

На правах рукописи

ТАРАКАНОВ РАШИТ ИСЛЯМОВИЧ

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

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена на кафедре защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Научный руководитель: **Джалилов Февзи Сеид-Умерович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Официальные оппоненты: **Торопова Елена Юрьевна**, доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры защиты растений ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный аграрный университет»

Словарева Ольга Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник – и.о. начальника научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»

Ведущая организация: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»

Защита диссертации состоится 27 июня 2024 г. в 14 часов 30 минут на заседании диссертационного совета 35.2.030.05, созданного на базе ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» по адресу: 127434, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 19, тел/факс: 8 (499) 976-17-14.

Юридический адрес для отправки почтовой корреспонденции (отзывов): 127434, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке имени Н.И. Железнова ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» и на сайте Университета: <http://www.timacad.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 35.2.030.05,
кандидат биологических наук, доцент

И.М. Митюшев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Среди болезней бактериальной этиологии сои наиболее вредоносными являются бактериальный ожог (возбудитель – *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, далее – Psg) и ржаво-бурая бактериальная пятнистость (возбудитель – *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, далее – Cff). Данные болезни могут снизить качество и урожайность культуры до 40% (Jagtap, 2012; Soares et al., 2013).

В связи с тем, что возбудители данных болезней, в основном распространяются через семена, а существующие методы приводят к ошибкам и обладают низкой чувствительностью, необходима разработка новых методов оценки заражённости семян (Hosseini, 2023; Ahangaran, 2006; Gardan, 1999). С другой стороны, остаются неясными некоторые биологические особенности штаммов-возбудителей бактериозов сои, циркулирующих на территории РФ (например, штаммовый состав, агрессивность, расовая дифференциация и возможная устойчивость к применяемым фунгицидам).

Существующие меры борьбы с бактериозами сои не дают высокого эффекта от применения (Anaеle, 1990; Курилова, 2021). С другой стороны, ассортимент разрешённых для применения фунгицидов крайне скуден (разрешено для применения всего 5 фунгицидов), и требуется проведение исследований для выявления антибактериального действия других фунгицидов. Помимо этого, в связи с трендом на биологизацию растениеводства и с принятием Федерального закона № 280-ФЗ «Об органической продукции...», необходима разработка альтернативных малоопасных экологичных средств защиты сои, в т.ч. от бактериальных болезней (Долженко, 2018). В данном контексте биологическое обоснование использования бактериофагов, веществ растительного происхождения и наночастиц хитозана в комплексах с медью в борьбе с бактериальными болезнями сои является актуальной задачей.

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

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

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

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

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

Научная новизна. Впервые проведена характеристика биологических свойств штаммов возбудителей бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания сои, выделенных на территории России. Для штаммов Psg показана низкая степень генетического полиморфизма, для Cff – высокая. Показано, что все штаммы Psg относились к расе 4, доминирующей во всём мире. Анализ восприимчивости штаммов Cff показал, что штаммы, выделенные с сои, были генетически близки к штаммам из сорных растений, что может указывать на их возможную роль как дополнительного источника инфекции. Впервые разработана мультиплексная система на основе метода ПЦР-РВ для одновременной диагностики Psg и Cff в семенах сои. Впервые выявлено антибактериальное действие и оценена эффективность применения на искусственном инфекционном фоне бактериофагов Psg и Cff. Впервые проведено тестирование антибактериальной активности веществ растительного происхождения (19 эфирных масел и 19 растительных экстрактов) в отношении Psg и Cff и показана эффективность их применения на искусственном инфекционном фоне болезней. Проведено тестирование реакции сортов сои на заражение штаммами Psg и Cff и показана их сильная сортовая дифференциация по восприимчивости. Показана высокая антибактериальная активность нового класса действующих веществ фунгицидов (четвертичные аммониевые соединения) в отношении возбудителей бактериозов сои.

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

Методология и методы диссертационного исследования. Диссертационная работа выполнена с использованием современного оборудования и методик, разработанных ведущими учеными в этой области исследований: А. М. Лазаревым, Е. Osdaghi, S. Tegli, L. Gardan, P.M. Guimaraes, A.C. Maringoni, Е.В. Матвеевой, А.Н. Игнатовым, Ф.С.-У. Джалиловым и другими. Более подробное

описание представлено в разделе «Материалы и методы исследований» диссертации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разнообразие штаммов-возбудителей бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости и увядания сои, выделенных на территории РФ.

2. Система мультиплексной диагностики методом ПЦР-РВ, рекомендуемая для анализа образцов семян сои на зараженность Psg и Cff.

3. Устойчивость некоторых сортов сои к бактериальным болезням.

4. Бактериофаги, растительные экстракты и эфирные масла, комплекс наночастиц хитозана и меди и некоторые фунгициды снижают заражённость сои бактериальным ожогом и ржаво-бурой бактериальной пятнистостью и увяданием.

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

Работа стала призёром в номинации «Аспиранты и молодые учёные» заключительного (федерального) этапа Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых учёных вузов Министерства сельского хозяйства РФ (Краснодар, 18 – 19 мая 2023 г.) и награждена золотой медалью в конкурсе «За достижения в области инноваций в АПК» в номинации «За достижения в области сельскохозяйственной науки» в рамках мероприятий деловой программы 32-ой международной агропромышленной выставки-ярмарки «АГРОРУСЬ – 2023» (Санкт-Петербург, 30 августа – 1 сентября 2023 г.).

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

Личный вклад соискателя. Диссертационное исследование выполнено автором в процессе обучения в аспирантуре и работы на кафедре защиты растений в ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет — МСХА имени К.А. Тимирязева». Автор принимал непосредственное участие в планировании и проведении лабораторных, вегетационных и полевых экспери-

ментов, анализе и обобщении результатов исследований, представленных в диссертации. Часть исследований выполнена совместно с сотрудниками ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, ФГБУН «Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского» РАН, ГК «Союзснаб» и ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

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

Структура и объем работы. Диссертация включает введение, 3 главы, заключение, список литературы включает 327 наименований, в том числе 293 иностранных публикаций. Объём диссертации - 231 страница, содержит 19 таблиц, 53 рисунка, 12 приложений.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре проанализированы научные сведения, связанные с темой исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на базе кафедры защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Материалом служила коллекция из 13 штаммов Psg, и 39 – Cff, выделенных из различных регионов России и разных стран мира, семена 47 сортов сои, а также, эфирные масла и растительные экстракты 19 видов растений, 4 изолята бактериофагов Psg и Cff и 18 фунгицидов.

Выделение бактерий и их характеристику проводили из листьев и стеблей вегетирующих растений и семян, используя полуселективные среды (Alvarez et al., 1995; Maringoni et al., 2006; Tegli et al., 1998), биохимические тесты (Wensing et al., 2010; Lelliott, 1966), родо- и видоспецифичные ПЦР-протоколы, секвенирование (Ignjatov et al., 2007; Bereswill et al., 1994; Evseev et al., 2022; Tegli et al., 2002) и проверку вирулентности на сое (Hsieh et al., 2003) для завершения триады Коха. Охарактеризованные штаммы хранили при -72°C в 15%-ном водном растворе глицерина.

