

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования**

«Российский университет дружбы народов»

АННОТАЦИЯ

выпускной квалификационной работы магистра

Пилик Роксаны Игоревны

на тему: «Атипичные фитопатогенные формы в рамках рода
грамположительных бактерий *Curtobacterium*»

Объем дипломной работы 93 страницы, на которой размещены 19 таблиц, 17 рисунков. При написании работы использовалось 114 источника, из них 14 российских и 100 иностранных ресурсов. В качестве объектов исследований были выбраны бактериальные изоляты *Curtobacterium spp*, предмет исследования – новые варианты диагностики фитопатогенных изолятов и поиск биологического метода защиты.

Выпускная квалификационная работа включает в себя введение, две главы литературного обзора с подразделами, материалы и методы, результаты, выводы, заключение, одно приложение.

Во введении раскрывается актуальность темы работы, дается краткая характеристика проблемы бактериальных заболеваний зернобобовых культур, оценка опасности дальнейшего распространения *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* и других близкородственных видов. В первой главе описываются представители рода *Curtobacterium*. Во второй главе подробно рассматриваются биологические и экологические аспекты возбудителя ржаво-бурой пятнистости листьев фасоли. В материалах и методах описывается ход исследовательской работы и используемые методики. После главы с результатами представлены выводы научной работы. Работа завершена заключением, обобщающим анализ литературы и выводы проведенного исследования.

ANNOTATION

of the master's graduation qualification work

By Pilik Roxana Igorevna

on the topic: «Atypical phytopathogenic forms within the genus of gram-positive bacteria *Curtobacterium spp*»

The volume of the thesis is 93 pages, which contains 19 tables, 17 figures. When writing the work, 114 sources were used, of which 14 are Russian and 100 are foreign resources. Bacterial isolates of *Curtobacterium spp* were chosen as objects of research, the subject of research was new options for diagnosing phytopathogenic isolates and the search for a biological method of protection.

The final qualifying work includes an introduction, two chapters of a literature review with subsections, materials and methods, results, conclusion, one appendix.

The introduction reveals the relevance of the topic of the work, gives a brief description of the problem of bacterial diseases of leguminous crops, assesses the risk of further spread of *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* and other closely related species. The first chapter describes representatives of the genus *Curtobacterium*. The second chapter discusses in detail the biological and ecological aspects of the causative agent of rusty brown bean leaf spot. The materials and methods describe the progress of the research work and the methods used. After the chapter with the results, the conclusions of the scientific work are presented. The work is completed with a conclusion summarizing the analysis of the literature and the conclusions of the study.

Содержание

Введение.....	5
Глава 1	9
Общие сведения и биологические особенности рода <i>Curtobacterium</i>	9
Глава 2	14
Вид <i>Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens</i>	14
2.1. Общие сведения о <i>Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens</i>	14
2.2. Ареал распространения и обнаружения патогена	15
2.3. Морфологическая и биохимическая характеристика.....	16
2.4. Симптомы поражения растений	19
2.5. Условия, благоприятствующие заболеванию	22
2.6. Экология и пути инфицирования	23
2.7. Диагностика заболевания.....	25
2.8. Общая информация о защите растений от поражения <i>C. flaccumfaciens pv. flaccumfaciens</i>	26
2.9. Бактериофаги в качестве контроля бактериозов.....	27
Материалы и методы	30
Выделение и анализ изолятов бактерий рода <i>Curtobacterium</i>	30
Приготовление питательных сред.....	33
Условия хранения коллекции изолятов	35
Выделение ДНК.....	36
Постановка ПЦР для идентификации патогенов.....	36
Выделение генов «домашнего хозяйства»	42
Подготовка проб, секвенирование и анализ последовательностей	46

Постановка BOX-PCR.....	47
Проверка патогенности штаммов.....	49
Выделение бактериофагов, поражающих <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	51
Обработка данных.....	53
Результаты.....	54
Морфология изолятов.....	54
Проверка патогенности на фасоли и сое	57
Распределение участков ДНК при BOX-ПЦР	62
Внутривидовое разнообразие по структуре последовательностей ДНК	64
Выделение бактериофагов <i>Curtobacterium</i>	67
Выводы	72
Заключение	74
Благодарности.....	76
Список используемой литературы	78
Приложение 1	92

Введение

По данным ФАО, более половины населения мира страдает от недостатка белка. При этом дефицит белка в питании населения объясняется наличием высокой цены на продукцию животного происхождения [5]. В последние годы внимание к зернобобовым культурам возросло в связи с необходимостью сокращения белкового дефицита в продуктах питания и в фураже сельскохозяйственных животных. Зернобобовые культуры – высокопитательный и концентрированный продукт и корм для сельскохозяйственных животных [2].

Урожайность зернобобовых культур значительно снижается из-за многочисленных болезней. Бактериозы, распространяемые семенами, наносят существенный ущерб росту и развитию растений начиная с фазы всходов. В целях разработки современных методов диагностики бактериозов существует необходимость всестороннего анализа возбудителей бактериальных болезней зернобобовых культур, который включает в себя анализ вероятности их проникновения на территорию Российской Федерации с различными видами продукции, анализ вероятности акклиматизации в конкретный регионах России с учетом специфики абиотических и биотических факторов, анализ вероятности разностороннего влияния на экономику России, анализ состояния окружающей среды и анализ социальной обстановки на территории страны [2].

