and food chemistry. – 2005. – Vol. 53. – №. 1. – P. 57-61.

173. Ikeura H., Kobayashi F. Antimicrobial and antifungal activity of volatile extracts of 10 herb species against *Glomerella cingulata* // International Journal of Biology. – 2015. – Vol. 7. – №. 9. – P. 77.

174. Iriarte F.B., Balogh B., Momol T., Jones J.B. Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces // Applied and environmental microbiology. – 2007. – Vol. 73. – №. 6. – P. 1704-1711.

175. Jain C., Rodriguez-R L.M., Phillippy A.M., Konstantinidis K.T., Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries // Nature communications. – 2018. – Vol. 9. – №. 1. – P. 5114.

176. Janse J. D., Ruissen M. A. *Erwinia chrysanthemi* strains from several hosts in The Netherlands // Phytopathology. – 1988. – Vol. 78. – P. 800-808.

177. Javed B., Nadhman A. Optimization, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles against plant bacterial pathogens phyto-synthesized by *Mentha longifolia* // Materials Research Express. – 2020. – Vol. 7. – №. 8. – P 085406.

178. Jianu C., Pop G., Gruia A.T., Horhat F.G. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*) and lavandin (*Lavandula x intermedia*) grown in Western Romania // International Journal of Agriculture and Biology – 2013. – Vol. 15. – №. 4. – P. 772-776.

179. Jones J.B., Jackson L.E., Balogh B., Obradovic A., Iriarte F.B., Momol M.T. Bacteriophages for plant disease control // Annual review of phytopathology. – 2007. – Vol. 45. – №. 1. – P. 245-262.
180. Joynson R., Pritchard L., Osemwekha E., Ferry N. Metagenomic analysis of the gut microbiome of the common black slug *Arion ater* in search of novel lignocellulose degrading enzymes // Frontiers in microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. 2181.
181. Kalleli F., Ghassen A.B.I.D., Salem I.B., Boughalleb-M'Hamdi N., M'Hamdi M. Essential oil from fennel seeds (*Foeniculum vulgare*) reduces *Fusarium* wilt of tomato (*Solanum lycopersicon*) // Phytopathologia Mediterranea. – 2020. – Vol. 59. – №. 1. – P. 63-76.
182. Kang D.D., Li F., Kirton E., Thomas A., Egan R., An H., Wang Z. MetaBAT 2: an adaptive binning algorithm for robust and efficient genome reconstruction from metagenome assemblies // PeerJ. – 2019. – Vol. 7. – P. e7359.
183. Kang H.W., Kwon S.W., Go S.J. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovorum* ssp. *carotovorum* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band // Plant pathology. – 2003. – Vol. 52. – №. 2. – P. 127-133.
184. Karim S., McNally R.R., Nasaruddin A.S., DeReeper A., Mauleon R.P., Charkowski A.O., Leach J.E., Ben-Hur A., Triplett L.R. Development of the automated primer design workflow uniprimer and diagnostic primers for the broad-host-range plant pathogen *Dickeya dianthicola* // Plant disease. – 2019. – Vol. 103. – №. 11. – P. 2893-2902.
185. Karjalainen R., Lehtimäki S., Toivonen M. Piilevän tyvimädän tunnistaminen perunasta PCR-tekniikalla ja taudin torjuntamahdollisuudet // Kohti huippulaatuista siemenperunaa. – 2000. – P. 47.
186. Kastelein P., Förch M. G., Krijger M. C., Van der Zouwen P. S., Van den Berg W., van der Wolf J. M. Systemic colonization of potato plants resulting from potato haulm inoculation with *Dickeya solani* or *Pectobacterium parmentieri* // Canadian Journal of Plant Pathology. – 2021. – Vol. 43. – №. 1. – P. 1-15.

187. 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.
188. Kazemi-Zaromi S., Baghaee-Ravari S., Khodaygan P., Falahati-Rastegar M. Screening bactericidal effect of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains against causal agent of potato soft rot // *Journal of basic microbiology*. – 2016. – Vol. 56. – №. 2. – P. 196-205.
189. Khayi S., Cigna J., Chong T.M., Quêtu-Laurent A., Chan K.G., Hélias V., Faure D. Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2016. – Vol. 66. – №. 12. – P. 5379-5383.
190. Khosravipour S., Rezaeian-Doloei R. Antibacterial activity of *Carum copticum* essential oil against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. – 2015.
191. Kim H.S., Thammarat P., Lommel S.A., Hogan C.S., Charkowski A.O. *Pectobacterium carotovorum* elicits plant cell death with DspE/F but the *P. carotovorum* DspE does not suppress callose or induce expression of plant genes early in plant–microbe interactions // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2011. – Vol. 24. – №. 7. – P. 773-786.
192. Kim J.O., Mueller C.W. Factor analysis: Statistical methods and practical issues. — Vol. 14. – 1978.
193. Kim M., Oh H.-S., Park S.-C., Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2014. – Vol. 64. – №. 2. – P. 346-351.
194. Kloepper J.W., Brewer J.W., Harrison M.D. Insect transmission of *Erwinia carotovora* var. *carotovora* and *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* to potato plants in the field // *American Potato Journal*. – 1981. – Vol. 58. – P. 165-175.
195. Konstantinidis K.T., Tiedje J.M. Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes // *Journal of bacteriology*. – 2005. – Vol. 187. – №. 18. – P. 6258-6264.



