

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

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: Зейрук Владимир Николаевич, доктор сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, главный научный сотрудник отдела агротехнологий ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха»

Хютти Александр Валерьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунитета растений к болезням ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений»

Ведущая организация: ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии»

Защита диссертации состоится 12 декабря 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. Черная ножка картофеля и ассоциированная с ней мягкая гниль клубней являются одними из наиболее опасных бактериальных заболеваний, вызываемых различными видами пектолитических граммотрицательных энтеробактерий из родов *Pectobacterium* и *Dickeya* (Van der Wolf, De Boer, 2007; Лазарев, Борисова, 2010; Ерохова, Кузнецова, 2023) входящих в топ-10 основных бактериальных патогенов растений, ограничивающих урожайность и качество сельскохозяйственных культур (Mansfield et al., 2012). Данные заболевания приводят к ежегодным потерям урожая картофеля до 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 (Игнатов и др., 2015; Лазарев, Хютти, 2016). 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, с целью выявления новых патогенных видов (Waleron et al., 2018b; Sarfraz et al., 2020), изучения их биологических особенностей и совершенствования существующих систем диагностики на основании актуальных данных филогенетического анализа популяции патогенов.

Поскольку основным источником распространения данных заболеваний является латентно инфицированный семенной материал, а среди существующих коммерческих сортов картофеля отсутствуют сорта невосприимчивые к возбудителям черной ножки и мягкой гнили (Фасулати и др., 2014; Ертаева, 2016; Lebecka et al., 2021) актуальным направлением исследований является выявление сортов с относительной устойчивостью к заболеванию. Помимо эндофитного распространения инфекции пектолитические бактерии могут сохраняться и в эпифитных популяциях (Burgess et al., 1994; Kastelein et al., 2021). В этой связи, особый интерес представляют медьсодержащие препараты широкого спектра действия (Зейрук и др., 2019; Ерохова, Кузнецова, 2022a), пригодные для опрыскивания растений в течение вегетации, а также альтернативные антимикробные агенты, например, вещества растительного происхождения, представленные эфирными маслами и растительными экстрактами (Huang et al., 2014; Ikeura, Koabayashi, 2015; Bhat et al., 2017).

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 (Sarfraz 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 и задачи. Целью исследования является 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 мягкой 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 диссертационного исследования. 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, 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 современных 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).

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.

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 3 – в рецензируемых научных изданиях,

включённых в перечень ВАК РФ, 1 – в издании, входящим в международные реферативные базы данных и системы цитирования Scopus и Web of Science (журнал Q1), 1 – свидетельство о государственной регистрации баз данных.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава I), материалов и методов исследований (глава II), экспериментальной части (главы III), заключения и библиографического списка. Объем диссертации составляет 202 страницы. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 45 рисунками. Библиографический список включает 338 литературных источников, в том числе 256 иностранных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В главе содержатся сведения о распространении и вредоносности возбудителей черной ножки картофеля. Описано систематическое положение возбудителей, включая недавно описанные виды, и принципы его определяющие. Рассмотрены биологические свойства пектолитических бактерий. Описаны симптомы заболевания, особенности патогенеза черной ножки и мягкой гнили картофеля. Приведены методы диагностики заболевания. Проанализированы стратегии защиты картофеля от черной ножки.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в период с 2021 по 2024 г. на базе кафедры защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Материалом исследования служили штаммы возбудителей черной ножки картофеля из немецкой коллекции микроорганизмов DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Брауншвейг, Германия), коллекции лаборатории молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН (Lukianova et al., 2021), коллекции лаборатории защиты растений РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева (Карлов и др., 2010) и собственной коллекции изолятов, выделенных из пораженных клубней картофеля, различного географического происхождения. А также коллекции изолятов бактериофагов (Evseev et al., 2020; Lukianova et al., 2020; Shneider et al., 2020; Bugaeva et al., 2021; Карлов и др., 2010).

В работе были использованы фунгициды Курзат Р, СП (42 г/кг цимоксанил + 689,5 г/кг меди хлорокись) и Ридомил Голд Р, ВДГ (20 г/кг мефеноксам и 142 г/кг меди охсихлорид), образцы 25 эфирных масел и 7 растительных экстрактов (4 водных и 3 этанольных) и семенные клубни 16 сортов картофеля.

Выделение бактерий проводили из пораженных клубней картофеля (De Voer et al., 2017; Жевора и др., 2019), используя полуселективные питательные среды CVP-SL (Helias et al., 2012) и King's В. Грамотрицательность подтверждали посредством теста с 3%-ным раствором КОН (Bourgault, Lamothe, 1988; Arthi et al., 2003), пектолитическую активность - путем инокуляции ломтиков картофеля бактериальной суспензией с последующей инкубацией в условиях влажной камеры в течение 24–48 часов при 28 °С.

Штаммы хранили в 15%-ном растворе глицерина при температуре -80°C до дальнейших исследований.

Молекулярно-генетическую характеристику штаммов проводили с использованием метода классической ПЦР-диагностики с родоспецифичными праймерами, сконструированными по фрагменту гена пектатлиазы *pelB* и гену аланин-тРНК-синтазы *AlaRS*. Уточнение видового состава проводили при постановке ПЦР-РВ с использованием коммерческих наборов реагентов «ФИТОСКРИН» (РН-008, РН-029, РН-031, РН-032, РН-044, Синтол, Москва, Россия). Для детальной генетической характеристики штаммов проводили секвенирование и биоинформатический анализ последовательностей гена «домашнего хозяйства» гиразы *gyrB*.