Борьба с распространением вредных организмов играет важную роль в повышении эффективности сельского хозяйства и в охране окружающей среды. РФ экспортирует зерно зернобобовых в страны, которые предъявляют определенные фитосанитарные требования, в частности, отсутствие карантинных фитопатогенов. Одним из таких патогенов, способных вызывать значительное снижение урожайности и качества зерна, является возбудитель ржаво-бурой бактериальной пятнистости листьев фасоли *Curtobacterium*

flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens*. Данный бактериоз имеет большое значение для Евразийского экономического союза и присутствует во многих регионах выращивания зернобобовых культур, в частности *Phaseolus* spp.

Возбудитель ржаво-бурой пятнистости был включен в Список А2 (высокий риск, присутствует в ряде стран) карантинных объектов Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (European plant protection organization, EPPO), следовательно, он находится под строгим карантинным контролем и является объектом нулевой толерантности в производстве бобовых во многих странах Европейского союза и всего мира [2, 24]. Экономические потери, вызванные бактериальным увяданием, объясняются не только существенным снижением урожайности, но и значительным снижением товарности продукта, где определяющими факторами ценообразования являются внешний вид, размер семян и чистота от карантинных и регулируемых вредных организмов [47].

Наиболее восприимчивыми к ржаво-бурой пятнистости листьев фасоли хозяевами являются растения рода *Phaseolus* spp., в особенности фасоль обыкновенная *Phaseolus vulgaris*, фасоль огненно-красная *P. coccineus*, фасоль луновидная *P. lunatus*, горох обыкновенный *Pisum sativum*, вигна угловатая *Vigna angularis*, маш *V. radiata*, черный маш *V. mungo*, коровий горох *V. unguiculata*, соя культурная *Glycine max*, лобия *Lablab purpureus* [2, 28, 95, 102]. Кроме того, заболевание отмечалось на растениях родов *Ipomea* и *Zornia*, на луговом хвоще и папоротнике, и кроме того, *C. flaccumfaciens* выделяли из бессимптомных растений семейства злаковые, из насекомых вредителей, и грибных культур [27].

Лидирующее положение в мире по посевным площадям и валовому сбору в последние годы занимает соя, фасоль и нут [108]. Фасоль обыкновенная обладает многими достоинствами: является источником белка, обогащает почву азотом и занимает лидирующие позиции по потреблению не проработанных бобов человеком.

Фасоль теплолюбивая культура, выращиваемая в основном в Южном и центральном федеральных округах РФ, хотя, благодаря усилиям селекции, её возделывание значительно продвинулось на север. Валовой сбор фасоли в 2018 г. составили 53,3 тыс. ц. а в 2019 – на 5,2 % больше [107]. В основном культуру возделывают на приусадебных и дачных участках. Промышленное выращивание фасоли часто заканчивается неудачами, в том числе и из-за высокой зараженности семян, произведенных в РФ, и частого поражения бактериальными болезнями во время вегетации. Таким образом, разработка аспектов защиты фасоли обыкновенной необходима для расширения посевных площадей данной культуры на территории Российской Федерации [6].

Соя культурная – высокотехнологичная культура, продукция которой обеспечивает население страны продуктами питания, отрасль животноводства – кормами, а перерабатывающую промышленность сырьем [7, 8]. В 2019 году в России были зафиксированы рекордные урожайность (15,7 ц/га) и валовый сбор сои (3,08 млн т) [108]. Основные регионы возделывания сои находятся в Дальневосточном федеральном округе, Центрально-Черноземном районе и Краснодарском крае [110]. Защита посевов сои от бактериальных болезней, особенно на ранних этапах онтогенеза, имеет важное хозяйственное и экономическое значение [111].

Основные объемы потребления бобовых для питания человека – в странах с быстрорастущим населением, что создает предпосылки роста объемов экспорта [108, 109]. При росте посевных площадей под бобовыми культурами, непрерывного совершенствования технологий возделывания, увеличивается и объем экспортируемой продукции, особенно в такие страны как Китай, Турция, страны Евросоюза [110]. В августе 2021 года был поставлен исторический рекорд по экспорту зернобобовых из РФ [112]. Всё это указывает на необходимость разработки современных систем защиты бобовых культур в том числе и от бактериальных заболеваний.

Контроль бактериозов возможен при использовании свободных от возбудителя семян и соблюдения севооборота. Эффективные химические бактерициды для защиты растений в настоящее время отсутствуют в списке разрешенных пестицидов [1]. Наиболее эффективный метод борьбы с распространением заболевания – использование здоровых семян, сертифицированных на основе тщательных обследований вегетирующих растений и лабораторной экспертизы партий семян. Интродукция фитопатогенных бактерий в новые регионы может произойти с семенным материалом (главным образом фасоли и сои), зараженным бактериальной инфекцией в латентном состоянии, что может вызвать серьезные проблемы в производстве зернобобовых культур [2].

Цель работы: изучить разнообразие представителей рода *Curtobacterium* и их вирулентность для сельскохозяйственных культур.

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

1. Выделение изолятов бактерий рода *Curtobacterium* из растительного и семенного материала с помощью нескольких этапов высева бактерий на полуселективных средах;
2. Проведение молекулярной диагностики изолятов методами классической ПЦР и ПЦР в реальном времени;
3. Подтверждение вирулентности выделенных штаммов рода *Curtobacterium* в отношении фасоли и сои;
4. Подготовка штаммов к секвенированию, секвенирование генов 16S рРНК и анализ полученных последовательностей;
5. Анализ генетического разнообразия штаммов с помощью метода ВОХ-ПЦР;
6. Получение бактериофагов для накопительной культуры *Curtobacterium flaccumfaciens* и определение чувствительности выделенных штаммов бактерий.