196. Kotan R., Cakir A., Ozer H., Kordali S., Cakmakci R., Dadasoglu F., Kazaz C., Dikbas N., Aydin T. Antibacterial effects of *Origanum onites* against phytopathogenic bacteria: Possible use of the extracts from protection of disease caused by some phytopathogenic bacteria // *Scientia Horticulturae*. – 2014. – Vol. 172. – P. 210-220.
197. Kraśniewska K., Gniewosz M., Synowiec A., Przybył J. L., Bączek K., Węglarz Z. The application of pullulan coating enriched with extracts from *Bergenia crassifolia* to control the growth of food microorganisms and improve the quality of peppers and apples // *Food and bioproducts processing*. – 2015. – Vol. 94. – P. 422-433.
198. Krzyzanowska D.M., Maciag T., Siwinska J., Krychowiak M., Jafra S., Czajkowski R. Compatible mixture of bacterial antagonists developed to protect potato tubers from soft rot caused by *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp // *Plant disease*. – 2019. – Vol. 103. – №. 6. – P. 1374-1382.
199. Krzyzanowska D.M., Potrykus M., Golanowska M., Polonis K., Gwizdek-Wisniewska A., Lojkowska E., Jafra S. Rhizosphere bacteria as potential biocontrol agents against soft rot caused by various *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. strains // *Journal of Plant Pathology*. – 2012. – P. 367-378.
200. Lambert D.H., Manzer F.E. Relationship of calcium to potato scab // *Phytopathology*. – 1991. – Vol. 81. – №. 6. – P. 632-636.
201. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics // Chichester: Wiley. – 1991. – C. 125-175.
202. Lapwood D. H., Read P. J., Spokes J. Methods for assessing the susceptibility of potato tubers of different cultivars to rotting by *Erwinia carotovora* subspecies *atroseptica* and *carotovora* // *Plant Pathology*. – 1984. – Vol. 33. – №. 1. – P. 13-20.
203. Lapwood D.H., Harris R I. The spread of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and subsp. *carotovora* from stem lesions and degenerating seed tubers to progeny tubers in soil // *Potato Research*. – 1982. – Vol. 25. – P. 41-50.
204. Laurila J., Hannukkala A., Nykyri J., Pasanen M., Hélias V., Garland L., Pirhonen M. Symptoms and yield reduction caused by *Dickeya* spp. strains isolated from potato and river water in Finland // *European Journal of Plant Pathology*. – 2010. – Vol. 126. – P. 249-262.

205. Leach J.G. The relation of the seed-corn maggot (*Phorbia fusciceps* Zett.) to the spread and development of potato blackleg in Minnesota // *Phytopathology*. – 1926. – Vol. 16. – P. 149-176.

206. Lebecka R., Flis B., Murawska Z. Comparison of temperature effects on the in vitro growth and disease development in potato tubers inoculated with bacteria *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Dickeya solani* // *Journal of Phytopathology*. – 2018. – Vol. 166. – №. 9. – P. 654-662.

207. Lebecka R., Śliwka J., Grupa-Urbańska A., Szajko K., Marczewski W. QTLs for potato tuber resistance to *Dickeya solani* are located on chromosomes II and IV // *Plant Pathology*. – 2021. – Vol. 70. – №. 7. – P. 1745-1756.

208. Lees A.K., Roberts D.M., Lynott J., Sullivan L., Brierley J.L. Real-time PCR and LAMP assays for the detection of spores of *Alternaria solani* and sporangia of *Phytophthora infestans* to inform disease risk forecasting // *Plant disease*. – 2019. – Vol. 103. – №. 12. – P. 3172-3180.

209. Lemes R.S., Alves C.C., Estevam E.B., Santiago M.B., Martins C.H., Santos T.C.D, Crotti A.E.M., Miranda M.L. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria // *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. – 2018. – Vol. 90. – P. 1285-1292.

210. 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. – №. W1. – P. W293-W296.

211. Li X., Nie J., Ward L.J., Nickerson J., De Boer S.H. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection and identification of *Pectobacterium atrosepticum* // *Canadian journal of plant pathology*. – 2011. – Vol. 33. – №. 4. – P. 447-457.

212. Liaqat N., Khan M.A., Atiq M. Influence of environmental factors on the development of potato blackleg disease // *Applied Ecology and Environmental Research*. – 2022. – Vol. 20. – №. 2. – P. 1325-1333.

213. Loc M., Milošević D., Ivanović Ž., Ignjatov M., Budakov D., Grahovac J., Grahovac M. Genetic diversity of *Pectobacterium* spp. on potato in Serbia // *Microorganisms*. – 2022. – Vol. 10. – №. 9. – P. 1840.

214. Louws F. J., Wilson M., Campbell H.L., Cuppels D.A., Jones J.B., Shoemaker P.B., Sahin F., Miller S.A. Field control of bacterial spot and bacterial speck of tomato using a plant activator // *Plant Disease*. – 2001. – Vol. 85. – №. 5. – P. 481-488.

215. 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.

216. 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*. – 2020. – Vol. 10. – P. 3147.

217. Ma B., Hibbing M.E., Kim H.-S., Reedy R.M., Yedidia I., Breuer J., Breuer J., Glasner J.D., Perna N.T., Kelman A. The host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya* // *Phytopathology*. – 2007. – Vol. 97. – P. 1150-1163.

218. Maderankova D., Jugas R., Sedlar K., Vitek M., Skutkova H. Rapid bacterial species delineation based on parameters derived from genome numerical representations // *Computational and structural biotechnology journal*. – 2019. – Vol. 17. – P. 118-126.

219. Mainello-Land A.M., Bibi S., Gugino B., Bull C.T. Multilocus sequence and phenotypic analysis of *Pectobacterium* and *Dickeya* type strains for identification of soft rot *Pectobacteriaceae* from symptomatic potato stems and tubers in Pennsylvania // *Systematic and Applied Microbiology*. – 2024. – Vol. 47. – №. 1. – P. 126476.

220. Maltas A., Dupuis B., Sinaj S. Yield and quality response of two potato cultivars to nitrogen fertilization // *Potato Research*. – 2018. – Vol. 61. – P. 97-114.