Для завершения триады Коха проводили оценку патогенности штаммов, инокулируя бактериальной суспензией стебли вегетирующих растений картофеля (Sima et al., 2015) с повторной реизоляцией патогенов из инфицированной ткани. Вирулентность возбудителей исследовали путем инокуляции ломтиков картофеля с последующей инкубацией в термостате в условиях повышенной влажности в течение 48 часов при температурах в 16, 20, 24 и 28°C .

Биохимическое профилирование штаммов проводили с использованием коммерческой системы анализа API 20E (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Франция).

Интенсивность роста патогенов при различных температурах контролировали с помощью биореактора Biosan RTS-8 (Biosan, Рига, Латвия). Культивирование бактерий проводили в аэрируемых пробирках на 50 мл с мембранным фильтром TubeSpin® заполненных на 15 мл жидкой питательной средой King's B со скоростью вращения 1250 об/мин в течении 30 часов при температурах 18, 21, 24, 27, 30 и 33°C . Результаты оценивали согласно данным изменения оптической плотности среды (О.П.₆₀₀), рассчитывая площадь под кривой роста плотности биомассы (ПКРБ) и точку входа в фазу экспоненциального роста (мин).

При разработке видоспецифичной системы ПЦР диагностики были использованы штаммы *Pectobacterium punjabense*, охарактеризованные по гену 16S рРНК. На основании данных биоинформатического анализа последовательностей полногеномного секвирования штамма SATURN были разработаны пара праймеров и зонд Taqman®, специфичные к гену, кодирующему *ShlB/FhaC/HecB* семейство белков секреции гемолизина. Оценку специфичности тест-системы проводили путем анализа коллекции близкородственных штаммов. Чувствительность проверяли на серийных разведениях геномной ДНК бактерий (Bustin, 2009). Эффективность ПЦР оценивали, используя программу CFX Maestro™ (Bio-Rad, Калифорния, США).

Исследование бактерицидных свойств фунгицидов Курзат Р, СП (2 кг/га) и Ридомил Голд Р, ВДГ (5 кг/га) по отношению к коллекции штаммов возбудителей черной ножки картофеля проводили на питательной среде КГА с добавлением фунгицидов в концентрациях 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 и 1% по препарату (Hu et., 2008), путем подсчета бактериальных колоний в различных вариантах.

Для оценки эффективности Ридомила Голд Р по отношению к эпифитной популяции *Dickeya chrysanthemi* проводили серию опытов, моделирующих передачу эпифитной популяции от листа к листу посредством механического контакта и капельным путем, а также исследовали продолжительность сохранения бактериального инокулюма на поверхности орудий труда. Результаты фиксировали с применением метода отпечатков, количественно оценивая данные при помощи программы LeafDoctor (Pethybridge, Nelson, 2015). Итоги экспериментов подтверждали на фоне искусственного заражения вегетирующих в теплице растений картофеля сорта Гала.

Эфирные масла получали из растительного материала с использованием аппарата Клевенджера (El Gendy et al., 2015), экстракты - при помощи прибора Сокслета с концентрированием на роторном испарителе RE100-Pro (DLab, Пекин, Китай) (Harborne, 1998). Стабильную масляную эмульсию готовили путем разбавления до 5%-ной концентрации в 2,5%-ном Tween 20. Сконцентрированный осадок экстрактов растворяли в ДМСО до 50%-ной концентрации. В качестве положительного контроля использовали 4%-ный раствор антибиотика гентамицина.

Качественный и количественный анализ веществ растительного происхождения проводили при помощи газового хроматографа Agilent 8890 GC System с применением масс-спектрометрического (МСД) и пламенно-ионизационного детекторов (ПИД). Относительное количество отдельных компонентов было рассчитано по хроматограммам и выражено в процентах площади пика по отношению к общему объему пробы. Идентификацию компонентов проводили путем сравнения их относительного времени удержания и масс-спектров со значениями для эталонных соединений библиотеки спектров Nist (National Institute of Standards and Technology, США) (Baharum et al., 2010).

Скрининг антибактериальной активности веществ растительного происхождения проводили методом диффузии в агаре. Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) и минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) определяли с использованием серийных разведений питательного бульона в присутствии резазурина (CLSI - M100-S26, 2016) и посевов на среду YD.

Для оценки эффективности применения эфирных масел и экстрактов проводили поверхностную обработку клубней картофеля и их инокуляцию суспензиями бактериальных клеток. Результаты фиксировали путем расчета глубины мацерации (Р, мм) (Larwood et al., 1984), потери массы клубня (L,%) (Abd-El-Khair et al., 2007) и биологической эффективности (БЭ,%) (Sameza et al., 2016; Najhamed et al., 2007). Исследование защитного действия масел и экстрактов против стеблевой гнили и эпифитной популяции на листьях картофеля, проводили путем инокуляции стеблей и листьев, предварительно обработанных веществами растительного происхождения с последующим измерением мацерированной части стебля и использованием метода отпечатков листьев.

Специфичность бактериофагов определяли для ряда штаммов *Pectobacterium* и *Dickeya*, используя метод двухслойного агара (Evseev et al., 2020). Эксперименты по оценке эффективности применения бактериофагов по отношению к возбудителям мягкой гнили проводили путем совместной инокуляции ломтиков и клубней картофеля фильтраатами фагов и суспензиями патогенов в соотношениях 1:2 и 1:4 с последующим сравнением диаметров мацерации (Zaczek-Moczydłowska et al., 2020).