Глава 1

Общие сведения и биологические особенности рода *Curtobacterium*

В 1896 году немецкими исследователями Lehmann и Neumann был определен род грамположительных бактерий *Corynebacterium*. Изначально он состоял из патогенных для животных видов бактерий, таких как возбудитель дифтерии *C. diphtheria*. Общими свойствами отнесенных в данный род организмов являлось синие окрашивание метакроматических гранул, отсутствие подвижности клеток и наличие V-образного деления клеток [61].

На годы вперед этот таксон стал репозиторием для группы грамположительных плеоморфных бактерий. Сюда были отнесены почвенные коринеформные бактерий и несколько фитопатогенных организмов, в том числе и возбудитель бактериального увядания фасоли [51, 52].

В целом члены рода *Corynebacterium* вызывали симптомы увядания (вилта) на многих культурных растениях, однако по биохимическим признакам их можно было разделить на две большие группы. В первую попали *C. insidiosum* и *C. michiganense*: медленно растущие организмы, не способные к продолжению жизнедеятельности при температуре выше 35°C. В дальнейшем группа была оформлена в новый бактериальный род *Clavibacter* [20].

Во вторую группу были отнесены организмы с большей скоростью роста на питательной среде, с полярными жгутиками и предельной температурой роста колоний 37°C. В 1972 году японскими учеными К. Yamada и К. Komagata эта группа бактерий была оформлена в род *Curtobacterium* [96]. Позже в данный таксон переместили и возбудителя бактериального увядания фасоли – *Curtobacterium flaccumfaciens* [20].

Название рода *Curtobacterium* происходит от латинского слова «cutus» или «укороченный», что указывает на форму организмов в виде коротких

палочек. Видовое определение *flaccumfaciens*, данное Флоренс Хеджес (F. Hedges) после первичного описания симптомов, вызванных изучаемым ею патогеном, образовано из двух составляющих: «*flaccus*», что означает дряблый или вялый, и слова «*faciens*», которое можно перевести как «создающий» [38].

Отличительными характеристиками бактерий при выделении нового отдельного рода являлись такие факторы как:

- белок орнитин в качестве ключевого протеина клеточной стенки;
- высокий уровень содержания GC в узком диапазоне от 66 до 71%;
- грамположительны, но реакция слабо выражена;
- подвижны;
- медленно образуются кислоты из различных сахаров (в том числе используют меньшее количество углеводов);
- медленно гидролизуют желатин;
- не имеют метакроматических гранул [38].

Начиная с момента выделения рода *Curtobacterium* в 1972 году [38], представители данных микробактерий были изолированы из большого числа растительных и других природных источников. Долгое время род *Curtobacterium* был представлен всего восемью подтверждёнными видами, к которым недавно были присоединены ряд новых предложенных видов и групп штаммов [9, 54, 76].

Все фитопатогенные штаммы, вызывающие увядание и гнили различных бобовых культур, свеклы и декоративных растений были выделены в отдельный вид *C. flaccumfaciens*, и дальше разделялись на несколько патоваров в зависимости от растений хозяев и физиологических свойств [20, 41].

Между тем для большинства описанных штаммов *Curtobacterium spp.* не установлено, патогенны ли они для растений, с которых были выделены первоначально [57]. Многие штаммы были выделены как эндофиты в сахарном тростнике, винограде, кукурузе, сорго, томатах, кофе, черном перце, клубнике, цитрусовых, на тополе и эвкалипте, в то время как предположительно сапрофитные виды были получены из донных морских отложений и нефтяных рассолов [11, 12, 28, 62, 68, 69, 91, 95, 102].

В современной классификации в таксоне *Curtobacterium* выделяют следующие виды: *C. albidum*, *C. ammoniigenes*, *C. citreum*, *C. fangii*, *C. flaccumfaciens*, *C. glycinis*, *C. gossypii*, *C. herbarum*, *C. luteum*, *C. oceanosedimentum*, *C. oryzae*, *C. pusillum* (табл. 1) [105]. Восемь из них считаются подтвержденными, остальные были предложены в 2021 году [76].

Таблица 1

Виды рода *Curtobacterium spp.*

Название вида	Краткое описание
<i>C. albidum</i> (Kogamata and Iizuka, 1964)	Эндофит, способствующий развитию толерантности к засолению у растений риса
<i>C. ammoniigenes</i> (Aizawa et al., 2007)	Эндофит, встречается на кислых сульфатных почвах
<i>C. citreum</i> (Kogamata and Iizuka, 1964)	Эндофит риса
<i>C. fangii</i> (Seaton et al., 2021)	Патоген пшеницы
<i>C. flaccumfaciens</i> (Hedges, 1922)	Патоген бобовых культур
<i>C. glycinis</i> (Seaton et al., 2021)	Эндофит сои
<i>C. gossypii</i> (Seaton et al., 2021)	Эндофит хлопчатника

<i>C. herbarum</i> (Behrendt et al., 2002)	Филлосфера злаковых трав
<i>C. luteum</i> (Kogamata and Iizuka, 1964)	Эндофит риса
<i>C. oceanosedimentum</i> (Carty and Litchfield, 1978)	Сапрофит в морских отложениях
<i>C. oryzae</i> (Seaton et al., 2021)	Эндофит риса
<i>C. pusillum</i> (Kogamata and Iizuka, 1964)	Встречается в рассолах нефти

В данный момент филогенетическая и видовая классификация на основе рибосомальных генов и плазмидных ДНК подвергается значительному пересмотру, что затрагивает и существующие патовары вида *Curtobacterium flaccumfaciens* (табл 2). Важным вопросом является связь механизмов патогенности представителей *Curtobacterium* с их таксономией и филогенезом [30]. Показано, что геномы плазмид *Curtobacterium* содержат возможные гены вирулентности, а влияние мобильных элементов и обмена генами между бактериями может помочь выявить пути возникновения патогенных штаммов и их разновидностей [13, 55].