Оценку генетического разнообразия штаммов Psg проводили путём секвенирования и биоинформатического анализа последовательностей генов цитратсинтазы *gltA* и межгенного спейсера *ITS 16S-23S* рРНК (Sarkar et al., 2004), а в случае Cff для этой цели использовали ген аланин-синтазы *alaS* (Evseev et al., 2022). Оценку вирулентности штаммов Psg проводили путём разрезания листа сои ножницами, смоченными в суспензии штамма, а в случае Cff – проводили инокуляцию растений сои и фасоли тем же методом (Salah Eddin et al., 2005).

Анализ расового состава проводили на коллекции сортов-дифференциаторов Psg, полученных из ВИР (Abo-Moch et al., 1995).

Оценку вредоносности бактериальных болезней сои проводили в полевых условиях на базе опытного участка лаборатории защиты растений в 2020-2021 гг. в двукратной повторности по 12 м² в каждой. Климатические условия 2020 года характеризовались невысокой температурой и интенсивными дождями в первой половине вегетации в сравнении с условиями 2021 года и средними многолетними данными, в связи с чем интенсивность поражения болезнями в первый год исследования была выше.

Искусственную инокуляцию растений проводили суспензиями возбудителей и оценивали распространённость, интенсивность поражения болезнями (Price et al., 2016), урожайность и её структуру (Житкевич, 2005).

Для разработки мультиплексной системы ПЦР диагностики проводили поиск регионов амплификации в Genbank и BLAST по схеме, представленной в работе (Lukianova et al., 2021). Оптимизацию ПЦР протокола проводили с использованием модифицированной схемы эксперимента Тагучи (Cobb and Clarkson, 1994). Оценку специфичности тест-системы проводили путем анализа коллекции штаммов, а чувствительность проверяли на серийных разведениях бактерий и ДНК, используя программу CFX Maestro™ (BioRad, США).

Для оценки устойчивости сортов предварительно проводили тестирование способов создания инфекционного фона. Для этой цели по 2 растения в трёхкратной повторности инокулировали разными методами: (I) инфильтрацией суспензии в мезофилл листа при помощи медицинского инъекционного шприца; (II) срезали лист перпендикулярно жилкам на глубину 1 см от края ножницами, смоченными в суспензии бактерий; (III) сжимали в нескольких местах лист пинцетом, на который накручена вата, намоченная суспензией; (IV) суспензию при помощи шприца вводили в черешок пары примордиальных листьев; (V) проводили инфильтрацию бактерий при помощи аэрографа (Huang et al., 2003; Salah Eddin et al., 2005; Chincinska et al., 2021; Shine et al., 2015). Искусственную инокуляцию при оценке устойчивости сортов проводили методом разрезания листа ножницами, смоченными в суспензии штаммов бактерий, используя все листья 4 растений каждого из 47 сортов в двукратной повторности. Учёт проводили на 12 сутки после инокуляции, измеряя ширину зоны поражения листа при помощи штангенциркуля.

Выделение и характеристику фагов проводили по общепринятым методикам (Adams et al., 1959; Van Twest et al., 2009; Orynbayev et al., 2020). Вещества растительного происхождения получали из высушенных растений в аппаратах Клевенджера и Сокслета (Abeysinghe et al., 2010), а оценку их химического состава проводили на газовом хроматографе Agilent 8890 GC System (Baharum et al., 2010). Гидролизат хитозана получали путем деполимеризации хитозана из панциря краба с использованием азотной кислоты, как описано ранее (Shagdarova et al., 2018), а наночастицы хитозана были сформированы методом ионотропного гелеобразования (Qi et al., 2004).

Оценку фитотоксичности тестируемых веществ проводили обработкой семян и вегетирующих растений сои различными концентрациями, далее оценивали наличие или отсутствие эффекта (Nalini et al., 2018). Оценку чувствительности бактерий к антибактериальным веществам (меди, комплексу меди и наночастицам хитозана, эфирным маслам и растительным экстрактам) проводили методами диффузии в агар (Burt et al., 2004) и серийных разведений в жидкой среде (CLSI, 2015). Инокуляцию семян бактериями для оценки эффективности мер борьбы проводили методом прокалывания семени иглой и инкубированием в суспензии бактерий в вакуумной камере при -10^5 Па в течении 10 мин (Rooney, 2021), а заражение листьев проводили при помощи аэрографа AirControl 1113 (JAS, Китай) в соответствии с (Shine et al., 2015). Инокулированные бактериями семена и вегетирующие растения обрабатывали в 3-4 повторностях (в зависимости от эксперимента) растворами бактериофагов, меди, наночастиц хитозана и их комплексов, эфирных масел и растительных экстрактов в различных концентрациях согласно схемам опытов и оценивали распространённость и интенсивность проявления симптомов болезней (Sibiya et al., 2019; Hsieh et al., 2003).

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

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Всего в рамках работы из 87 образцов растений выделено и охарактеризовано 12 штаммов возбудителя бактериального ожога сои различного географического происхождения. Выделенные изоляты имели сходные биохимические и морфологические характеристики: белый, слегка кремовый цвет колоний, круглые, блестящие колонии, которые образовывали сидерофор пиовердин за три дня и не проявляли пектолитической активности, проявляли реакцию сверхчувствительности при инокуляции листьев табака.

Анализ агрессивности штаммов Psg показал, что наименьшее значение ширины зоны поражения давал изолят G7 (3,23 мм), наибольшее – G4 (6,53 мм), а листья, инокулированные референтным штаммом CFBR 2214 демонстрировали промежуточное значение 3,83 мм.

Молекулярно-генетическая характеристика штаммов Psg показала, что при амплификации с Psg-специфичными праймерами все штаммы, в том числе CFBR 2214, образовывали чёткий продукт размером ~ 650 п.н., который указывал на принадлежность к Psg (Ignjatov et al., 2007). Филогенетический анализ 12 штаммов Psg по гену *gltA* поместил все штаммы в одну кладу вместе с видами *P. syringae* и *savastanoi*. Штаммы отличались при попарном анализе по генети-

ческому разнообразию между собой и распределились в 3 группы: группа 1 (штамм G6); группа 2 (G3-G4, G7-G11, G17) и группа 3 (G1-G2, G5). Филогенетический анализ по последовательностям гена *ITS* 16S-23S рНК поместил штаммы Psg в 3 монофилетические клады: первая группа включала в себя штаммы G4, G8, G10, G17, вторая – штаммы G3-G4, G6-G8 и G10-G11, а третья – штаммы G1-G2, G5 и G9.

Анализ расовой принадлежности патогена показал, что все 12 выделенных в РФ штаммов Psg, относились к расе 4, согласно схеме, «ген-на-ген» взаимоотношений рас патогена и сортов - дифференциаторов (Abo-Moch et al., 1995; Cross et al., 1966).

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

Всего из 56 образцов растений было выделено 39 изолятов, относящихся к *Curtobacterium* sp. Выделенные штаммы и референтный штамм были грамположительными, обладали казеиназной активностью, образуя зоны гидролиза на среде MSCFF, были способны потреблять рамнозу как источник углерода на среде SSM.

ДНК штаммов, показавших положительные результаты при анализе родоспецифической (Evseev et al., 2022) и Cff-специфической диагностической ПЦР (Tegli et al., 2002) секвенировали по гену аланинсинтазы *alaS*. Результаты филогенетического анализа показали сходство типового штамма *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* LMG 3645 с небольшой частью анализируемых штаммов. Интересно, что изоляты 2021 года с сои кластеризовались с изолятами с дикорастущих растений 2020 года выращивания.