Устойчивость различных сортов картофеля к возбудителям черной ножки и мягкой гнили оценивали согласно результатам двух 4-х факторных опытов, путем сравнения реакции сортов картофеля на заражение патогенами клубневой и стеблевой ткани растений. Клубневую оценку проводили путем инокуляции ломтиков картофеля с последующей инкубацией в течение 120 ч при температурах 13,5 и 22,0°C, стеблевую – на вегетирующих в теплице проростках картофеля 4-х недельного возраста. Симптомы выражали в баллах от 0 до 7.

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 9.2.0 (GraphPad Software Inc., США).

ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Разнообразие возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля

В ходе работы было проанализировано 18 образцов (15-100 клубней в образце) картофеля из 11 регионов РФ. По итогам исследования отобраны около 60 изолятов, предварительно отнесенных к *Pectobacterium/Dickeya* sp. Изоляты при культивировании на среде YD представляли собой блестящие, округлые колонии, кремового цвета, не флуоресцировали на среде King's B, разжижали пектат на среде CVP-SL, проявляли пектолитическую активность на ломтиках картофеля и грамотрецитательность при взаимодействии с 3%-м раствором КОН.

По результатам молекулярно-генетической идентификация коллекции методом ПЦР было определено, что все штаммы коллекции относятся к роду *Pectobacterium*, что соответствует ранее обнаруженной смене доминирующих видов в популяции возбудителей черной ножки и мягкой гнили картофеля (Баранник и др., 2018; Voronina et al., 2019a). При этом достоверная идентификация до вида была возможна только по итогам секвенирования по гену *gyrB*.

На основании видового разнообразия и филогенетического анализа коллекции было обнаружено присутствие в 9 субъектах РФ патогенов, относящихся к видам *P. versatile* (19 изолятов), *P. brasiliense* (12 изолятов), *P. carotovorum* (10 изолятов), *P. punjabense* (7 изолятов), *P. polaris* (2 изолята) и *P. parmentieri* (1 изолят). Три изолята (GAEL-1, GAEL-9 и OTG-16) родственные *P. odoriferum*, образуют отдельную кладу, сестринскую по отношению к большой кладе, включающей *P. carotovorum* и *P. odoriferum*.

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

Согласно результатам биохимических исследований все изучаемые штаммы (*P. punjabense*, *P. versatile*, *P. atrosepticum*, *P. brasiliense*, *P. parmentieri*) были положительными по галактоидазе и отрицательными по уреазе, индолу, декарбоксилазе, не продуцировали сероводород, окисляли глюкозу, сахарозу и амигдалин, а также восстанавливали нитрат, что в целом согласуется с показателями характерными для *Pectobacterium* (Vabinska et al., 2021; Ossowska et al., 2022). Дифференцировались штаммы по активности к триптофандеаминазе, гидролизу желатина и окислению мелибиозы. Штаммы *P. punjabense* отличались от других видов по неспособности к окислению маннитола при этом окисляя мелибиозу (Рисунок 1), что довольно противоречиво, поскольку не соответствует данным, описывающим типовой штамм *P. punjabense* SS95 (Sarfraz et al., 2018), но отчасти согласуется с исследованиями Cigna et al. (2021).



Рисунок 1. Реакции штаммов, возбудителей черной ножки картофеля в тест-системе API 20E (А - *P. punjabense* SATURN; Б - *P. versatile* F002; В - *P. parmentieri* F148)

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

При анализе *вирулентности* пектолитических бактерий на ломтиках картофеля все штаммы проявляли пектолитическую активность спустя 24 часа после инокуляции, штамм F126 *P. brasiliense* показал наибольший средний диаметр некроза - 19,3 мм. В среднем за 48 ч инкубации скорость роста диаметра некроза составляла 0,81 мм/ч, при этом наибольшее расширение зоны мацерации наблюдалось в течение первых 24 часов инкубации при 28 °С. Минимальная скорость за 48 часов инкубации была зарегистрирована при температуре 16 °С и составила 0,77 мм/ч, однако за период 24-48 ч на данном варианте отмечался максимальный рост некроза по сравнению с другими температурами (0,26 мм/ч).



Рисунок 2. Симптомы черной ножки на стеблях растений картофеля через 72 часа после инокуляции штаммами *Pectobacterium*

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. Диаметры некроза ломтиков картофеля при инокуляции штаммами *P. punjabense* при 28°С составили 17,1–17,6 мм, что на 25,7–29,4% больше, чем при инокуляции штаммами F002 и F048. В то время как инкубация при 16°С, показала расхождение в 5,7–23,5% в пользу штаммов *P. versatile* и *P. atrosepticum*.

При оценке интенсивности накопления биомассы патогенов наибольшее значение ПКРБ из всех вариантов составляет 43,5 и отмечается для штамма

SATURN *P. punjabense* по итогам культивирования при 30°C (Рисунок 3А). У двух других штаммов *P. punjabense* пик отмечается на уровне 41,9 при температуре культивирования 27°C для штамма КА-4, для штамма КА-5 – на уровне 37,6 при 30°C. У штамма F126 *P. brasiliense* 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. Для штамма F002 *P. versatile* отмечается два оптимума – при 24 и 30°C, а у штамма F048 *P. atrosepticum* у единственного наблюдается увеличение значения ПКРБ на 13,36% при переходе от 30 к 33°C.