Таблица 2

Представители вида *Curtobacterium flaccumfaciens*

Патовар	Поражаемое растение
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> <i>pv. basellae</i> (Chen et al., 2000)	Базелла белая
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> <i>pv. betae</i> (Collins, M. D., and Jones, D. 1983)	Свекла столовая

<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> <i>pv. beticola</i> (Chen et al., 2007)	Свекла сахарная
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> <i>pv. flaccumfaciens</i> (Hedges, 1922)	Бобовые, томат, тыквенные
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> <i>pv. oortii</i> (Collins, M. D., and Jones, D. 1983)	Тюльпаны
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> <i>pv. poinsettiae</i> (Starr & Pirone, 1942)	Молочай

Глава 2

Вид *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Самым изученным видом внутри рода *Curtobacterium* spp. является *C. flaccumfaciens*. В данной работе основное внимание уделено его разновидности *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

2.1. Общие сведения о *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Систематическое положение вида рода *Curtobacterium*:

Домен: *Bacteria*

Отдел: *Actinobacteria*

Класс: *Actinobacteria*

Порядок: *Micrococcales*

Семейство: *Microbacteriaceae*

Род: *Curtobacterium*

Вид: *Curtobacterium flaccumfaciens*

Разновидность: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Существуют также и другие научные названия данного вида: *Bacterium flaccumfaciens* Hedges, *Phytomonas flaccumfaciens* (Hedges) Bergey et al., *Pseudomonas flaccumfaciens* (Hedges) Stevens, *Corynebacterium flaccumfaciens* (Hedges) Dowson [102].

Описание бактерий вида *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* впервые встречается в работах Флоренс Хэджес, ведущего американским фитопатологоа растений и ботаника в Бюро растениеводства Министерства сельского хозяйства США, в 1922 году. На фермерских

хозяйствах Южной Дакоты потеря урожая фасоли обыкновенной составляла до 90% [38]. В своей работе Ф. Хэджес выделила новый патоген из сосудов стебля: заболевание сопровождалось изменением васкулярного кольца с зеленого на коричневый. Колония патогена имела отличительную особенность – ярко-желтую окраску. В той же статье было показано, что патоген вирулентен не только для *Phaseolus vulgaris*, но также для *Phaseolus lunatus* и *Glycine max* [41].

В период с 1920-х по 1950-е гг. патоген, получивший название *Bacterium flaccumfaciens*, был обнаружен в разных штатах Северной Америки, кроме того, были выделены изоляты аналогичной бактерии в странах Европы (Германия, Франция). Таким образом патоген имел достаточно широкий ареал обитания [42]. На посевах, где проявлялись симптомы бактериального увядания фасоли, в 35% случаев отмечался комплекс *Bacterium flaccumfaciens* с возбудителем обычного бактериального ожога фасоли *Xanthomonas campestris pv. phaseoli* (син. *Xanthomonas phaseoli pv. phaseoli*) [15, 99].

После 1920-х годов патоген вызывал эпифитотии на посевах довольно редко и значительного экономического ущерба он не наносил. Однако в 2004 году болезнь сильно повредила посевы жёлтой фасоли сорта «Энола», широко распространенной в штате Небраска. Это было первое сообщение за 30 лет о массовом инфицировании посевов в США [39].

2.2. Ареал распространения и обнаружения патогена

Точный диапазон распространения *S. flaccumfaciens* на сегодняшний день не определен. Поступали сообщения об эпифитотиях в Канаде, Австралии, Южной Африке, Мексике, Бразилии [44, 100]. Кроме того, патоген обнаруживался в некоторых странах Европейского Союза, включая Болгарию, Бельгию, Грецию, Румынию, Венгрию, Польшу, Украину. Также значительный ущерб болезнь наносила в России и Турции [24, 100]. Кроме

сообщений о поражении посевов фасоли в Испании в 2005 году других признаков массового заражения растений в Европейском регионе не наблюдалось.

C. flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* был включён ЕОКЗР в Список А2 карантинных объектов [24].

На территории Российской Федерации патоген был обнаружен в 1980-х годах на сое на территории Дальнего Востока (без подтверждения идентичности культуры) и некоторых Южных регионах [36]. Для установления зоны распространения возбудителя на территории РФ мониторинг пока не проводился.

2.3. Морфологическая и биохимическая характеристика

Возбудитель ржаво-бурой пятнистости листьев фасоли является аэробной грамположительной, живущей отдельной клеткой или парами, коринеформной палочкой размером 0,3-0,5 x 0,6-3 мкм. Не образует капсул, подвижна за счёт 1-3 передних или полярных жгутиков. На мясо-пептонном агаре бактерия образует жёлтые, круглые, гладкие, плоские или слегка выпуклые колонии, блестящие, полупрозрачные, с ровными краями. При инкубациях на средах NBY и YPGA в темноте при 23°C через 3-4 дня появляются круглые колонии размером 2-4 мм, гладкие, с цельными краями, чаще выпуклые и полупрозрачные. Со временем колония значительно темнеет [24].

Возбудитель ржаво-бурой пятнистости листьев уникален своей способностью продуцировать штаммы, обладающие разнообразной окраской (рис 1). Многие десятилетия с момента первого описания *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* было известно, что бактерия образует колонии кремово-желтого или ярко-желтого цвета на твёрдой среде [41]. Однако были обнаружены штаммы возбудителя с иной окраской. В 1950-х в штате Небраска

был описан штамм с яркой оранжевой пигментацией. Морфологически, физиологически и серологически новый штамм ничем не отличался от классического желтого штамма бактерии, кроме как окраской, которая оставалась стабильной даже после нескольких пересевов на среды, а также после повторной инокуляции ими растений [80].