Анализ вирулентности коллекции Cff показал, что все протестированные штаммы, кроме четырёх (C043, C115, C118 и C137), вызывали характерные симптомы на инокулированных листьях сои и фасоли обыкновенной. Коэффициент корреляции между вирулентностью штаммов на сое и фасоли составил 0,701 (высокая степень корреляции). Для сои наиболее вирулентными оказались штаммы C088 и C142, а наименее вирулентными - штаммы C091 и C133. При инокуляции фасоли обыкновенной наибольшие значения были получены для штаммов C086, C088 и C089, а наименьшие - для штаммов C039, C108 и C119.

Анализ чувствительности штаммов Cff к соединениям меди показал, что у 38 штаммов значения МИК были ниже 390 ppm, поэтому они были отмечены как чувствительные к Cu(OH)₂. Штамм C116 отметили, как устойчивый со значением МИК = 781 ppm. Значения МИК для двух референтных штаммов, C120 и C133, выделенных из дикорастущих растений в США, были в два раза ниже, чем для большинства штаммов (195 и 390 ppm соответственно).

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

Первые симптомы болезней на растениях сои наблюдали через 8-13 дней после заражения. Распространённость и интенсивность поражения болезнями нарастали по мере увеличения вегетативной массы и к моменту последнего

учёта составили для Psg: 34% и 0,9 балла, а для Cff: 21% и 1,11 балла в 2020 году, а в 2021 году для Psg: 21,2% и 0,7 балла, а для Cff: 13,5% и 1,02 балла.

Анализ структуры урожая показал, что заражение сои Psg и Cff достоверно снижало количество семян на растении и продуктивность с 1 м². При этом заражение не оказывало сильного влияния на высоту растений, длину бобов и массу 1000 семян. При заражении сои Psg происходило снижение продуктивности на 38,1 г/м² (16,4 %), а при заражении Cff - на 36,4 г/м² (15,6 %) в сравнении с вариантом без инокуляции бактериями. Можно утверждать, что снижение продуктивности было обусловлено в основном благодаря снижению количества семян с 1 растения, а другие параметры структуры урожая оказывали меньший эффект на конечную продуктивность. Таким образом показано, что в условиях Московской области бактериальный ожог сои более вредоносен чем ржаво-бурая бактериальная пятнистость и увядание.

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

Данные, полученные при оптимизации пробоподготовки при тестировании семян сои, свидетельствуют о том, что максимальный выход ДНК был достигнут при внешней локализации патогена, как в варианте со встряхиванием (416,9 единиц), так и при гомогенизации семян (390,7 единиц). В варианте с внутренней локализацией патогена выход ДНК был ниже и составлял в среднем 245,0 и 85,5 единиц при разрушении и встряхивании семян, соответственно.

Сравнение наборов и способов для выделения ДНК позволило сделать вывод, что наилучшим был набор для выделения ДНК Проба-ГС, у которого был максимальный выход ДНК (645,0 единиц). Среди мастер-миксов для приготовления реакционной смеси, наилучшим оказался мастер-микс Mas^{DD}TaqMIX-2025.

Подбор объёма праймеров в реакционной смеси показал, что наибольшего выхода ДНК достигали при использовании мастер-микса 5x Mas^{DD}TaqMIX-2025 по 1,0 и 2,0 мкл (при концентрации 10 пМ/мкл) и праймеров PsgFOR-1 и PsgREV-2 на реакцию. Учитывая, что выход ДНК в этих двух вариантах статистически не отличался, в дальнейшем использовали праймеры при объёме по 1,0 мкл (при концентрации 10 пМ/мкл) на реакцию.

В результате проведения эксперимента по определению оптимальной схемы диагностики показано, что наибольший выход ДНК был достигнут в варианте с выделением набором Проба-ГС и пробоподготовкой методом разрушения семян в гомогенизаторе.

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

Для конструирования праймеров к *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg) был выбран ген, кодирующий 2-оксоглутарат-зависимый этилен/сукцинат-образующий фермент (далее – *efe*). Этот маркерный ген был использован для выявления патогенов этиленпродуцирующих бактерий *Pseudomonas* (Weingart and Volksch, 1997; Sato et al., 1997). Во всех штаммах в

результате BLAST-поиска по базе данных NCBI GenBank целевой ген был обнаружен в одной копии.

Набор праймеров и зонды, использованные для ПЦР-диагностики Cff, были построены на основе ПЦР-протокола, разработанного Tegli et al. (2002). В наборе использовался ген трипсиноподобной сериновой протеазы (далее – *tlsp*) и прилегающая к нему 3'-некодирующая область, расположенная на островках патогенности, обнаруженных в сборках геномов Cff и плаزمиды, потенциально связанных с патогенностью Cff (Evseev et. al., 2022). 5'-конец прямого праймера Cff1F был удлинен на три нуклеотида по сравнению с Tegli et al. (2002) для выравнивания температуры плавления праймеров Psg. *In silico* анализ разработанных Cff-специфичных праймеров подтвердил отсутствие взаимодействия с нецелевыми микроорганизмами.

Стандартизация дуплексной классической ПЦР с использованием модифицированного метода Тагучи и последующий анализ электрофоретических изображений, полученных денситометрической обработкой агарозного геля, подтвердил наличие ампликонов с ожидаемой молекулярной массой (342 п.н. для гена *efe* и 308 п.н. для гена *tlsp*). Никаких неспецифических продуктов амплификации не наблюдалось. Анализ данных денситометрии показал, что оптимальным был состав реакционной смеси в варианте 3, который был следующим: 1,25 U SmarTaq полимеразы, 1,25 мкМ MgCl₂, прямых и обратных праймеров для генов *efe* и *tlsp* по 30,0 пмоль на каждую пару, по 400 мкМ каждого dNTP, 1+1 мкл ДНК каждого вида бактерий, 2,5 мкл 10-кратного буфера и воды для ПЦР до общего объема 25 мкл на 1 реакцию. Оптимизация температуры отжига праймеров/зондов показала, что самые низкие средние значения порогового цикла были получены при температуре отжига 60,0°C для продуктов обоих генов (19,05 для *efe* и 18,55 для *tlsp*), поэтому эту температуру использовали в дальнейшем.

Проверка специфичности мультиплексной ПЦР в реальном времени показала, что положительный результат ПЦР-амплификации был достигнут для всех анализируемых целевых штаммов. В ходе анализа только штамм *P. syringae* pv. *pisi* показал ложноположительную амплификацию с Psg-специфическим праймером/зондом (канал FAM). При постановке Cff-специфической ПЦР (флуорофор R6G) случаев ложноположительной амплификации не обнаружено. Оценка чувствительности симплексной ПЦР показала последовательную амплификацию гена *efe* при концентрации ДНК 0,01 нг на реакцию или более. Чувствительность обнаружения Cff была примерно равна (но с более низкими значениями порогового цикла) чувствительности Psg (около 0,01 нг на реакцию). Рассчитанная эффективность реакции составила 94,36% для Psg и 91,53% - для Cff. Обнаружение Cff через ген *tlsp* показало более низкие значения порогового цикла, чем для Psg. Анализ чувствительности мультиплексной ПЦР в реальном времени показал, что предел обнаружения концентрации ДНК Psg и Cff составил не менее 0,01 нг на реакцию. Эффективность реакции была рассчитана как 99,7% для Psg и 99,2% - для Cff. Использование разработанных праймеров и зонда также показало хорошие результаты при ис-

пользовании в качестве матрицы разведений суспензий бактерий (от 10^6 до 10^1 КОЕ/мл) штаммов Psg NCPPB 2411 и Cff CFBP 3418.