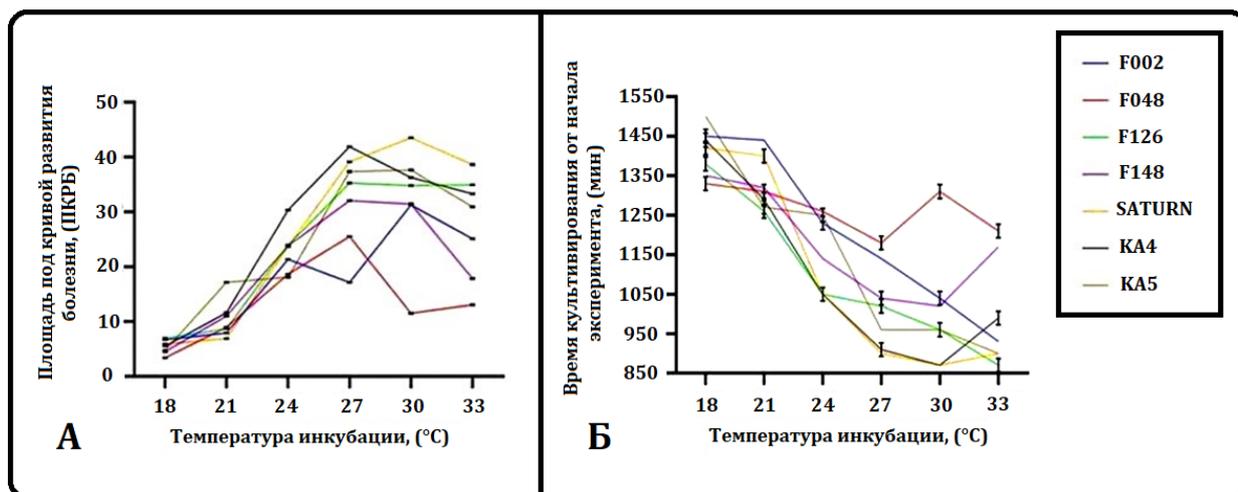


Рисунок 3. Динамика роста штаммов *Pectobacterium* при различных температурах, согласно изменениям оптической плотности в жидкой питательной среде (А – график площади под кривой развития болезни (ПКРБ); Б – график выхода биомассы патогенов на фазу экспоненциального роста в минутах от начала эксперимента)

Анализируя график выхода патогенов на экспоненциальную фазу роста (Рисунок 3Б), можно заключить, что наименьшее количество времени требуется штаммам SATURN и КА-4 *P. punjabense* при инкубации при 30°C (14,5 ч) и штамму КА-5 - при 33°C (15 ч), а также при культивировании штамма F126 *P. brasiliense* при 33°C (14,5 ч). Максимальная скорость выхода на экспоненциальный рост в диапазоне 24-33°C наблюдается при культивировании штамма F048 *P. atrosepticum*, при этом наибольшее значение наблюдается при 30°C и составляет 1310 минут с начала эксперимента.

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

Для конструирования праймеров специфичных к *Pectobacterium punjabense* была проведена молекулярно-генетическая характеристика штаммов КА-4, КА-5 и SATURN, посредством секвенирования гена 16S рРНК с классическими праймерами 27F и 1492R (Lane, 1991), позволившая выявить нуклеотидную идентичность вышеописанных штаммов по сравнению с типовым штаммом SS95 *P. punjabense* (регистрационный номер NCBI GenBank: CP038498.1) на 99,9%. Результаты полногеномного секвенирования штамма

SATURN (регистрационный номер NCBI GenBank: JBBWSM000000000) позволили провести расчеты средней идентичности нуклеотидов (ANI) и филогенетический анализ последовательностей, по результатам которых была подтверждена принадлежность исследуемого штамма к виду *P. punjabense*. В результате проведенных анализов нуклеотидных последовательностей в качестве целевого участка был выбран ген, кодирующий *ShlB/FhaC/HecB* семейство белков секреции гемолизина (регистрационный номер NCBI GenBank: WP_010681414.1), связанный с системой секреции V типа и присутствующий в одной копии у всех ранее известных штаммов *P. punjabense* (Zhou et al., 2022).

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.

Анализ qPCR Taqman показал 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 (концентрации всех ДНК были откалиброваны по 10 нг/мкл), наиболее распространенных в РФ видов возбудителей черной ножки и мягкой гнили (Lukianova et al., 2021). Пороговый уровень чувствительности для десятикратных разведений ДНК штамма SATURN, был определен при концентрации геномной ДНК в 0,005 нг/мкл со средним значением порогового цикла (Ct) 36,45 (Рисунок 4Б). Эффективность ПЦР реакции, рассчитанной в линейной зоне, составила 96,21% (Рисунок 4А).

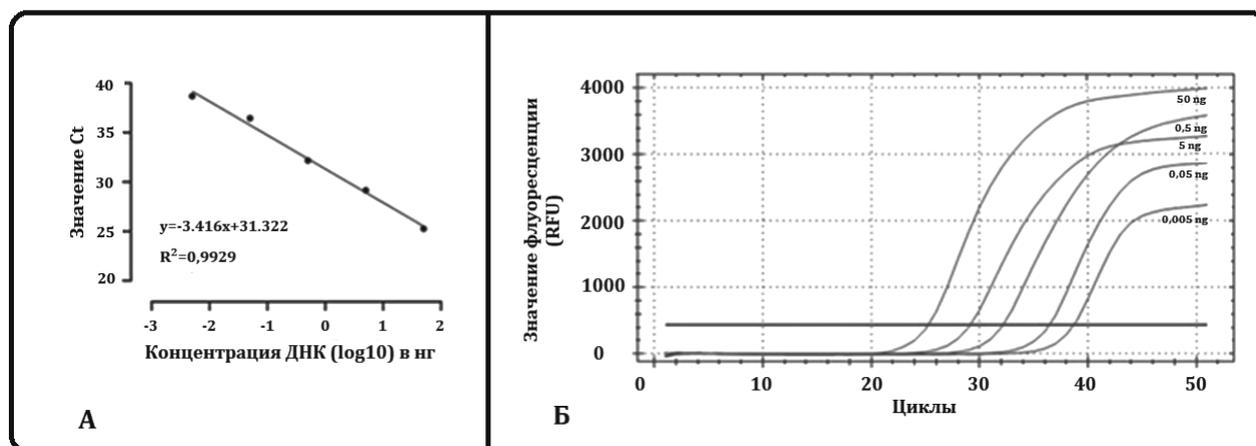


Рисунок 3. Чувствительность обнаружения ДНК *P. punjabense* при постановке ПЦР в реальном времени (А – стандартная кривая, показывающая зависимость Ct от концентрации ДНК патогена в реакции, построенная на основе пороговых циклов; Б – кривые флуоресценции, полученные для серии десятикратных разведений геномной ДНК штамма SATURN)