Рисунок 1. Различная окраска штаммов *Curvobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. А – окраска колоний на твёрдых питательных средах, Б – изменение окраски семян, пораженных различными штаммами патогена [38].

В 1968 другой вариант был изолирован из белосемянной фасоли, он давал фиолетовые колонии при культивации на твёрдых средах. Этот вариант патогена имел отличительные биологические особенности. Фиолетовые штаммы обладали меньшей вирулентностью и продуцировали ярко-фиолетовый или синий водорастворимый пигмент, который выделялся в среду, а также обесцвечивал окраску семян [82]. Пигменты, продуцируемые этими штаммами, часто нестабильные и экспрессируются в культуре не постоянно. Без продукции пигмента эти изоляты неотличимы от других желтоокрашенных штаммов. Фиолетовые штаммы всё еще очень редки, официально о его обнаружении за пределами штата Небраска сообщалось только один раз [46].

В 2007 году был выделен розовый штамм, идентифицированный как *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Тесты на патогенность показали, что розовый штамм обладает высокой вирулентностью по отношению к фасоли (*Phaseolus vulgaris*), стабильно сохраняет окраску [4]. В 2014 в Иране был обнаружен вариант красной расцветки [73]. Таким образом известно, что *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* способен давать штаммы различной окраски, которые сохраняются при множественном пересеве на твёрдые среды [38].

Изучение биохимических свойств бактерий основывается на изучении их ферментов и метаболитов. Ферментативные свойства являются основным таксономическим признаком, учитываемом при идентификации микроорганизмов. *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* не производит газ, но гидролизует глюкозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, галактозу, фруктозу, рамнозу, маннозу и глицерол; леван негативен, позитивен на каталазу, желатин растворяется медленно [18]. Кроме как на пигментации колоний, различия в вариантах патогена установлены на биохимической и физиологическом уровнях [73]. Максимальная температура роста колоний бактерии установлена на отметке 37°C, однако оптимальный диапазон находится в 27-32°C. Патоген способен утилизировать ацетат, цитрусовую

кислоту, фумарат, фумаровую кислоту, глюконовую кислоту, молочную и яблочную кислоты, в то же время не способны растворять глиоксиловую кислоту, пропионат и альфа-кетоглутаровую кислоту [31]. Бактерия способна продуцировать сероводород, гидролизовать эскулин и казеин, а также продуцировать кислоты из L-рамнозы. Стенка бактерии содержит галактозу, но недостаточно глюкозы и фукозы. Содержание G+C колеблется около 71,1% [31, 73].

2.4. Симптомы поражения растений

Первичные признаки симптомов заболевания в поле заключаются в проявлении увядания листьев растений в периоды теплой сухой погоды или в период значительного переувлажнения. Болезнь проявляется в основном в стрессовых условиях, так как патоген присутствует в сосудистой системе растения, что блокирует нормальное передвижение воды от корней к листьям (рис 2).

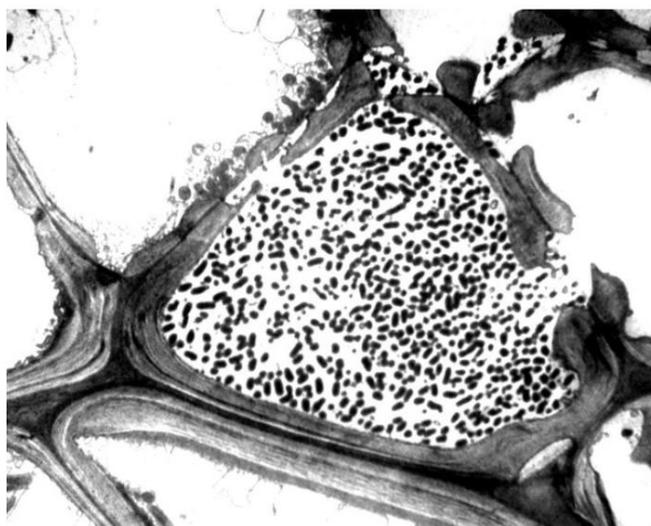


Рисунок 2. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* в пораженном сосуде ксилемы фасоли под электронной микроскопией [86].

Поражение растений ржаво-бурой пятнистостью листьев характеризуется потерей тургора, увяданием листьев или их частей при высокой температуре. Растения часто восстанавливаются в течение вечерних часов, когда температуры становятся ниже, но снова увядают днём. Тяжесть болезни и количество погибших растений чаще выше на у молодых растений или тех, которые выросли из инфицированных семян [57].

Проростки сильно подвержены заболеванию, особенно на этапе роста высотой 5-7,5 см, чаще всего пораженные растения в этом возрасте погибают. Симптомы на более зрелых растениях менее выражены, так как заболевание прогрессирует медленнее. В результате закупоривания сосудов прекращается передвижение воды и питательных веществ к органам растения, листья становятся коричневыми и опадают (рис. 3) [2].



Рисунок 3. Растения сои, инокулированные вирулентными штаммами *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* на 20 и 30 сутки после заражения [38].

На бобах фасоли симптомы более заметны. При визуальном здоровом виде семян они все могут быть латентно инфицированы. На молодых бобах иногда появляются водянистые пятна, которые становятся впоследствии

желтовато-зелеными. На зрелых бобах повреждения более заметны: пораженные бобы становятся оливково-зеленого цвета, в то время как здоровые остаются желтыми [2].