221. Mansfield J., Genin S., Magori S., Citovsky V., Sriariyanum M., Ronald P., Dow M., Verdier V., Beer S.V., Machado M.A., Toth I., Salmond G., Foster, G.D. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology // *Molecular plant pathology*. – 2012. – Vol. 13. – №. 6. – P. 614-629.

222. McCarter-Zorner N.J., Franc G.D., Harrison M.D., Michaud J.E., Quinn C.E., Sells I.A., Graham D.C. Soft rot *Erwinia* bacteria in surface and underground waters in southern Scotland and in Colorado, United States // *Journal of applied bacteriology*. – 1984. – Vol. 57. – №. 1. – P. 95-105.

223. Meier-Kolthoff J.P., Auch A.F., Klenk H.-P., Göker M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions // *BMC bioinformatics*. – 2013. – Vol. 14. – P. 1-14.

224. Meneley J.C., Stanghellini M.E. Isolation of soft rot *Erwinia* spp. from agricultural soils using an enrichment technique // *Phytopathology*. – 1976. – Vol. 66. – №. 3. – P. 367-370.

225. Mills A.A.S., Hurta R.A.R. Sensitivity of *Erwinia* spp. to salt compounds in vitro and their effect on the development of soft rot in potato tubers in storage // *Postharvest Biology and Technology*. – 2006. – Vol. 41. – №. 2. – P. 208-214.

226. Mitchell McGrath J., Williams C.E., Haberlach G.T., Wielgus S.M., Uchytel T.F., Helgeson J.P. Introgression and stabilization of *Erwinia* tuber soft rot resistance into potato after somatic hybridization of *Solanum tuberosum* and *S. brevidens* // *American journal of potato research*. – 2002. – Vol. 79. – P. 19-24.

227. Moh A.A., Massart S., Jijakli M.H., Lepoivre P. Model to predict the combined of temperature and relative humidity on *Pectobacterium atrosepticum* and *Pectobacterium carotovorum* suhsp. *carotovorum* population density and soft rot disease development at the surface of wounded potato tubers // *Journal of Plant Pathology*. – 2012. – P. 181-191.

228. Nabhan S., De Boer S.H., Maiss E., Wydra K. *Pectobacterium aroidearum* sp. nov., a soft rot pathogen with preference for monocotyledonous plants // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2013. – Vol. 63. – №. 7. – P. 2520-2525.

229. Nahar L., El-Seedi H.R., Khalifa S.A., Mohammadhosseini M., Sarker S.D. Ruta essential oils: Composition and bioactivities // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26. – №. 16. – P. 4766.
230. Nassar A., Darrasse A., Lemattre M., Kotoujansky A., Dervin C., Vedel R., Bertheau Y. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes // *Applied and environmental microbiology*. – 1996. – Vol. 62. – №. 7. – P. 2228-2235.
231. Ngoc Ha V.T., Voronina M.V., Kabanova A.P., Shneider M.M., Korzhenkov A.A., Toschakov S.V., Miroshnikov K.K., Miroshnikov K.A., Ignatov, A.N. First report of *Pectobacterium parmentieri* causing stem rot disease of potato in Russia // *Plant Disease*. – 2019. – Vol. 103. – №. 1. – P. 144-144.
232. 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 and evolution*. – 2015. – Vol. 32. – №. 1. – P. 268-274.
233. Nouri M., Baghaee-Ravari S., Emadzadeh B. Nano-emulsified savory and thyme formulation show limited efficacy to suppress *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* compared with pure oil // *Industrial Crops and Products*. – 2021. – Vol. 161. – P. 113216.
234. Nunes Leite L., De Haan E.G., Krijger M., Kastelein P., Van Der Zouwen P.S., Van Den Bovenkamp G.W., Tebaldi N.D., Van Der Wolf J.M. First report of potato blackleg caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* in the Netherlands // *New Disease Reports*. – 2014. – Vol. 29. – P. 24.
235. Nykyri J., Fang X., Dorati F., Bakr R., Pasanen M., Niemi O., Palva E.T., Jackson R.W., Pirhonen M. Evidence that nematodes may vector the soft rot-causing enterobacterial phytopathogens // *Plant Pathology*. – 2014. – Vol. 63. – №. 4. – P. 747-757.
236. Nykyri J., Niemi O., Koskinen P., Nokso-Koivisto J., Pasanen M., Broberg M., Plyusnin I., Törönen P., Holm L., Pirhonen M., Palva E.T. Revised phylogeny and novel horizontally acquired virulence determinants of the model soft rot phytopathogen

*Pectobacterium wasabiae* SCC3193 // PLoS Pathogens. – 2012. – Vol. 8. – №. 11. – P. e1003013.

237. Ocenar J., Arizala D., Boluk G., Dhakal U., Gunarathne S., Paudel S., Dobhal S., Arif M. Development of a robust, field-deployable loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for specific detection of potato pathogen *Dickeya dianthicola* targeting a unique genomic region // PLoS One. – 2019. – Vol. 14. – №. 6. – P. e0218868.

238. Oliva M.D.L.M., Carezzano M.E., Giuliano M., Daghero J., Zygadlo J., Bogino P., Giordano W., Demo M. Antimicrobial activity of essential oils of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* on phytopathogenic strains isolated from soybean // Plant Biology. – 2015. – Vol. 17. – №. 3. – P. 758-765.

239. Ossowska K., Motyka-Pomagruk A., Kaczyńska N., Kowalczyk A., Sledz W., Lojkowska E., Kaczyński Z. Heterogenicity within the LPS structure in relation to the chosen genomic and physiological features of the plant pathogen *Pectobacterium parmentieri* // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – №. 4. – P. 2077.

240. Oulghazi S., Cigna J., Lau Y.Y., Moumni M., Chan K.G., Faure D. Transfer of the waterfall source isolate *Pectobacterium carotovorum* M022 to *Pectobacterium fontis* sp. nov., a deep-branching species within the genus *Pectobacterium* // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2019a. – Vol. 69. – №. 2. – P. 470-475.