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

Оценка бактерицидных свойств фунгицидов показала, 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 DSM4610 *Dickeya chrysanthemi*. Бактериостатический эффект 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. 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 Р в среде вызывало бактериостатический эффект вплоть до достижения концентрации действующего вещества 0,69 г/л, при которой биологическая эффективность Курзата Р снизилась до 0%.

При дальнейшем скрининге фунгицида Ридомил Голд Р по отношению 9 штаммам, принадлежащим к 4 видам *Pectobacterium*, выделенных в различных регионах РФ было показано, что внесение фунгицида в питательную среду в концентрации 0,284 г/л и более препятствует 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-9 *Pectobacterium brasiliense*. По отношению ко всем остальным изолятам возбудителей черной ножки картофеля биологическая эффективность препарата Ридомил Голд Р составила 100% при всех исследуемых концентрациях.

Исходя из результатов экспериментов по оценке возможных путей передачи патогенов было показано, что применение фунгицида Ридомила Голд Р при обработке по листу позволяет снизить площади покрытия листьев картофеля колониями патогенных бактерий с $19,3 \pm 2,1\%$ (при передаче патогена через механический контакт) и $6,9 \pm 3,2\%$ (при передаче патогена посредством воды) в контроле до 0% в варианте с предварительной обработкой фунгицидом. При оценке возможности патогена продолжительное время сохраняться на металлических и пропиленовых частях орудий труда 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 обработка пластин фунгицидом позволила предотвратить сохранение патогенов на их поверхностях.

По результатам оценки интенсивности поражения листьев при поверхностной инокуляции суспензией патогена на 2-й день эксперимента наблюдалось размягчение листовой пластины с характерным потемнением сосудистой ткани в вариантах положительного контроля. В отрицательном контроле и варианте с предварительной обработкой Ридомилом Голд Р мацерация не была замечена ни в одной повторности. При поверхностной инокуляции побегов картофеля спустя сутки после заражения в одной из повторностей в варианте положительного контроля отмечалось пожелтение

листьев и по мере продолжения эксперимента симптомы нарастали, проявляясь в потемнении и размягчении нижней части стебля, распространяющиеся вверх с переходом на листья, и уже на 2 день эксперимента были зафиксированы во всех повторностях. В варианте 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 свойствах фунгицида Ридомил Голд Р по отношению к эпифитной популяции бактерий.

Также, была проведена оценка возможности передачи инфекции на вегетирующих в теплице растениях, посредством стекания бактериального экссудата с искусственно зараженных растений с признаками загнивания листьев/побегов на условно здоровые растения картофеля. Интенсивность поражения в обоих вариантах нарастала по мере вегетации 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 – была отмечена мацерация верхушек побегов с интенсивностью в $2,11 \pm 0,61$ балла. При искусственной инокуляции побегов заболевание развивалось более стремительно, балл поражения к окончанию эксперимента составил $2,92 \pm 0,71$.

В ходе эксперимента по оценке защитного действия фунгицида Ридомил Голд Р на вегетирующих растениях на 5-й день от заражения растений было отмечено увядание, как на побегах положительного, так и отрицательного контроля, что свидетельствует о факте передачи инфекции. 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%

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

По итогам первичного скрининга антибактериальной активности 25 эфирных масел методом диффузии в агаре в отношении 4 штаммов пектолитических бактерий (DSM4610 *Dickeya chrysanthemi*, DSM18020 *Dickeya dadantii*, DSM30168 *Pectobacterium carotovorum*, и DSM22556 *Pectobacterium odoriferum*) наибольшие зоны ингибирования были отмечены при применении 8 эфирных масел (душицы обыкновенной, кориандра китайского, тмина обыкновенного, пихты сибирской, кориандра посевного, тимьяна обыкновенного, чабера садового и гвоздичного дерева). Среди 7 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 дальнейшем этапе скрининга.

Значения МИК эфирных масел варьировали в диапазоне 1,25-10,0 мг/мл. При этом только значения эфирных масел душицы обыкновенной, коричника китайского и гвоздичного дерева находились в минимальном диапазоне: 1,25-2,5 мг/мл. Значения МИК растительных экстрактов оказались значительно выше, чем МИК эфирных масел, и колебались в основном в диапазоне 12,5-100,0 мг/мл. В качестве наиболее эффективных растительных экстрактов были отобраны этанольные экстракты бадана толстолистного и дуба обыкновенного, значения МИК которых варьировали в диапазоне 12,5-50,0 мг/мл. Наименьшие показатели МБК были отмечены у вышеперечисленных масел и экстрактов, в связи с чем, только они были использованы для последующих исследований.