Бактерии попадают в сосудистую систему растения либо с помощью пораженных заболеванием семян, либо через повреждения покровных тканей. Если растение доживает до зрелого возраста, инфекция через ксилему попадает в почки и семенные зародыши, иногда вызывая обесцвечивание семян. Изменение окраски происходит, даже если стручки выглядят здоровыми и не имеют внешних повреждений, что играет большую негативную роль для рынка белосемянных сортов фасоли [78]. Резко-контрастирующие цвета, появляющиеся на семенном материале пораженных растений, обладают теми же оттенками, которые можно будет наблюдать при выделении патогена в чистую культуру на питательной среде [38].

Растения, выращиваемые на высокогорных плато, демонстрировали дополнительные симптомы в виде промежуточных некротических язв с ярко-желтыми хлоротичными границами [35, 40, 84]. Такие симптомы могут быть очень схожи с заболеванием обычным бактериальным ожогом, вызываемым *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Однако области увядания растения выражены намного сильнее и поражение *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* часто ведет к гибели всего растения, что является значительным отличием от симптомов типичного протекания обычного бактериального ожога [40, 84]. Увядание и гибель растений также менее вероятны при поражении посевов ореольной пятнистостью и бурой пятнистостью, вызванных соответственно *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolica* и *P. syringae* pv. *syringae* [37, 84].

Для более точной идентификации необходимо применять методы лабораторной молекулярной диагностики. Однако, как правило, при первичной диагностике заболевания ржаво-бурой пятнистости в полевых условиях, необходимо установить наличие совместных признаков увядания и ярко-выраженной пятнистости.

2.5. Условия, благоприятствующие заболеванию

Условия, способствующие распространению и поражению растений возбудителем ржаво-бурой пятнистости листьев, схожи с условиями, благоприятствующими многим другим бактериальным заболеваниям бобовых. Они включают в себя: посев зараженного семенного материала, нарушение севооборота, посев бобовых в непосредственной близости от полей, где заболевание наблюдалось в предыдущий сезон, несоблюдение профилактических приемов агротехники, погодные условия, способствующие сильному переувлажнению растений в теплое время суток [49, 84]. Высокая температура (больше 30°C) является ключевым условием проявления заболевания, так как оптимальная температура развития патогена находится в диапазоне от 27 до 38°C, а также известно ослабление устойчивости растений к бактериозам при температуре выше 28°C [25, 24, 92, 93].

Возможность заражения растений значительно увеличивается при наличии на растении повреждений, появившихся вследствие любого механического повреждения, вызванного погодными условиями, человеком, животными (в том числе насекомыми, нематодами, клещами и моллюсками) или сельскохозяйственными орудиями [40, 84]. Бактерия не способна проникать через целостный покров растения, ей требуются естественный доступ во внутренние ткани растения (такие как устьица) или небольшие повреждения. Погодные условия с сильными ветрами, ливни и град способствуют не только большому количеству повреждений растений, но и физически перемещают патоген и части зараженных растений между полями. Именно поэтому чаще всего самые крупные потери урожая от бактериозов случаются в те года, когда можно наблюдать выпадение значительных осадков [14, 16].

2.6. Экология и пути инфицирования

Ф. Хэджес (F. Hedges) описала в своей работе ржаво-бурую пятнистость листьев фасоли, как семенную инфекцию [42]. Ее выводы были подтверждены дальнейшими исследованиями, показывающими, что зараженный семенной материал является преимущественным вектором распространения патогена на новые территории [99].

C. flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* характеризуется слабой способностью выживания в почве. Продолжительность жизни патогенной бактерии вне хозяйского организма невелика в силу слабых сапрофитных конкурентных качеств. Кроме того, бактерия не образует спор, которые могли бы позволить организму переживать неблагоприятные условия. Поэтому *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* необходимы другие пути существования вне растения. Таким способом является колонизация растительных остатков и существование в них, пока поблизости не окажется нового растительного организма. Перезимовывает в основном в растительных остатках и сорной растительности [32, 58, 75]. Вопрос передачи возбудителя почвенными нематодами до конца не изучен, хотя есть свидетельства выделения бактерий из нематод [101].

Возбудитель ржаво-бурой пятнистости способен выживать в почве в полевых условиях в течение 34 – 80 дней в зависимости от температуры и влажности [32]. Бактерии в зараженной сухой соломе на поверхности почвы способны сохранять свою жизнедеятельность до 22 месяцев и намного хуже выживают в растительных остатках, заделанных на глубину почвы 20 см и более [79]. Патоген способен перезимовывать на зараженных растительных остатках, сорной растительности, но не долго сохраняется в почве [98].

Основной хозяин *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* – *Phaseolus vulgaris* [24]. Сообщается, что хозяевами этого вредителя являются и другие бобовые культуры, в частности несколько других видов, принадлежащих к роду

Phaseolus, родам *Vigna* и *Dolichos*, включая гиацинтовые бобы (*Lablab purpureus*), а также горох (*Pisum sativum*) и сою (*Glycine max*).

В научной литературе в качестве хозяев ржаво-бурой пятнистости также упоминаются виды *Lupinus polyphyllus* [82], *Cicer arietinum*, *Vicia faba*, *Vicia villosa*, *Lens culinaris* [73] и *Zornia* spp. [60], в дополнение к видам рода *Amaranthaceae*: *Amaranthus retroflexus* и *Chenopodium album* [83], а также к *Ipomoea lonchophylla* [89].