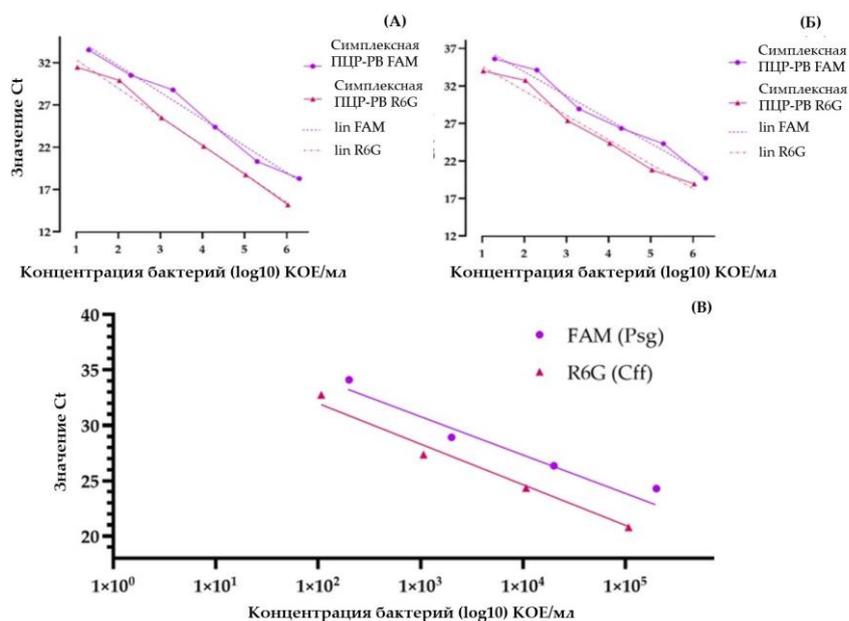


Рисунок 1. Чувствительность тест-системы при обнаружении Psg и Cff в симплексной (А) мультиплексной ПЦР в реальном времени (Б) и стандартная кривая (В) для мультиплексной ПЦР в реальном времени

Результаты, представленные на рис. 1А-Б указывают на незначительные различия при использовании каждого вида бактерий отдельно в качестве матрицы (симплекс) или после смешивания (мультиплекс). Для моделирования анализа семян сои на наличие целевых организмов серийные разведения бактерий добавляли к свободному от патогенов экстракту семян сои, гомогенизированному в буфере. Тотальную ДНК выделяли и использовали для постановки ПЦР. Применённый протокол ПЦР позволил обнаружить целевые бактерии с концентрацией выше 100 КОЕ/мл. Значения порогового цикла линейно коррелировали с концентрацией бактерий и позволили построить стандартную кривую (рис. 1В). Эту кривую можно использовать для приблизительной количественной оценки присутствия бактерий в пробах.

3.6. Оценка устойчивости сортов сои к бактериальным болезням

Сравнение способов инокуляции сои возбудителями бактериальных болезней показало, что максимальная площадь поражения как Psg, так и Cff листьев сои была получена при инокуляции при помощи аэрографа (15,6 и 12,7%, соответственно). По продолжительности времени, необходимого для инокуляции одного растения показано, что V вариант инокуляции (инфильтрация при помощи аэрографа), хоть и являлся трудозатратным по сравнению с другими, но позволял создавать стабильный инфекционный фон с высокой степенью поражения листьев обеими бактериями. В дальнейшем для оценки устойчивости коллекции сортов сои к бактериозам использовали способ II (срез листа ножницами, смоченными суспензией), показавший хорошие результаты как по площади поражения, так и по затратам времени на инокуляцию.

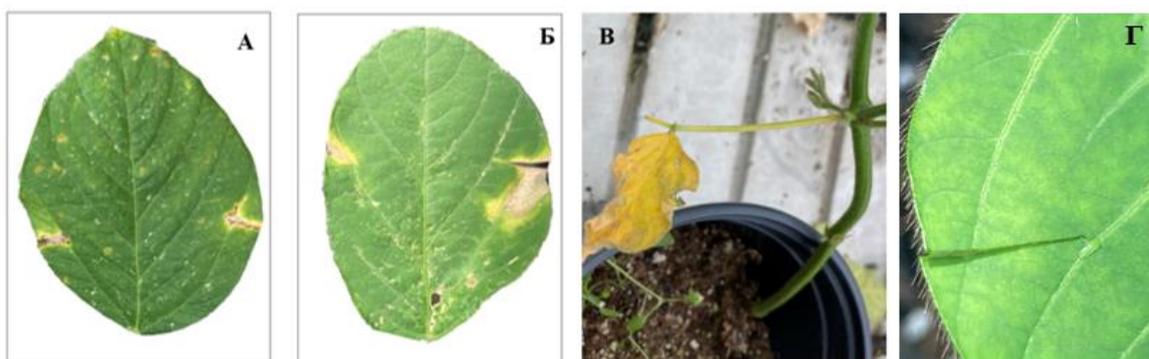


Рисунок 2. Реакция сортов сои на инокуляцию штаммами возбудителей бактериального ожога и ржаво-бурой бактериальной пятнистости сои методом разрезания листа ножницами, смоченными в суспензии бактерии (А- инокуляция Psg, Б – инокуляция Cff, В – абортация тройчатого листа и черешка после инокуляции сорта Нордика штаммом Psg CFBR 2214 на 21 день, Г – контроль (инокуляция водой без бактерий))

Симптомы, полученные в ходе инокуляции, соответствовали описанию фенотипических проявлений реакции растения на патогены (рис. 2А-Б). Сорта разделили на 4 группы по поражаемости каждым патогеном. По отношению к Psg первая наименее поражаемая группа была наибольшей по численности, и в неё вошли 23 сорта, во вторую – 9, в третью – 10, в четвертую – 3 сорта. У Cff картина распределения групп по поражаемости была следующей: первая группа – 22 сорта, вторая – 9, третья – 11, четвертая – 3 сорта.

Наименее поражаемыми Psg были растения сорта Соер 4, показавшие минимальный размер зоны поражения (в среднем 0,61 мм по всем трём штаммам). Самым восприимчивым оказался сорт Осмонь (в среднем 6,88 мм по всем трём штаммам). В случае с Cff наименее поражаемым был также сорт Соер 4 (в среднем 0,46 мм), а больше всех поражался сорт Нордика (в среднем ширина зоны поражения составила 6,23 мм). Сорта Нордика и Опус после инокуляции Psg и сорт Максус после инокуляции Psg и Cff по происшествии 10 дней после учёта симптомов (на 21 день после инокуляции) продемонстрировали реакцию абортации заражённых тройчатых листьев (рис. 2В). Данная системная реакция может косвенно указывать на наличие реакции сверхчувствительности, поэтому в дальнейшем необходимо провести подробное исследование, описывающее истинный механизм данного феномена и обосновать возможность использования данных сортов как источников устойчивости с реакцией СВЧ.