При профилактическом применении эфирных масел на клубнях картофеля 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 5). При концентрации масла в 10 мг/мл биологическая эффективность варьировала в основном в диапазоне 17,6-36,5% (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. При профилактическом использовании растительных экстракта бадана толстолистного в диапазоне концентрации 150–200 мг/мл и экстракта дуба обыкновенного в концентрации 100–150 мг/мл, также была достигнута 100%-ная биологическая эффективность. При снижении концентраций экстрактов до 50 мг/мл значения БЭ варьировала от 14,3 до 35,8 %.

100%-ная биологическая эффективность не была достигнута при лечебном применении растительных экстрактов. Значения БЭ варьировали в диапазоне от 40,2-71,3% при концентрации экстрактов 200 мг/мл, где первое значение отмечено по отношению к *P. carotovorum* с обработкой экстрактом бадана толстолистного, а второе значение - к *D. chrysanthemi* при обработке экстрактом дуба обыкновенного. При использовании растительных экстрактов в концентрации 50 мг/мл биологическая эффективность варьировала от 1,1% для экстракта бадана толстолистного против *P. carotovorum* до 22,4% - для экстракта дуба обыкновенного против *P. odoriferum*. При лечебном применении эфирных масел БЭ оказалась значительно ниже, чем при профилактической обработке. При максимальных из исследуемых концентраций масел она варьировала в диапазоне 35,6-69,9%, где 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. 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.

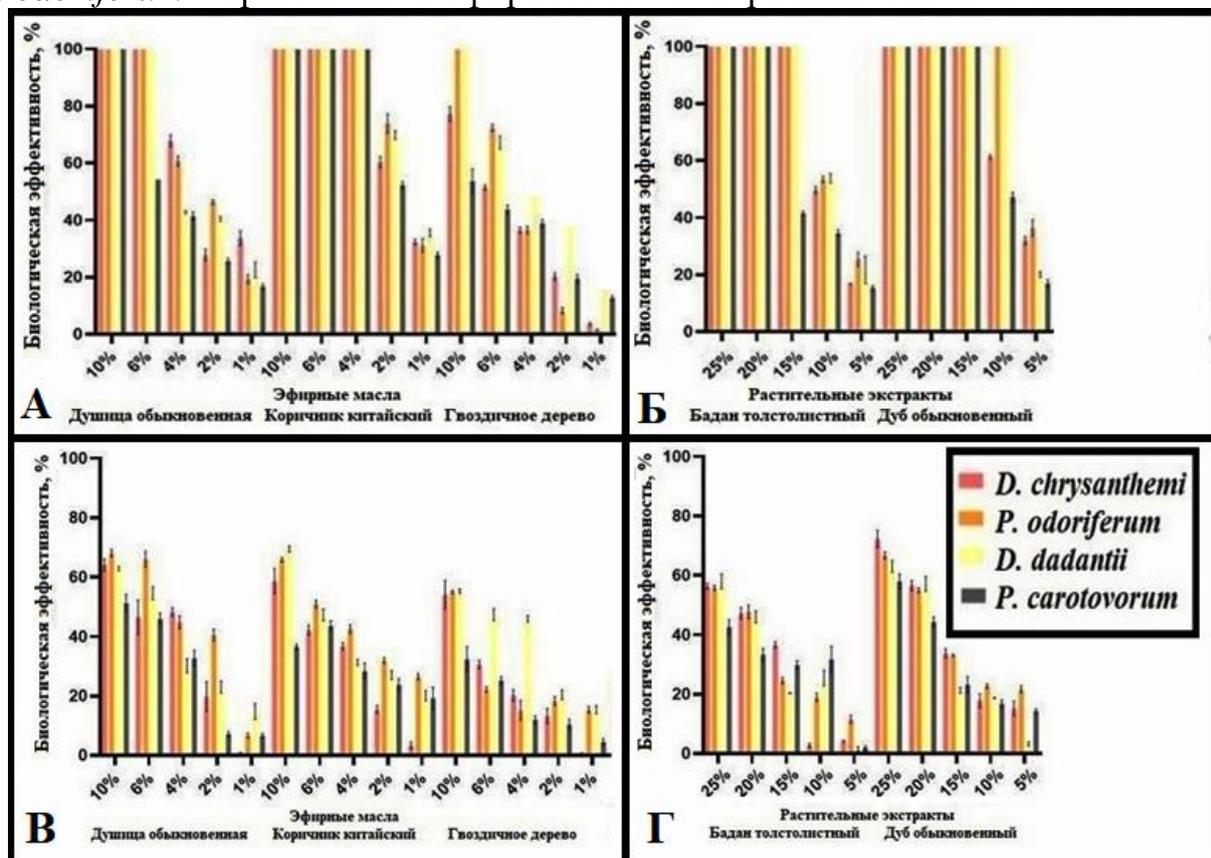


Рисунок 5. Биологическая эффективность защиты клубней от возбудителей черной ножки картофеля, % (А – при лечебном применении эфирных масел; Б – при лечебном применении растительных экстрактов; В – при профилактическом применении эфирных масел; Г – при профилактическом применении растительных экстрактов)

Наименьшее значение глубины мацерации (Р) при использовании минимальной концентрации эфирных масел (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. В тесте по оценке лечебного действия минимальное значение глубины мацерации при обработке эфирными маслами в концентрации 10 мг/мл также 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 Р варьировал от 11,3 мм для *P. odoriferum* в варианте с

обработкой экстрактом дуба обыкновенного до 18,9 мм для *D. chrysanthemi* и обработки экстрактом бадана толстолистного.

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 *P. odoriferum* и *D. dadantii*). 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.

Максимальная потеря массы клубня 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 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*. При обработке клубней картофеля экстрактом бадана толстолистного и дуба обыкновенного в концентрациях 50 мг/мл в варианте, с инокуляцией штаммом *P. carotovorum*, максимальная потеря массы составляла 65,9 и 56,7%, соответственно, против контрольного варианта в 66,3%.