Более того, диапазон хозяев *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* может быть даже шире, поскольку бактерия способна адаптироваться к новым хозяевам. *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* был недавно обнаружен и выделен из нескольких сельскохозяйственных культур, часто выращиваемых в чередовании с бобовыми, таких как пшеница, кукуруза, подсолнечник, люцерна, ячмень, черный овес, белый овес, рапс, райграсс и пасленовые растения [32, 38, 72]. Это делает степень неопределенности диапазона хозяина. В связи с этим существуют рекомендации по избеганию посева вышеперечисленных культур после бобовых в севообороте, если ранее на этих полях наблюдались вспышки заболевания ржаво-бурой пятнистостью листьев [32, 75, 77]. *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* был так же обнаружен на растениях баклажана, перца и томата, однако симптомов заболевания и сильного экономического ущерба не наблюдалось [72].

C. flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* способен в течение долгих лет сохраняться в семенах и распространяться с помощью них на далекие расстояния [58, 78]. Бактерия может находиться как снаружи, так и под оболочкой семени.

Заболевание ржаво-бурой пятнистостью листьев фасоли часто ассоциировано с областями интенсивного орошения. Результаты многолетнего полевого исследования Р.М. Хаверсон (R.M. Harveson) показали, что наиболее низкие показатели инфицирования на фасоли даёт

капельное орошение по сравнению с дождеванием и поливом по борозде. Однако нет доказательств того, что бактерия способна распространяться и заражать растения с помощью поливной воды [97]. Как минимум однажды, бактерии *C. flaccumfaciens* были выделены из сточных вод, часто используемых для полива [10].

2.7. Диагностика заболевания

Для обнаружения заболевания в течение вегетационного периода проводят обследования посевов. Однако по симптомам ржаво-бурую пятнистость листьев фасоли можно спутать с другими заболеваниями бобовых. Кроме того, заболевание может протекать в латентном виде [2].

Для выявления и подтверждения бактериальной инфекции проводят выделение бактерий в чистую культуру и их лабораторное определение: используют биохимические тесты, современные методы серологической и молекулярной диагностики.

Иммунофлуоресцентный анализ может использоваться для подтверждения идентичности чистой культуры предполагаемой бактерии *C. flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* [17, 26]. Однако ИФА, использующий поликлональные антитела, которые были продуцированы против штамма NSPPB 559 демонстрируют низкую чувствительность и не реагируют со всеми штаммами *C. flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* [17, 67]. Протоколы для проведения анализа с помощью ПЦР, разработанные Tegli et. al. [87] и Guimaraes et. al. [33], описаны в диагностическом документе ЕОКЗР РМ 7/102 [23]. Метод ВОХ-ПЦР описан в стандарте ЕОКЗР РМ 7/100. Если необходимо подтверждение и проверка патогенности идентифицированной бактерии, проводят тесты на патогенность на семенах и рассаде растений семейства бобовых [2].

2.8. Общая информация о защите растений от поражения *C.*

flaccumfaciens pv. flaccumfaciens

Семенные инспекции и служба карантина должны предотвращать проникновение зараженного семенного материала посредством внутренней или внешней торговли в ареалы, в которых отсутствует история данного заболевания [24]. На данный момент не существует эффективных средств борьбы с *C. flaccumfaciens pv. flaccumfaciens*.

Пестициды, содержащие медь, и антибиотики демонстрировали отсутствие необходимого результата [89]. Аналогично неэффективной оказалась термическая обработка растений при 52°C в течение 20 часов и при 85°C в течение 5 часов [98].

Harding заключил, что устойчивость к химической обработке связана со способностью *C. flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* образовывать биоплёнки. В 2019 г. Р.М. Хаверсон (R.M. Harveson) сообщил о результатах 7-летнего полевого исследования, в ходе которого изучалась эффективность новых доступных антимикробных пестицидов для борьбы с четырьмя основными бактериальными заболеваниями сухих бобов (фитофторой, ореольной пятнистостью, бурой пятнистостью и увяданием). Эти новые продукты сравнивали с двумя эталонными продуктами на основе меди: гидроксидом меди и сульфатом меди; и некоторые из них продемонстрировали большие перспективы для снижения потерь, связанных с этими заболеваниями [34].

Обработка семян антибиотиком способствует снижению количества бактерий на поверхности семян. Обработка семян суспензией с использованием стрептомицина показала высокую эффективность против *C. flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* [37]. Замачивание семян в растворе, содержащем сульфат меди и окситетрациклин, уменьшило количество бактерий на естественно зараженных семенах, но оказалось неэффективным на искусственно инокулированных семенах [29].

В качестве биологического метода контроля Correa et al. предложил применять комбинацию штаммов *Bacillus cereus* и *Pseudomonas fluorescens* для уменьшения тяжести протекания бактериального увядания с помощью антагонизма бактерий [22]. Снижение бактериального увядания варьировалось от 42 до 76% [93]. Температура окружающей среды (20°C против 30°C) препятствует колонизации растений патогеном и антагонистом, в то время как подавление бактериального увядания с использованием штамма *B. cereus* ALB629 было одинаковым при обеих температурах [66]. Кроме того, замачивание семян с бактериальной суспензией *Pantoea agglomerans* приводила к эндофитной колонизации всего проростка от корня до апикальной меристемы через 7 дней после инокуляции и значительно снижала тяжесть протекания ржаво-бурой пятнистости в вегетационном опыте [45]. Также использование *Rhizobium leguminosarum* в оздоровлении семенного материала уменьшало степень пораженности растений ржаво-бурой и обыкновенной пятнистостью [48].

Бактериофаги были предложены в качестве контроля *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, но никаких детализированных исследований в этом направлении не проводилось [56].