3.7. Использование фагов в защите сои от бактериального ожога сои

Из образцов почвы под посевами сои были выделены три бактериофага Psg. Они образовывали на бактериальном газоне схожие крупные бляшки (Ø7–8 мм) с гладкими границами, были активны в отношении штаммов целевой бактерии, ряда других видов *Pseudomonas* spp. и были авирулентны к штамму-азотфиксатору *Bradyrhizobium japonicum*, применяемому для обработки семян сои, и таким образом, были безопасны для обычных азотфиксаторов. Электронномикроскопическая и молекулярно-генетическая характеристика показали, что фаги имеют типичную морфологию подовируса С1 с изометрическим капсидом

и тонким хвостом и принадлежат к роду *Ghunavirus* подсемейства *Studiervirinae*. Из-за высокой степени сходства между собой для дальнейшей работы был выбран фаг P421. Анализ устойчивости фага Psg P421 к стрессовым факторам показал, что вирус был стабилен при ультрафиолетовом облучении (280-315 нм) ~ до 80 мин, при температурах от 4 до 40°C и при pH от 4 до 7.

Интенсивность поражения бактериальным ожогом растений, обработанных бактериофагом, была в 2 раза ниже чем у контрольных растений, обработанных водой (рис. 3А). Наибольшую эффективность наблюдали при концентрации фага 10^9 БОЕ/мл (52,0%), а интенсивность поражения заболеванием снижалась почти в равной степени после обработки концентрациями фага 10^8 БОЕ/мл (на 37,6%) и 10^7 БОЕ/мл (34,3%).

Обработка фагом P421 заражённых Psg семян сои показала значительное снижение распространённости болезни на проростках. В контрольном варианте (при обработке водой) показано быстрое развитие болезни на растениях (рис. 3Б-В). Из-за ежедневного полива растений дождеванием наблюдалось вторичное распространение инфекции аналогично вспышке болезни в полевых условиях. Биологическая эффективность обработки фагом составила 59,7% (по распространённости заболевания) или 55,0% (по интенсивности поражения) в сравнении с контролем.

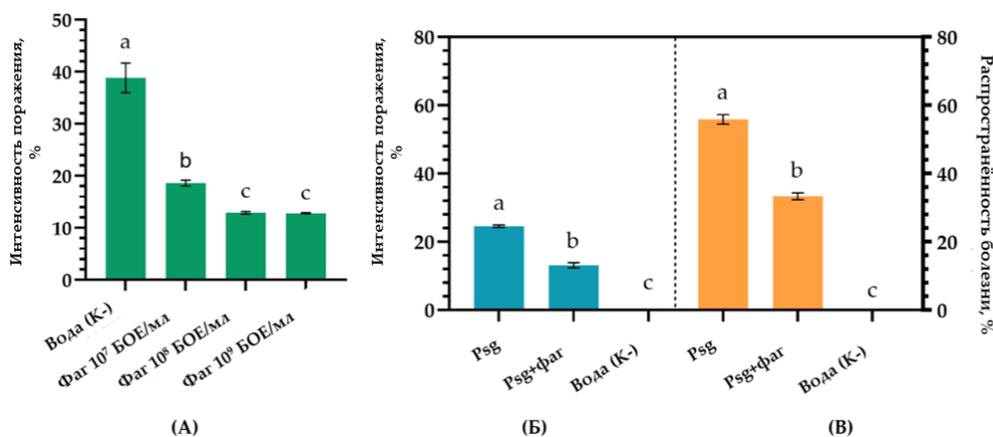


Рисунок 3. Интенсивность поражения и распространённость бактериального ожога сои, вызванного искусственной инокуляцией Psg, при обработке и без обработки фагом P421. (А): интенсивность поражения болезнью на инокулированных вегетирующих растениях; (Б): интенсивность поражения болезнью после инокуляции семян сои; (В): распространённость болезни после инокуляции семян сои

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

Фаг Cff Аука, выделенный нами имел подовирусную морфологию с изометрическим капсидом, образовывал маленькие бляшки ($\varnothing 1-2$ мм) с гладкими границами на газоне бактерии-хозяина C089 и относился к «φ29-подобным фагам» семейства *Salasmaviridae*. Фаг был активен только в отношении шести штаммов из 39, находящихся в коллекции; был стабилен при ультрафиолетовом

облучении с экспозицией до 5 ч, температурах от 4 до 70°C и pH 5-10. Оптимальная множественность инфекции фага Аука составила 0,01.

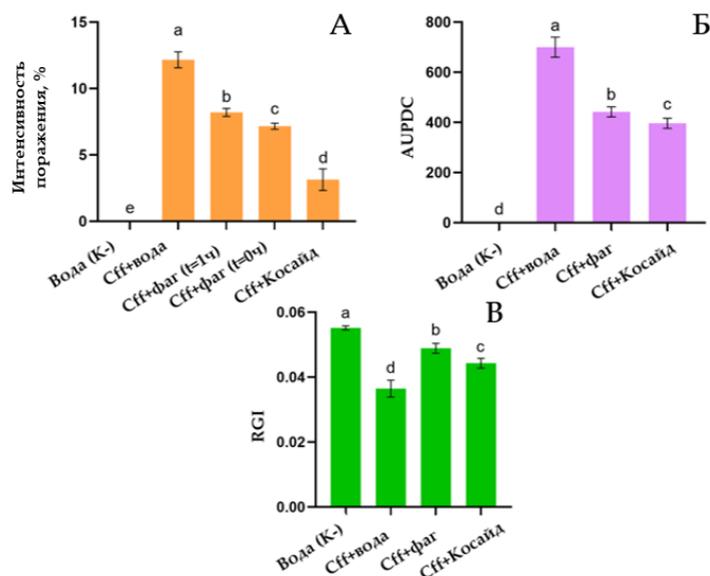


Рисунок 4. Влияние фага Аука и фунгицида Косайд 2000, ВДГ на интенсивность поражения листовой поверхности (А), площадь под кривой развития болезни (AUPDC) увядания (Б) и индекс относительного роста (RGI) (В) сои

Оценка эффективности применения фага на вегетирующих растениях показала, что распространённость болезни снизилась на 32 и 41% (при применении через 1 ч после заражения и одновременно с заражением, соответственно) в сравнении с положительным контролем (рис. 4А). Стоит отметить, что наименьшая площадь поражения на поверхности листьев наблюдалась после применения Косайд 2000, ВДГ (3,14% от площади листа), в то время как применение фага во время и через 1 час после инокуляции привело к поражению 7,2 и 8,2% площади листа, соответственно. Оценка эффективности применения фага Аука на семенах показала, что биологическая эффективность обработки фагом составила 36,8% в сравнении с контролем. AUPDC после применения фунгицида Косайд 2000 была ниже, чем при обработке фагом (в среднем - 396 единиц для Косайда 2000 и 442 единицы для фага Аука).