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 и гвоздичного дерева в концентрациях 60-100 мг/мл, а также коричника китайского в концентрации 40-60 мг/мл (против штаммов *P. odoriferum* и *D. dadantii*) позволяют снизить протяженность мацерированного участка со 100% в контроле до полного ее отсутствия в описанных вариантах обработки. Для штаммов *D. chrysanthemi* и *P. carotovorum* максимальное снижение мацерации при применении эфирного масла гвоздичного дерева зафиксировано при концентрации 100 мг/мл и составляет 76,5 и 75,0%, соответственно. Снижение же концентрации эфирных масел до 10 мг/мл отмечается полным отсутствием защитного эффекта, 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. Предварительная обработка стеблей картофеля экстрактами в концентрации 200–250 мг/мл также позволила полностью исключить развитие мацерации. Снижение концентрации экстракта бадана толстолистного и дуба обыкновенного до 50 мг/мл с последующей инокуляцией патогенами привело к снижению мацерации стебля на 29,5% (при использовании экстракта бадана по отношению к *P. odoriferum*) и на 14,3 %

(при использовании экстракта дуба по отношению к *D. chrysanthemi*) по сравнению с контролем. Однако по отношению к остальным изолятам данная концентрация экстрактов оказалась неэффективна, и мацерация стеблей достигла 100%.

При анализе 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*. Аналогичные результаты отмечали при применении экстракта дуба обыкновенного в концентрации 250 мг/мл по отношению ко всем используемым штаммам и экстракта бадана толстолистного по отношению к *D. dadantii*. Минимальная по сравнению с контролем площадь покрытия листа патогенами была отмечена при применении эфирного масла коричника китайского в концентрации 10 мг/мл и варьировала в диапазоне 65,6–85,4%, что на 8,0–29,5% ниже значений в контроле. Использование экстракта дуба обыкновенного в концентрации 50 мг/мл способствовало снижению площади покрытия бактериальными колониями листа на 3,1–18,3% в сравнении с контролем.

Образцы эфирных масел и экстрактов растений оценивали качественно и количественно с помощью ГХ-МСД и ГХ-ПИД соответственно. Всего при анализе 3 эфирных масел и 2 растительных экстрактов было идентифицировано: 24 соединения в составе эфирного масла душицы обыкновенной (карвакрол (62,32%), цимен (19,85%), гамма-терпинен (4,85%), тимол (3,52%), линалоол (2,53%) и т.д.); 18 соединений - в составе эфирного масла коричника китайского (коричный альдегид (84,25%), о-метоксикоричный альдегид (6,91%), диметил ацеталь коричного альдегида (3,36%) и т.д.); 16 соединений - в составе эфирного масла гвоздичного дерева (эвгенол (76,98%), кариофиллен (14,91%) и т.д.); 22 соединения - в составе экстракта бадана толстолистного (уксусная кислота (27,85%), 5-метил-3-метилендигидро 2(3H)-фуранон (20,32%), эвгенол (10,94%), капроновая кислота (6,91%) и т.д.); 28 соединений - в составе экстракта дуба обыкновенного (капроновая (28,52%), изовалериановая (28,31%), уксусная (21,88%) кислоты и т.д.).

3.6. Использование бактериофагов в защите картофеля от возбудителей 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.

По результатам оценки литической способности 10 бактериофагов по отношению к 24 штаммам 7 видов возбудителей черной ножки и мягкой гнили на картофеле 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. dianthicola*, 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.

По итогам эксперимента не удалось добиться полной защиты от мацерации на обработанных ломтиках картофеля, однако было зафиксировано снижение диаметра мацерации на вариантах с использованием фагов 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. В экспериментах на клубнях картофеля за счет применения бактериофагов удалось добиться снижения диаметра мацерации до нуля в вариантах с инокуляцией штаммами F126 *P. brasiliense* и F022 *P. versatile* 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

По результатам клубневой оценки сортов картофеля на устойчивость к мягкой гнили, согласно анализу средних по переменным «сорт» – «температура», диаметры зон мацерации на ломтиках картофеля при температуре инкубации 13,5 °С варьировали в диапазоне 13,0-18,7 мм, при температуре 22 °С –21,1-28,0 мм. Наименьшие величины были отмечены на сорте Красавчик, наибольшие – Жуковский ранний. Дальнейший анализ средних показал, что наименьшей агрессивностью отличался штамм F126 *P. brasiliense*, только 2 из 16 сортов были к нему высоковосприимчивы. У наиболее агрессивного штамма F004 *P. atrosepticum* средний диаметр мацерации был на 14% больше, а по рангу реакции пониженную восприимчивость к этому штамму проявили только 3 сорта. Промежуточное положение занимал штамм D9 *D. dianthicola*, степень агрессивности которого была в среднем на 9% выше, чем у штамма F126.

Согласно результатам оценки по переменным «сорт» - «штамм» к генотипам с наибольшей устойчивостью к мягкой гнили можно отнести сорта Красавчик и Удача, в меньшей степени – Шарвари пирожка и Варяг (Рисунок 6А). Наибольшая восприимчивость отмечена на сортах Жуковский ранний и Айл оф Джюра. 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%.