241. Oulghazi S., Pédrón J., Cigna J., Lau Y.Y., Moumni M., Van Gijsegem F., Chan K.-G., Faure, D. *Dickeya undicola* sp. nov., a novel species for pectinolytic isolates from surface waters in Europe and Asia // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2019b. – Vol. 69. – №. 8. – P. 2440-2444.

242. Palafox-Leal N.L., Castillo Batista J.C., Santos-Cervantes M.E., Méndez-Lozano J., Rodríguez-Negrete E.A., Cervantes-Cárdenas L.A., Leyva-López N.E. *Pectobacterium punjabense* causing soft rot and blackleg of potato in Sinaloa, Mexico // European Journal of Plant Pathology. – 2024. – Vol. 168. – №. 1. – P. 29-37.

243. Parena A.J.S., Silva B.B.I., Mercado R.M.L., Sendon A.A.A., Signabon F.B., Balidion J.F., Encabo J.R. Lytic phages display protective effects against soft rot-causing *Pectobacterium* sp // *Biocontrol Science and Technology*. – 2022. – Vol. 32. – №. 11. – P. 1326-1345.

244. Parkinson N., DeVos P., Pirhonen M., Elphinstone J. *Dickeya aquatica* sp. nov., isolated from waterways // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2014. – Vol. 64. – №.7. – P. 2264-2266.

245. Parkinson N., Stead D., Bew J., Heeney J., Tsrer L., Elphinstone J. *Dickeya* species relatedness and clade structure determined by comparison of *recA* sequences // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2009. – Vol. 59. – №. 10. – P. 2388-2393.

246. Parks D.H., Imelfort M., Skennerton C.T., Hugenholtz P., Tyson G.W. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes // *Genome research*. – 2015. – Vol. 25. – №. 7. – P. 1043-1055.

247. Pasanen M. Characterization of *Pectobacterium* strains causing soft rot and blackleg of potato in Finland: diss. – Doctoral dissertation, University of Helsinki. – 2020a. – 78 p.

248. Pasanen M., Waleron M., Schott T., Cleenwerck I., Misztak A., Waleron K., Pirhonen M. *Pectobacterium parvum* sp. nov., having a *Salmonella* SPI-1-like Type III secretion system and low virulence // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2020b. - Vol. 70. - № 4. - P. 2440–2448.

249. Pédrón J., Bertrand C., Taghouti G., Portier P., Barny M.A. *Pectobacterium aquaticum* sp. nov., isolated from waterways // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2019. – Vol. 69. – №. 3. – P. 745-751.

250. Peltzer S., Sivasithamparam K. Sero-groups of *Erwinia carotovora* associated with water, soil, tuber, and stems of potato plants in Western Australia // *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*. – 1988. – Vol. 16. – №. 3. – P. 265-270.

251. Pemberton C. L., Whitehead N.A., Sebaihia M., Bell K.S., Hyman L.J., Harris S.J., Matlin A.J., Robson N.D., Birch P.R.J., Carr J.P., Toth I.K., Salmond, G. P. C. Novel quorum-sensing-controlled genes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: identification

of a fungal elicitor homologue in a soft-rotting bacterium // Molecular plant-microbe interactions. – 2005. – Vol. 18. – №. 4. – P. 343-353.

252. Pérez-Mendoza D., Coulthurst S.J., Humphris S., Campbell E., Welch M., Toth I.K., Salmond G.P. A multi-repeat adhesin of the phytopathogen, *Pectobacterium atrosepticum*, is secreted by a Type I pathway and is subject to complex regulation involving a non-canonical diguanylate cyclase // Molecular microbiology. – 2011. – Vol. 82. – №. 3. – P. 719-733.

253. Pérombelon M.C.M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis // Plant pathology. – 2002. – Vol. 51. – №. 1. – P. 1-12.

254. Pérombelon M.C.M., Lumb V.M., Zutra D., Hyman L.J., Burnett E.M. Factors affecting potato blackleg development // Vascular wilt diseases of plants: Basic studies and control. – Springer Berlin Heidelberg, 1989. – P. 421-431.

255. Pérombelon M.C.M., Salmond G.P.C. Bacterial soft rots // Prokaryotes. – Pergamon, 1995. – P. 1-20.

256. Pethybridge S.J., Nelson S.C. Leaf Doctor: A New Portable Application for Quantifying Plant Disease Severity // Plant Disease. – 2015. – Vol. 99. – № 10. – P. 1310–1316.

257. Phillips J.A, Kelman A. Direct fluorescent antibody stain procedure applied to insect transmission of *Erwinia carotovora* // Phytopathology. – 1982. – Vol. 72. – P. 898-901.

258. Pitman A.R., Wright P.J., Galbraith M.D., Harrow S.A. Biochemical and genetic diversity of pectolytic enterobacteria causing soft rot disease of potatoes in New Zealand // Australasian Plant Pathology. – 2008. – Vol. 37. – P. 559-568.

259. Pöllumaa L., Alamäe T., Mäe A. Quorum sensing and expression of virulence in pectobacteria // Sensors. - 2012. - Vol. 12. - № 3. - P. 3327–3349.

260. Portier P., Pédrón J., Taghouti G., Fischer-Le Saux M., Caullireau E., Bertrand C., Laurent A., Chawki K., Oulgazi S., Moumni M., Andrivon D., Dutrieux C., Faure D., Hélias V., Barny M.-A. Elevation of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum* to species level as *Pectobacterium odoriferum* sp. nov., proposal of *Pectobacterium brasiliense* sp. nov. and *Pectobacterium actinidiae* sp. nov., emended description of



*Pectobacterium carotovorum* and description of *Pectobacterium versatile* sp. nov., isolated from streams and symptoms on diverse plants // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2019. – Vol. 69. – №. 10. – P. 3207-3216.