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

Анализ результатов оценки антибактериальной активности эфирных масел *in vitro* показал, что в общей сложности 15 (78,9%) эфирных масел (ЭМ) проявляли антибактериальную активность в отношении Psg и 9 (47,4%) – в отношении Cff. Только 7 ЭМ (36,8%) были активны в отношении обоих видов патогенов. Оценка чувствительности бактерий к растительным экстрактам (РЭ) показала, что их биологическая активность проявлялась в отношении хотя бы одного вида бактерий у РЭ (растительных экстрактов) бархата амурского, бадана толстолистного, перца стручкового, козлятника лекарственного, чистотела большого, шелковицы чёрной, спиреи иволистной, аира обыкновенного, мелиссы лекарственной и бузины чёрной.

Наиболее активными ЭМ по наименьшему значению минимальной ингибирующей концентрации (МИК) были эфирные масла коричника китайского (ЭМКК) и тимьяна обыкновенного для Psg и эфирное масло душицы обыкновенной (ЭМДО) для Cff. Эффективность данных ЭМ и тирама против Psg по МИК была значительно выше чем против Cff. Самые низкие значения МИК были у ЭМКК, тимьяна обыкновенного для Psg и ЭМДО для Cff. Среди РЭ самые низкие значения МИК были получены для этанольного экстракта бадана толстолистного (ЭЭБТ) и Melissa лекарственной для Psg, а для Cff: ЭЭБТ и перца стручкового (водный). По результатам оценки антибактериального действия веществ растительного происхождения в дальнейшую работу были отобраны 2 ЭМ (ЭМКК для Psg и ЭМДО для Cff) и 1 РЭ (ЭЭБТ для обеих бактерий), которые показывали самые низкие значения МБК.

Оценка фитотоксичности эфирных масел и растительных экстрактов показала, что у обоих ЭМ порог фитотоксичной концентрации в семенах был выше 0,5%, а у ЭЭБТ фитотоксические концентрации начинались со значений выше 13%. Представленные пороговые значения концентраций ЭМ и РЭ статистически значимо не отличались от обработки водой.

Оценка эффективности применения эфирных масел и растительных экстрактов в борьбе с Psg на вегетирующих растениях показала, что наибольшая эффективность наблюдалась при обработке ЭМКК (80,6%); обработка ЭЭБТ уступала (60,5%) как обработке ЭМКК, так и фунгициду Косайд 2000 (эффективность 69,05%) (рис. 5А).

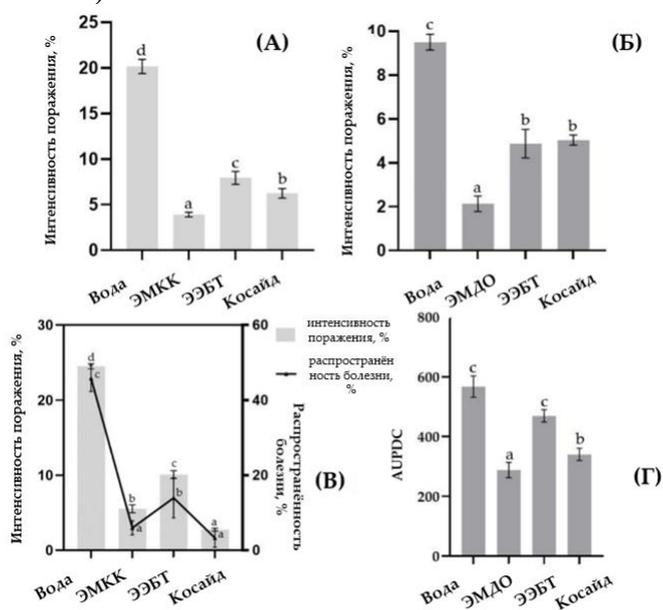


Рисунок 5. Бактериальный ожог (А, В) и бактериальная пятнистость и увядание (Б, Г) сои, вызванные искусственной инокуляцией Psg и Cff при обработке ЭМ и РЭ. (А): интенсивность поражения (% площади поражённых листьев) на вегетирующих растениях, инокулированных Psg или (Б) Cff; (В): интенсивность поражения (% площади поражённых листьев) (левая вертикальная шкала, столбцы) и распространённость болезни, % (правая вертикальная шкала, линия), после инокуляция семян сои Psg; (Г): значения AUPDC после инокуляции семян сои Cff

В варианте с инокуляцией Cff вегетирующих растений наибольшую эффективность наблюдали при обработке ЭМДО (77,5%), а ЭЭБТ и Косайд 2000 показали примерно одинаковую эффективность (48,8 и 47,0%, соответственно) (рис. 5Б).

В эксперименте с обработкой заражённых Psg семян показано, что биологическая эффективность обработки ЭМКК составила 77,4% (распространённость болезни) или 86,9% (интенсивность поражения) в сравнении с контролем, в то время как обработка ЭЭБТ снижала интенсивность поражения и распространённость болезни более чем в 2 раза, но уступала обработке ЭМКК. Обработка ТМТД значительно снизила как интенсивность поражения (эффективность 88,7%), так и распространённость (эффективность 92,8%) болезни (рис. 5В). В эксперименте с семенами, заражёнными Cff биологическая эффективность обработки ЭМДО составила 54,6% по сравнению с контролем, в то время как обработка ЭЭБТ снизила AUPDC всего на 25,9%. Обработка семян ТМТД также не показала высокого биологического эффекта; эффективность составила 46,3% (рис. 5Г).

Идентификация химического состава эфирных масел и растительного экстракта методом газовой хроматографии показала, что ЭМКК, ЭМДО и ЭЭБТ содержали суммарно 58 соединений. Наиболее распространёнными соединениями в ЭМКК были коричный альдегид (84,25%), диметилацеталь коричневого альдегида (3,36%) и о-метоксициновый альдегид (6,91%), а ЭМДО содержал карвакрол (62,32%), цимен (19,85%) и тимол (3,52%). Выход ЭЭБТ составил 4,22%, а ЭМДО - 1,69% от воздушно-сухой массы растений.

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

Оценка первичной антибактериальной активности образцов хитозана показала, что наночастицы хитозана с медью ($\text{Cu}^{2+}\text{НЧХ}$) были наиболее эффективными при всех проанализированных концентрациях; диаметр зоны ингибирования 100% суспензии $\text{Cu}^{2+}\text{НЧХ}$ (5 мг/мл хитозана и 0,83 мг/мл меди) составлял 27 мм для Psg и около 15 мм для Cff. $\text{Cu}^{2+}\text{НЧХ}$ вызывали полную гибель клеток в течение первого часа культивирования, тогда как у других вариантов этот показатель был больше. Проверка фитотоксичных концентраций образцов хитозана показала, что порог безопасных нефитотоксичных концентраций для обработки листьев и семян составлял 50% от исходных растворов (2,5 мг/мл хитозана и 0,42 мг/мл сульфата меди (CuSO_4)).

Обработка листьев сои, заражённых Psg снижала степень поражения листьев на 15-71% по сравнению с контрольными вариантами, обработанными водой (рис. 6А). Опрыскивание $\text{Cu}^{2+}\text{НЧХ}$ привело к уменьшению площади поражения на 71% по сравнению с контролем, в то время как обработка гидролизатом хитозана с медью ($\text{Cu}^{2+}\text{ГХ}$) способствовало снижению площади поражения только на 50%. Обработка CuSO_4 , гидролизатом хитозана (ГХ) и наночастицами хитозана (НЧХ) не приводила к значительному уменьшению поражения листьев (на 15-20%) по сравнению с контролем. Наибольшая эффективность при обработке вегетирующих растений, заражённых Cff наблюдалась при

обработке Cu^{2+} НЧХ (уменьшение площади поражения на 51,3%), в то время как эффективность других образцов варьировала от 17,8 до 26,9% по сравнению с контролем (рис. 6Б).