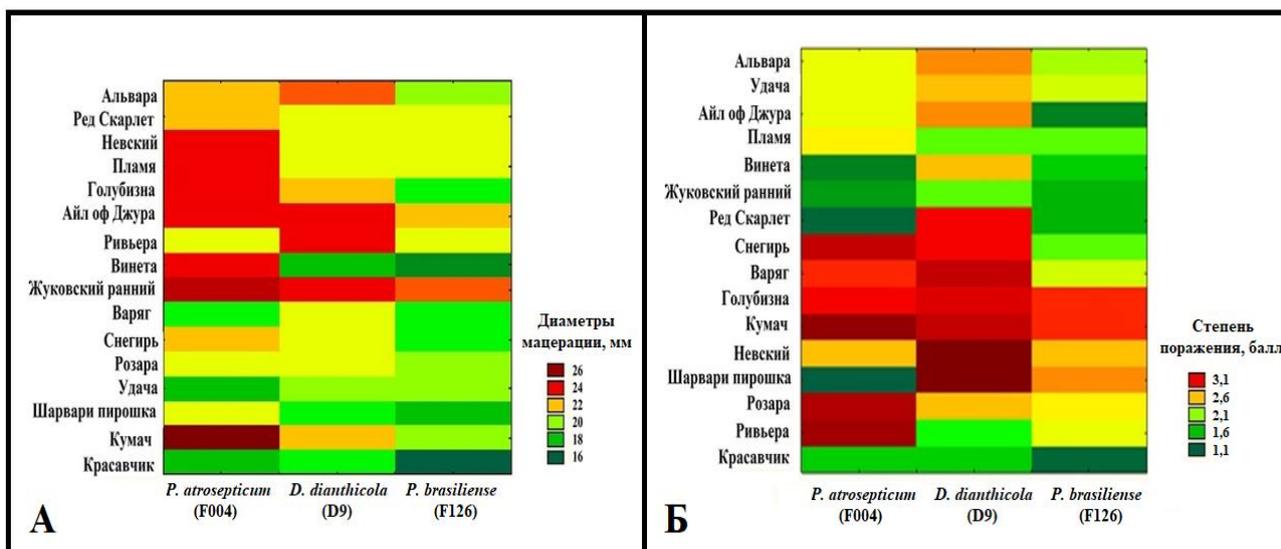


Рисунок 6. Кластеризация сортов картофеля по степени поражения на фоне искусственного заражения различными штаммами патогенов (А – оценка по средним значениям диаметров зоны мацерации, мм; Б – оценка по степени поражения черной ножкой картофеля, балл)

По результатам оценки реакции вегетирующих растений различных сортов картофеля к возбудителям черной ножки средний балл поражения в течение 26 дней наблюдений варьировал в пределах от 0,1 до 4,3. Наибольшую скорость нарастания симптомов отмечали с 14-й по 17-й день после инокуляции (0,23 балла в сутки), наименьшую – в начале опыта с 5-го по 10-й день и в конце эксперимента с 28-го по 31-й день после инокуляции. Анализ средних величин баллов поражения показал, что наименьшей агрессивностью, как и при анализе ломтиков картофеля, отличался штамм F126 *P. brasiliense*. По спектру поражаемых сортов он также наименее агрессивен, высокая восприимчивость к нему отмечена только у 3 генотипов. Штамм D9 *D. dianthicola* проявлял на 28% большую агрессивность по отношению к вегетирующим растениям, по сравнению с F126, и оказался на 17% агрессивнее, чем штамм F004 *P. atrosepticum*, который был наиболее вредоносным при заражении клубней.

По результатам оценки взаимодействия переменных «сорт» - «штамм» наиболее устойчивыми ко всем трем штаммам были сорта Красавчик и Жуковский ранний (Рисунок 6Б). 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 восприимчивый для штаммов D9 и F126.

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 говорит о необходимости проведения оценки устойчивости по обоим признакам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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.

Исходя из результатов диссертационного исследования, можно сделать следующие **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 ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Дацюк, А.А*. Оценка бактерицидного действия фунгицида Ридомил Голд Р против возбудителей черной ножки картофеля / **А.А. Дацюк***, Ф.С.У. Джалилов // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2022. – №. 4. – С. 82-93. DOI: 10.26897/0021-342X-2022-4-82-93. EDN: AYVIKO.

2. Дацюк, А.А*. Оценка антибактериальных свойств эфирных масел и растительных экстрактов по отношению к возбудителям черной ножки картофеля / **А.А. Дацюк***, Р.И. Тараканов // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2022. – №. 6. – С. 123-145. DOI: 10.26897/0021-342X-2022-6-123-145. EDN: NHXEJH.

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

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

4. Vasilyeva, A.A. Pectobacterium punjabense Causing Blackleg and Soft Rot of Potato: The First Report in the Russian Federation / **А.А. Vasilyeva**, P.V. Evseev, A.N. Ignatov, F.S.U. Dzhaliyov // Plants. – 2024. – Voll. 13. – №. 15. – P. 2144. DOI 10.3390/plants13152144. (МБД – Scopus, WoS).

Авторские свидетельства, патенты, лицензии:

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

Публикации в сборниках и материалах конференций:

6. Дацюк, А.А*. Анализ антибактериальных свойств фунгицида Ридомил Голд Р в отношении возбудителей черной ножки методом in vitro / **А.А. Дацюк*** // 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, 2022. – С. 173-177. EDN: WOONLI.

7. Дацюк А.А*. Анализ антибактериальных свойств фунгицида Ридомил Голд Р против эпифитной популяции возбудителей черной ножки картофеля / **А.А. Дацюк*** // 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, 2022. – С. 1831-1835. EDN: IUPSFC.

8. Васильева А.А. Перспективы применения эфирных масел в защите картофеля от черной ножки / **А.А. Васильева** // 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. – 2024. – С. 121. ISBN978-5-6051655-2-1.

*Примечание: * - девичья фамилия Васильевой А.А.*