261. Pritchard L., Glover R.H., Humphris S., Elphinstone J.G., Toth I.K. Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: soft-rotting enterobacterial plant pathogens // Analytical methods. – 2016. – Vol. 8. – №. 1. – P. 12-24.

262. Pritchard L., Humphris S., Saddler G.S., Parkinson N.M., Bertrand V., Elphinstone J.G. Detection of phytopathogens of the genus *Dickeya* using a PCR primer prediction pipeline for draft bacterial genome sequences // Plant pathology. – 2013. – Vol. 62. – №. 3. – P. 587-596.

263. Qiao K., Liu Q., Huang Y., Xia Y., Zhang S. Management of bacterial spot of tomato caused by copper-resistant *Xanthomonas perforans* using a small molecule compound carvacrol // Crop protection. – 2020. – Vol. 132. – P. 105114.

264. 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. – №. 1. – P. 37-44.

265. Raoul des Essarts Y., Cigna J., Quêtu-Laurent A., Caron A., Munier E., Beury-Cirou A., Hélias V., Faure D. Biocontrol of the potato blackleg and soft rot diseases caused by *Dickeya dianthicola* // Applied and environmental microbiology. – 2016. – Vol. 82. – №. 1. – P. 268-278.

266. Ravari S.B., Moslemkhani K., Khodaygan P. Assessment of genetic variability of prevalent pectinolytic bacteria causing potato tuber soft rot in eastern Iran // Journal of Plant Pathology. – 2013. – P. 107-113.

267. Redfern J., Kinninmonth M., Burdass D., Verran J. Using soxhlet ethanol extraction to produce and test plant material (essential oils) for their antimicrobial properties // Journal of microbiology & biology education. – 2014. – Vol. 15. – №. 1. – P. 45-46.

268. Rojas F.M.M., Corzo L.M., Sánchez P.Y., Brito D., Montes de O.R., Martínez Y., Pino P.O. Antibacterial activity of essential oils against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. // Revista de Protección Vegetal. – 2014. – Vol. 29. – №. 3. – P. 197-

203.

269. Rossmann S., Dees M.W., Torp T., Le V.H., Skogen M., Glorvigen B., Brurberg M. B. Field-scale molecular testing of virulent potato soft rot Pectobacteriaceae in Norway // *European journal of plant pathology*. – 2020. – Vol. 156. – P. 501-517.

270. Salamon I., Kryvtsova M., Bucko D., Tarawneh A. H. Chemical characterization and antimicrobial activity of some essential oils after their industrial large-scale distillation // *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences*. – 2019. – Vol. 8. – №. 4. – P. 984-988.

271. Šalplachta J., Kubesová A., Horký J., Matoušková H., Tesařová M., Horká M. Characterization of *Dickeya* and *Pectobacterium* species by capillary electrophoretic techniques and MALDI-TOF MS // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2015. – Vol. 407. – P. 7625-7635.

272. Sameza M.L., Nguemnang Mabou L.C., Tchameni S.N., Boat Bedine M.A., Tchoumboungang F., Jazet Dongmo P.M., Boyom Fekam F. Evaluation of clove essential oil as a mycobiocide against *Rhizopus stolonifer* and *Fusarium solani*, tuber rot causing fungi in yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) // *Journal of Phytopathology*. – 2016. – Vol. 164. – №. 7-8. – P. 433-440.

273. Samson R., Legendre J.B., Christen R., Saux M.F.L., Achouak W., Gardan L. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2005. – Vol. 55. – №. 4. – P. 1415-1427.

274. Sánchez N., Plaza J., Criado M., Pérez-Sánchez R., Gómez-Sánchez M.Á., Morales-Corts M.R., Palacios C. The Second Derivative of the NDVI Time Series as an Estimator of Fresh Biomass: A Case Study of Eight Forage Associations Monitored via UAS // *Drones*. – 2023. – Vol. 7. – №. 6. – P. 347.

275. Sarfraz S., Oulghazi S., Cigna J., Sahi S.T., Riaz K., Tufail M.R., Faure D., Fayyaz A., Naveed K., Hameed A., Lopez-Roques C. Complete genome sequence of the

type strain *Pectobacterium punjabense* SS95, isolated from a potato plant with blackleg symptoms // *Microbiology Resource Announcements*. – 2020. – Vol. 9. – №. 32. – P. e00420-20.

276. Sarfraz S., Riaz K., Oulghazi S., Cigna J., Sahi S.T., Khan S.H., Faure D. *Pectobacterium punjabense* sp. nov., isolated from blackleg symptoms of potato plants in Pakistan // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. – 2018. – Vol. 68. – №. 11. – P. 3551-3556.

277. Sawada H., Someya N., Morohoshi T., Ono M., Satou M. *Pectobacterium araliae* sp. nov., a pathogen causing bacterial soft rot of Japanese angelica tree in Japan // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2024. – Vol. 74. – №. 4. – P. 006326.

278. Schneider R.W., Williams R.J., Sinclair J.B. *Cercospora* leaf spot of cowpea: models for estimating yield loss // *Phytopathology*. – 1976. – Vol. 66. – №. 4. – P. 384-388.

279. Scortichini M. The population structure of some plant pathogenic bacteria: an ecological and adaptive perspective // *Journal of Plant Pathology*. – 2005. – P. 5-12.

280. Shirshikov F.V., Korzhenkov A.A., Miroshnikov K.K., Kabanova A.P., Barannik A P., Ignatov A.N., Miroshnikov K.A. Draft genome sequences of new genomospecies “*Candidatus Pectobacterium maceratum*” strains, which cause soft rot in plants // *Genome Announcements*. – 2018. – Vol. 6. – №. 15. – P. e00260-18.