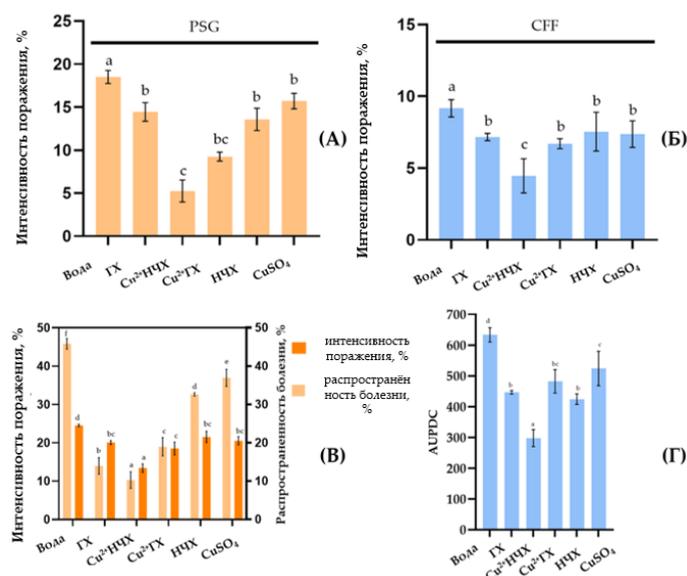


Рисунок 6. Бактериальный ожог (А, В) и ржаво-бурая бактериальная пятнистость и увядание (Б, Г) сои, вызванные искусственной инокуляцией Psg и Cff после обработки образцами хитозана. (А, Б): интенсивность поражения болезнью инокулированных вегетирующих растений; (В): интенсивность поражения болезнью и распространённость после инокуляции семян сои Psg; (Г): значения AUPDC после инокуляции семян сои Cff и обработке образцами хитозана

Биологическая эффективность обработки семян Cu^{2+} НЧХ в отношении Psg составила 77% (по распространённости болезни) или 45,3% (по интенсивности поражения болезнью) по сравнению с контролем (рис. 6В). Обработка Cu^{2+} ГХ снижала интенсивность поражения болезнью примерно в 1,3 раза и распространённость более чем в 2 раза. Обработка семян, инокулированных Cff раствором Cu^{2+} НЧХ показала наилучший результат с биологической эффективностью 53% в сравнении с контролем, а НЧХ снижали площадь под кривой развития болезни (AUPDC) только на 33% (рис. 49Г). Обработка семян CuSO_4 продемонстрировала низкой степени биологический эффект на уровне 17%.

3.11. Скрининг фунгицидов для борьбы с бактериальными болезнями на сое

Проверка фитотоксичности у 18 проанализированных фунгицидов показала, что Косайд 2000 ингибировал рост корней при обработке семян, а Серебромедин, Касумин и Фитоплазмин вызывали ожоги при обработке вегетирующих растений, в связи с чем данные фунгициды не анализировали в дальнейшем. Оценка антибактериальной активности *in vitro* показала, что наименьшим значением МИК обладали препараты Стрекар и Нанокolloид 2 (средние значения МБК составляли 3,5 и 2,5%, соответственно), а наибольшую антибактери-

альную активность проявляли Даймодайсен, Полирам и Физан 20 (средние значения МБК = 0,002, 0,005 и 0,09 %, соответственно).

Для оценки биологической эффективности на искусственном инфекционном фоне фунгициды, испытанные *in vitro*, были проранжированы по значениям МБК, и для дальнейшего изучения были отобраны по три фунгицида с наименьшим значением МБК для обоих патогенов: Даймондайсен, Полирам и Физан 20. Фунгициды, применяемые для обработки семян, также были ранжированы по МБК, и для дальнейших исследований были отобраны три препарата, показавших наименьшее значение: ТМТД, Даймондайсен и Ридомил Голд.

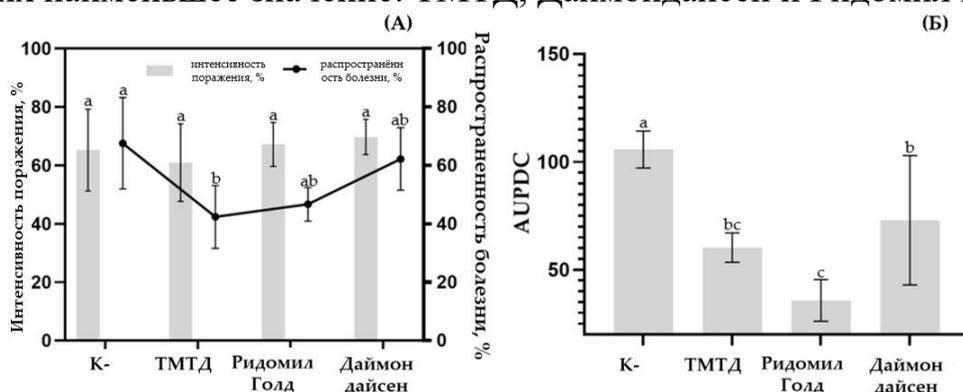


Рисунок 7. Интенсивность поражения и распространённость бактериального ожога (Psg) (A) и AUDPC ржаво-бурой бактериальной пятнистости/увядания (Cff) (Б) сои при обработке зараженных семян различными фунгицидами

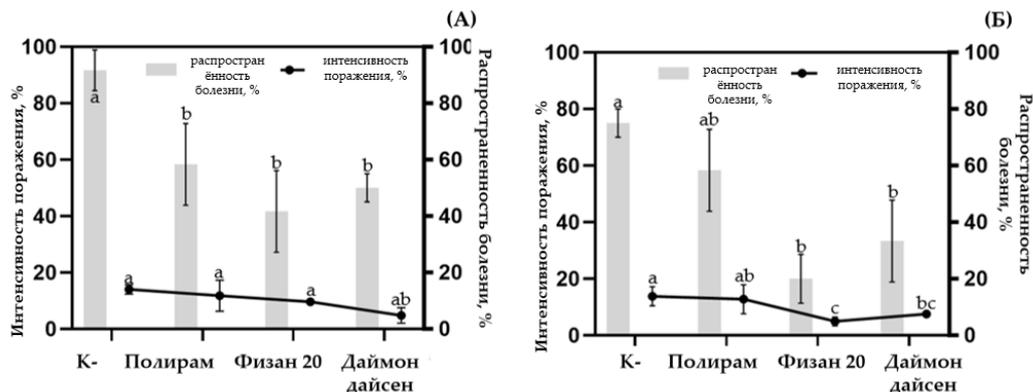


Рисунок 8. Интенсивность поражения и распространённость Psg (A) и Cff (Б) на 12-й день после инокуляции вегетирующих растений

Распространённость бактериального ожога при обработке семян сои снижалась во всех вариантах, однако статистически достоверную разницу наблюдали только в варианте с применением ТМТД. Фунгицид подавлял распространённость болезни на 21-й день после инокуляции на 39% по сравнению с контрольным вариантом (рис. 7А). Разница в интенсивности поражения болезнью для всех вариантов была статистически незначимой. В опыте с обработкой зараженных Cff семян значения AUDPC ржаво-бурой бактериальной пятнистости/увядания сои для всех вариантов были ниже, чем в контрольном варианте на 95%-ном уровне значимости. Наименьшие значения интенсивности пораже-

ния болезнью были получены в вариантах с применением препаратов ТМТД и Ридомил Голд (значения AUDPC ниже контроля на 43,0 и 66,2% соответственно) (рис. 7Б).