281. Shneider M.M., Lukianova A.A., Evseev P.V., Shpirt A.M., Kabilov M.R., Tokmakova A.D., Obratsova E.A., Baturina O.A., Shashkov A.S., Ignatov A.N., Knirel Y.A., Miroshnikov K.A. Autographivirinae bacteriophage Arno 160 infects *Pectobacterium carotovorum* via depolymerization of the bacterial O-polysaccharide // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – Vol. 21. – №. 9. – P. 3170.

282. Silva F., Ferreira, S., Queiroz, J. A., Domingues, F. C. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry // *Journal of medical microbiology*. – 2011. – Vol. 60. – №. 10. – P. 1479-1486.

283. Sima A., Mozafari J., Nader H., Cobra M. In vitro evaluation of resistant of potato cultivars against black leg disease (*Pectobacterium atrosepticum*) // *Biological Forum—An International Journal*. – 2015. – Vol. 7. – №. 2. – P. 1087-1094.

284. Sławiak M., Van Beckhoven J.R., Speksnijder A.G., Czajkowski R., Grabe G., Van der Wolf J.M. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe // *European Journal of Plant Pathology*. - 2009. - Vol. 125. - № 2. - P. 245–261.

285. Soltan H.R., Ahmed S.M., Emam D.A. Comparative antibacterial activity of garlic essential oil extracted by hydro-distillation and diethyl ether extraction methods on four pathogenic bacteria // *Adv Plants Agric Res*. – 2016. – Vol. 4. – №. 2. – P. 261-264.

286. Sookto T., Srithavaj T., Thaweboon S., Thaweboon B., Shrestha B. In vitro effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans* // *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. – 2013. – Vol. 3. – №. 5. – P. 376-380.

287. Sueno W.S.K., Marrero G., de Silva A.S., Sether D.M., Alvarez A.M. Diversity of *Dickeya* strains collected from pineapple plants and irrigation water in Hawaii // *Plant Disease*. – 2014. – Vol. 98. – №. 6. – P. 817-824.

288. Svircev A., Roach D., Castle A. Framing the future with bacteriophages in agriculture // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10. – №. 5. – P. 218.

289. Taylor D., Charkowski A.O., Zeng Y. Laboratory assays used to rank potato cultivar tolerance to blackleg showed that tuber vacuum infiltration results correlate with field observations // *Plant Disease*. – 2021. – Vol. 105. – №. 3. – P. 585-591.

290. Thomson S.V., Hildebrand D.C., Schroth M.N. Identification and Nutritional Differentiation of the *Erwinia* Sugar Beet Pathogen from Members of *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi* // *Phytopathology*. – 1981. – Vol. 71. – №. 10. – P. 1037-1042.

291. Tian Y., Zhao Y., Yuan X., Yi J., Fan J., Xu Z., Hu B., De Boer S.H., Li X. *Dickeya fangzhongdai* sp. nov., a plant-pathogenic bacterium isolated from pear trees (*Pyrus pyrifolia*) // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2016. – Vol. 66. – №. 8. – P. 2831-2835.

292. Toth I. K. Microbe profile: *Pectobacterium atrosepticum*: an enemy at the door // *Microbiology*. – 2022. – Vol. 168. – №. 8. – P. 001221.

293. Toth I.K., Barny M.A., Brurberg M.B., Condemine G., Czajkowski R., Elphinstone J.G., Helias V., Johnson S.B., Moleleki L.N., Pirhonen M., Rossman S., Tsrer L., Van der Waals J., Van der Wolf J., Van Gijsegem F., Yedidia I. *Pectobacterium* and *Dickeya*: Environment to Disease Development // *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*. – Springer: Cham, Switzerland. - 2021. – C. 39-84.

294. Toth I.K., Van der Wolf J.M., Saddler G., Lojkowska E., Helias V., Pirhonen M., Tsrer L., Elphinstone J.G. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe // *Plant Pathology*. - 2011. - Vol. 60. - № 3. - P. 385–399.

295. Tsrer L., Ben-Daniel B., Chalupowicz L., Van der Wolf J.M., Lebiush S., Erlich O., Dror O., Barel V., Nijhuis E., Manulis-Sasson S. Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato grown under hot-climate conditions // *Plant Pathology*. – 2013. – Vol. 62. – №. 5. – P. 1097-1105.

296. Tsrer L., Erlich O., Lebiush S., Hazanovsky M., Zig U., Slawiak M., Grabe G., Van der Wolf J.M., Van de Haar J.J. Assessment of recent outbreaks of *Dickeya* sp. (syn. *Erwinia chrysanthemi*) slow wilt in potato crops in Israel // *European Journal of Plant Pathology*. – 2009. – Vol. 123. – P. 311-320.

297. Tsuda K., Tsuji G., Higashiyama M., Ogiyama H., Umemura K., Mitomi M., Kubo Y., Kosaka Y. Biological control of bacterial soft rot in Chinese cabbage by *Lactobacillus plantarum* strain BY under field conditions // *Biological Control*. – 2016. – Vol. 100. – P. 63-69.

298. Van der Wolf J., Bergsma-Vlami M. *Dickeya* species in potato and management strategies. – 2013. – 20 p.

299. Van der Wolf J., De Haan E., Kastelein P., Krijger M., De Haas B., Velvis H., Mendes O., Kooman-Gersmann M., Van Der Zouwen P.S. Virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* on potato compared with that of other *Pectobacterium* and *Dickeya* species under climatic conditions prevailing in the Netherlands // *Plant Pathology*. – 2017. – Vol. 66. – №. 4. – P. 571-583.

300. Van der Wolf J.M., Cahill G., Van Gijsegem F., Helias V., Humphris S., Li X., Lojkowska E., Pritchard L. Isolation, detection and characterization of *Pectobacterium* and *Dickeya* Species // *Plant Diseases Caused by Dickeya and*

Pectobacterium Species. – 2021a. – C. 149-173.

301. Van der Wolf J.M., Czajkowski R.L., Velvis H. Effectieve kolonisatie van aardappelplanten door Dickeya-soorten (*Erwinia chrysanthemi*): Themanummer fyto bacteriologie // Gewasbescherming. – 2009. – Vol. 40. – №. 4. – P. 169-171.

302. Van der Wolf J.M., De Boer S.H. Bacterial pathogens of potato // Potato biology and biotechnology, advances and perspectives. – Oxford, UK: Elsevier Science BV. – 2007. - P. 595–619.

303. Van der Wolf J.M., De Boer, S.H., Czajkowski R., Cahill G., Van Gijsegem F., Davey T., Dupuis B., Ellicott J., Jafra S., Kooman M., Toth I.K., Tsrer L., Yedidia I., Van der Waals J.E. Management of Diseases Caused by Pectobacterium and Dickeya Species // Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species. – Springer, 2021b. – P. 175-214.

304. Van der Wolf J.M., Nijhuis E.H., Kowalewska M.J., Saddler G.S., Parkinson N., Elphinstone J.G., Pritchard L., Toth I.K., Lojkowska E., Potrykus M., Waleron M., de Vos P., Cleenwerck I., Pirhonen M., Garland L., Hélias V., Pothier J.F., Pflüger V., Duffy B., Tsrer L., Manulis S. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*) // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2014a. – Vol. 64. – №. 3. – P. 768-774.

305. Van der Wolf J.M., Nijhuis E.H., Kowalewska M.J., Saddler G.S., Parkinson N., Elphinstone J.G., Pritchard L., Toth I.K., Lojkowska E., Potrykus M., Waleron M., de Vos P., Cleenwerck I., Pirhonen M., Garland L., Hélias V., Pothier J.F., Pflüger V., Duffy B., Tsrer L., Manulis S. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*) // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2014b. – Vol. 64. – №. 3. – P. 768-774.

306. Van Doorn J.V., Vreeburg P.J.M., Leeuwen P.J.V., Dees R.H.L. The presence and survival of soft rot (*Erwinia*) in flower bulb production systems // Materials of the Conference X International Symposium on flower bulbs and herbaceous perennials Lisse, Netherlands. – Netherlands: *Acta Horticulturae*. – 2011. – C. 365-379.

307. Varympopi A., Dimopoulou A., Theologidis I., Karamanidou T., Kaldeli Kerou A., Vlachou A., Karfaridis D., Papafotis D., Hatzinikolaou D.G., Tsouknidas A.,

Skandalis N. Bactericides based on copper nanoparticles restrain growth of important plant pathogens // *Pathogens*. – 2020. – Vol. 9. – №. 12. – P. 1024.

308. Vasilchenko A. S., Poshvina D. V., Sidorov R. Y., Iashnikov A. V., Rogozhin E. A., Vasilchenko A. V. Oak bark (*Quercus* sp. cortex) protects plants through the inhibition of quorum sensing mediated virulence of *Pectobacterium carotovorum* // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2022. – Vol. 38. – №. 11. – P. 1-12.

309. Vasilyeva A.A., Evseev P.V., Ignatov A.N., Dzhililov F.S.U. *Pectobacterium punjabense* Causing Blackleg and Soft Rot of Potato: The First Report in the Russian Federation // *Plants*. – 2024. – Voll. 13. – №. 15. – P. 2144.

310. Vieira V., Pereira C., Abreu R. M., Calhella R. C., Alves M. J., Coutinho J. A., Ferreira O., Barros L., Ferreira I. C. Hydroethanolic extract of *Juglans regia* L. green husks: A source of bioactive phytochemicals // *Food and Chemical Toxicology*. – 2020. – Vol. 137. – P. 111189.

311. Voronina M.V., Bugaeva E.N., Vasiliev D.M., Kabanova A.P., Barannik A.P., Shneider M.M., Kulikov E.E., Korzhenkov A.A., Toschakov S.V., Ignatov A.N., Miroshnikov K.A. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* bacteriophage PP16 prospective for biocontrol of potato soft rot // *Microbiology*. – 2019b. – Vol. 88. – P. 451-460.

312. Voronina M.V., Kabanova A.P., Shneider M.M., Korzhenkov A.A., Toschakov S.V., Miroshnikov K.A., Ignatov A.N., Shneider M.M., Korzhenkov A.A., Toschakov S.V., Miroshnikov K.K. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing blackleg and stem rot disease of potato in Russia // *Plant Disease*. – 2019a. – Vol. 103. – №. 2. – P. 364-364.

313. Voronina M.V., Lukianova A.A., Shneider M.M., Korzhenkov A.A., Toschakov S.V., Miroshnikov K.A., Vasiliev D.M., Ignatov A. N. First report of *Pectobacterium polaris* causing soft rot and blackleg of potato in Russia // *Plant Disease*. – 2021. – Vol. 105. – №. 6. – P. 1851.

314. Waldee E.L. Comparative studies of some peritrichous phytopathogenic bacteria // *Journal Science of the Iowa State College*. – 1945. – Vol. 19. – P. 435–4484.

315. Waleron A.O. The changing face of bacterial soft-rot diseases // Annual review of phytopathology. – 2018a. – Vol. 56. – №. 1. – P. 269-288.

316. Waleron M., Misztak A., Waleron M., Franczuk M., Jońca J., Wielgomas B., Mikiciński A., Popović T., Waleron K. *Pectobacterium zantedeschiae* sp. nov. a new species of a soft rot pathogen isolated from Calla lily (*Zantedeschia* spp.) // Systematic and Applied Microbiology. – 2019a. – Vol. 42. – №. 3. – P. 275-283.