В отношении листовой инфекции Psg оценивали три фунгицида: Даймондайсен, Полирам, Физан 20. Обработка всеми фунгицидами снижала распространённость бактериального ожога (рис. 8А-Б). Наиболее эффективным оказался Физан 20 – наблюдали снижение симптомов заболевания на 54,5% по сравнению с контролем. Далее по эффективности следовали обработки препаратами Даймондайсен (снижение на 45,5%) и Полирам (снижение на 36,4%). Интенсивность поражения болезнью на растениях статистически достоверно снижалась только после обработки препаратом Даймондайсен (снижение на 65,9%) (рис. 8А).

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. Анализ восприимчивости 47 сортов сои к бактериальным болезням показал, что наименее восприимчивым является сорт Соер 4. Способ инокуляции листьев сои срезом листа ножницами, смоченными в суспензии бактерий, является наиболее оптимальным для использования по проявлению симптомов и затратам рабочего времени.

5. Из образцов почвы, на которой выращивалась соя, выделено 3 изолята бактериофагов Psg. Характеристика методами электронной микроскопии, полногеномного секвенирования и анализ биологических свойств позволили отнести их к семейству *Autographiviridae*. Обработка фагом P421 семян сои, зара-

жённных Psg, показала биологическую эффективность 59,7% по распространённости и 55,0% по интенсивности поражения, а в случае с заражёнными вегетирующими растениями – 52,0% по интенсивности поражения.

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

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

8. Показано, что комплекс наночастиц хитозана с медью обладает повышенной антибактериальной активностью в отношении штаммов Psg и Cff и менее фитотоксичен в отношении семян и вегетирующих растений сои по сравнению с исходными формами. Биологическая эффективность применения комплекса наночастиц хитозана и меди на искусственном инфекционном фоне бактериозов сои составила 51,3 – 77,0% в зависимости от патогена.

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

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

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

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

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Тараканов Р.И. Оценка устойчивости сортов сои к бактериальным болезням на искусственном инфекционном фоне / **Р.И. Тараканов** // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2022. – № 5. – С. 92-107. DOI 10.26897/0021-342X-2022-5-92-107. EDN: SHHNNW.

2. Тараканов, Р.И. Выявление возбудителя бактериального ожога сои *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* в семенах методом ПЦР / **Р.И. Тараканов**, И.М. Игнатьева, О.О. Белошапкина, С.И. Чебаненко, О.Г. Каратаева, Джалилов Ф.С. // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2024. – № 1. – С. 41-52. DOI 10.26897/0021-342X-2024-41-52. EDN: VJWXXK.

Работы, опубликованные в изданиях, индексируемых в международных цитатно-аналитических базах данных:

3. Tarakanov, R.I. Bacteriophage control of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in soybean / **R.I. Tarakanov**, A.A. Lukianova, P.V. Evseev; S.V. Toshchakov, E.E. Kulikov, A.N. Ignatov, K.A. Miroshnikov, F.S.-U. Dzhalirov // Plants. – 2022. – Vol. 11. – P. 938. DOI 10.3390/plants11070938. (МБД – Scopus, WoS).

4. Tarakanov, R.I. Ayka, a Novel *Curtobacterium* bacteriophage, provides protection against soybean bacterial wilt and tan spot / **R.I. Tarakanov**, A.A. Lukianova, P.V. Evseev, R.I. Pilik, A.D. Tokmakova, E.E. Kulikov, S.V. Toshchakov, A.N. Ignatov, F.S.-U. Dzhalirov, K.A. Miroshnikov // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – P. 10913. DOI 10.3390/ijms231810913. (МБД – Scopus, WoS).

5. Tarakanov, R.I. Using of essential oils and plant extracts against *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on Soybean / **R.I. Tarakanov**, F.S.-U. Dzhalirov // Plants. – 2022. – Vol. 11. – P. 2989. DOI 10.3390/plants11212989. (МБД – Scopus, WoS).

6. Tarakanov, R.I. First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* causing bacterial tan spot of soybean in Russia / **R.I. Tarakanov**, A.A. Lukianova, R.I. Pilik, P.V. Evseev, K.A. Miroshnikov, F.S.-U. Dzhalirov, S. Tesic, A.N. Ignatov // Plant Disease. – 2023. – Vol. 107. – P. 2211. DOI 10.1094/PDIS-08-22-1778-PDN. (МБД – Scopus, WoS).

7. Tarakanov, R. Protective properties of copper-loaded chitosan nanoparticles against soybean pathogens *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* / **R. Tarakanov**, B. Shagdarova, T. Lyalina, Y. Zhuikova, A. Il'ina, F. Dzhalirov, V. Varlamov // Polymers. – 2023 – Vol. 15. – P. 1100. DOI 10.3390/polym15051100. (МБД – Scopus, WoS).

8. Tarakanov, R. Development of a multiplex real-time PCR method for the detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in soybean seeds / **R. Tarakanov**, A. Ignatov, P. Evseev, S. Chebanenko, I. Ignatyeva, K. Miroshnikov, F. Dzhalirov // Brazilian Journal of Biol-

ogy. – 2023. – Vol. 83. – P. e275505. DOI 10.1590/1519-6984.275505. (МБД – Scopus).

9. Tokmakova, A.D. Phytopathogenic *Curtobacterium flaccumfaciens* strains circulating on leguminous plants, alternative hosts and weeds in Russia / A.D. Tokmakova, **R.I. Tarakanov**, A.A. Lukianova, P.V. Evseev, L.V. Dorofeeva, A.N. Ignatov, F.S.-U. Dzhililov, S.A. Subbotin, K.A. Miroshnikov // Plants. – 2024. – Vol. 13. – P. 667. DOI 10.3390/plants13050667. (МБД – Scopus, WoS).

10. Tarakanov, R. Biocidal and resistance-inducing effects of chitosan on phytopathogens / **R. Tarakanov**, B. Shagdarova, V. Varlamov, F. Dzhililov // E3S Web Conferences. – 2021. – Vol. 254. – P. 05007. DOI 10.1051/e3sconf/202125405007. (МБД – Scopus).

11. Tarakanov R. Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in soybean seeds using PCR assay / **R. Tarakanov**, I. Ignatyeva, F. Dzhililov // AIP Conferences Proceedings. – 2023. – Vol. 2921. – P. 040001. DOI 10.1063/5.0164606. (МБД – Scopus).

Авторские свидетельства, патенты, лицензии:

12. Устойчивость сортов сои к бактериальному ожогу и ржаво-бурой бактериальной пятнистости / **Р.И. Тараканов** // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2022622561 от 19.10.2022. Заявка № 2022622520 от 12.10.2022. EDN: HZYFMF.

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

Публикации в сборниках и материалах конференций:

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