317. Waleron M., Misztak A., Waleron M., Franczuk M., Wielgomas B., Waleron K. Transfer of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains isolated from potatoes grown at high altitudes to *Pectobacterium peruviense* sp. nov. // Systematic and Applied Microbiology. – 2018b. - Vol. 41. - № 2. - P. 85–93.

318. Waleron M., Misztak A., Waleron M., Jonca J., Furmaniak M., Waleron K. *Pectobacterium polonicum* sp. nov. isolated from vegetable fields // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2019b. – Vol. 69. – №. 6. – P. 1751-1759.

319. Waleron M., Waleron K., Lojkowska E. Occurrence of *Pectobacterium wasabiae* in potato field samples // European Journal of Plant Pathology. – 2013. – Vol. 137. – P. 149-158.

320. Wang X., He S.-W., Guo H.-B., Han J.-G., Thin K.K., Gao J.-S., Yao Wang Y., Zhang X.-X. *Dickeya oryzae* sp. nov., isolated from the roots of rice // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2020. – Vol. 70. – №. 7. – P. 4171-4178.

321. White P.J., Broadley M.R. Calcium in plants // Annals of botany. – 2003. – Vol. 92. – №. 4. – P. 487-511.

322. Wicks T.J., Hall B.H., Morgan B.A. Tuber soft rot and concentrations of *Erwinia* spp. in potato washing plants in South Australia // Australasian Plant Pathology. – 2007. – Vol. 36. – P. 309-312.

323. Winslow C.E., Broadhurst J., Buchanan R.E., Krumwiede C., Rogers L.A., Smith G.H. The families and genera of the bacteria final report of the committee of the society of American bacteriologists on characterization and classification of bacterial types // Journal of bacteriology. – 1920. – Vol. 5. – №. 3. – P. 191-229.



324. Yang X.N., Kang S.C. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oil from Korean Citrus unshiu peel // *Journal of Agricultural chemistry and Environment*. – 2013. – Vol. 2. – №. 3. – P. 42-49.

325. Yasuhara-Bell J., Marrero G., Arif M., de Silva A., Alvarez A.M. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Dickeya* spp // *Phytopathology*. – 2017. – Vol. 107. – №. 11. – P. 1339-1345.

326. Young J.M., Saddler G.S., Takikawa Y., De Boer S.H., Vauterin L., Gardan L., Gvozdyak R.I., Stead D.E. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995 // *Review of Plant Pathology*. – 1996. – Vol. 75. – №. 9. – P. 721-763.

327. Zaczek-Moczydłowska M.A., Fleming C.C., Young G.K., Campbell K., O'Hanlon R. *Pectobacterium* and *Dickeya* species detected in vegetables in Northern Ireland // *European Journal of Plant Pathology*. – 2019. – Vol. 154. – P. 635-647.

328. Zaczek-Moczydłowska M.A., Young G.K., Trudgett J., Plahe C., Fleming C.C., Campbell K., O'Hanlon R. Phage cocktail containing Podoviridae and Myoviridae bacteriophages inhibits the growth of *Pectobacterium* spp. under in vitro and in vivo conditions // *PLoS One*. – 2020. – Vol. 15. – №. 4. – P. e0230842.

329. Zaouali Y., Bouzaine T., Boussaid M. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities // *Food and chemical toxicology*. – 2010. – Vol. 48. – №. 11. – P. 3144-3152.

330. Zhou J., Hu M., Hu A., Li C., Ren X., Tao M., Xue Y., Chen S., Tang C., Xu Y., Zhang L., Zhou, X. Isolation and genome analysis of *Pectobacterium colocasium* sp. nov. and *Pectobacterium aroidearum*, two new pathogens of taro // *Frontiers in Plant Science*. – 2022. – Vol. 13. – P. 852750.

331. Zijlstra C., Groenenboom-De Haas L., Krijger M., Verstappen E., Warris S., De Haan E., Van der Wolf J.M. Development and evaluation of two TaqMan assays for generic detection of *Dickeya* species // *European Journal of Plant Pathology*. – 2020. – Vol. 156. – P. 311-316.

332. Zimnoch-Guzowska E., Marczewski W., Lebecka R., Flis B., Schäfer-Pregl R., Salamini F., Gebhardt C. QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia*

carotovora ssp. atroseptica in potato done by AFLP, RFLP, and resistance-gene-like markers // Crop Science. – 2000. – Vol. 40. – №. 4. – P. 1156-1167.

333. Информационный ресурс Полевой опытной станции РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева [Электронный ресурс] – <https://www.timacad.ru/about/struktura-universiteta/nauchnye-podrazdeleniia/polevaia-opytnaia-stantsiia> (дата обращения 4 мая 2024 года).

334. ФГБНУ «Госсортокомиссия» - Государственный реестр селекционных достижений [Электронный ресурс] – <https://gossortrf.ru/> (дата обращения 4 мая 2024 года).

335. Экспертно-аналитический центр агробизнеса. О производстве картофеля и овощей в России: данные на 2023 год [Электронный ресурс] – <https://ab-centre.ru/news/o-proizvodstve-kartofelya-i-ovoschey-v-rossii-dannye-na-2023-god> (дата обращения 16.08.2024).

336. Экспертно-аналитический центр агробизнеса. Посевные площади картофеля в России в 2024 году, прогноз сборов [Электронный ресурс] – <https://ab-centre.ru/news/posevnye-ploschadi-kartofelya-v-rossii-v-2024-godu-prognoz-sborov> (дата обращения 20.08.2024).

337. Экспертно-аналитический центр агробизнеса. Производство картофеля в России: итоги за 2023 год [Электронный ресурс] – <https://ab-centre.ru/news/proizvodstvo-kartofelya-v-rossii-itogi-za-2023-god> (дата обращения 18.08.2024).

338. FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations [Электронный ресурс] – <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (дата обращения 10.07.2024).