2.9. Бактериофаги в качестве контроля бактериозов

Бактериофаги по своей природе очень специфичны по отношению к бактериальным хозяевам. Эта характеристика имеет как отрицательные, так и положительные аспекты, поскольку она полезна с точки зрения предотвращения отрицательного воздействия на микробиоту хозяина и препятствует обнаружению и устранению целевого патогена. Первое экспериментальное доказательство того, что фаги могут быть связаны с патогенными бактериями растений, появилось, когда было продемонстрировано, что фильтрат, полученный из разлагающейся капусты, способен подавлять капустную гниль, вызываемую *Xanthomonas campestris* pv.

campestris. Также исследователи продемонстрировали, что воздействие фагов на *Pectobacterium atrosepticum* предотвращает развитие мягкой гнили у картофеля. Первое зарегистрированное полевое испытание произошло в 1935 году, когда болезнь Стюарта, вызванная *Pantoea stewartii* на кукурузе, была уменьшена путем предварительной обработки семян фагами [1].

В растениеводстве контроль бактериозов с помощью фагов трудно осуществить из-за ряда проблем. К ним относятся разработка рецептур для эффективной обработки гектаров растений, выращиваемых в монокультуре или в тепличных условиях, оценка восприимчивых хозяйств, включая взаимодействие бактериальных патогенов и растений, а также специфичное совпадение фагов и бактерий, наличие стойких патогенов, перенос патогена ветром, дождь и насекомые, современные методы ведения сельского хозяйства, в которых используются химические пестициды, которые могут быть вредными для фагов, и непредсказуемые погодные условия внутри и между сезонами выращивания [3].

Время введения биоконтроля имеет решающее значение. Терапевтические методы лечения могут включать применение фагов для уменьшения популяции уже существующих патогенов или применение, приуроченное к ожидаемому проявлению патогена на культуре. Для профилактического лечения фаги вводятся до предполагаемого появления патогена. Эффективность обоих вариантов следует оценивать в рамках программы развития биоконтроля. Применение фагов с воздуха требует таких химических составов продуктов, которые обеспечили бы выживание фага в окружающей среде. Альтернативная методология применения заключается в использовании системы доставки культуры живых непатогенных бактериальных клеток, которая обеспечивает выживание и непрерывную репликацию фагов до появления патогена. Например, живые клетки аттенуированного бактериального штамма *Xanthomonas perforans* были

использованы для улучшения устойчивости популяций фагов в почве и на ней [43].

Материалы и методы

Исследования проведены в 2020 - 2021 годах на базе лаборатории кафедры защиты растений РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева и в 2021 - 2022 годах в лаборатории молекулярной биоинженерии Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Сбор исследуемого материала проводился в поступающих образцах семенного и растительного материала из отечественных хозяйств. Источниками бактериофагов являлись образцы почвы и сточные воды, пробы которых были собраны в 2021 году в Московской области.

Выделение и анализ изолятов бактерий рода *Curtobacterium*

Идентификация патогена включает в себя визуальную инспекцию семян, что позволяет обнаружить заболевание в латентной стадии. Изоляция патогена из семян с использованием селективных агаризованных сред проблематична, поскольку культура клеток *Curtobacterium flaccumfaciens* растет относительно медленно, дает мало единичных колоний с семени и не позволяет точно отличить фитопатогенные клетки от сапротрофных и нецелевых бактерий. Латексная агглютинация, иммуноферментный анализ и другие серологические тесты не являются рекомендуемыми, так как не все антитела реагируют со всеми штаммами *Curtobacterium flaccumfaciens*. Более того эти тесты не позволяют выделить именно *C. flaccumfaciens*, а не какого-либо другого представителя данного рода. Таким образом молекулярная диагностика является единственным способом надежного подтверждения наличия патогена в растительном материале, тем более что разработанные для данного патогена ПЦР протоколы являются настолько же специфичными, как и более долговременный и сложнопроводимый тест на фитопатогенность.

Для исследования были получены семена различных сортов фасоли, гороха и сои с полей, где наблюдались симптомы, схожие с поражением *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Исследовались следующие образцы: фасоль *Phaseolus vulgaris* (Саратовская область, ООО «АПК»), соя *Glycine max* (сорта Навигатор и Мезенга, АО «Щелково Агрохим») и горох *Pisum sativum* (сорта Фараон и Софья, АО «Щёлково Агрохим»). Идентификация патогена включала в себя визуальный осмотр семян и выделение патогена в чистую культуру с помощью последовательного разведения смыва с образцов семян. Выделение изолятов из растительного материала осуществлялось в двух вариантах. По стандартной методике, принятой ЕОКЗР [19], каждый образец, содержащий 100 г семян, заливали 300 мл стерильного SPS-буфера (8,5 г NaCl, 991,5 мл дистиллированной воды) и ставили на 12 часов на шейкер при 200 об/мин при температуре 4°C. После 2 мл экстракта осаждали в центрифуге Eppendorf centrifuge 5340 при температуре 4 °C 20 минут при 7000 rpm. Супернатант удаляли и гомогенизировали осадок в 1,5 мл SPS-буфера.

Во втором варианте семена проращивались в чашках Петри во влажных камерах в течение 3-4 дней. Далее отбирались семена, демонстрировавшие проявление следующих симптомов семенной инфекции: изменение окраски или потемнение семядолей, деформация корешка или его закручивание с поражением внутренней стороны завитка. Семена проращивались в бумажных рулонах в течение 10-15 дней. Затем отбирались фрагменты побегов растений (листья, стебли). Для анализа брали около 2 грамм растительного материала. После поверхностной стерилизации (1 мин в водном растворе гипохлорита натрия 0,5%) небольшие фрагменты стебля и листьев (около 1 см каждый), в основном взятые из затемненных тканей, помещали в ступку, накрывали тканью, пропитанной стерильным физиологическим раствором (SFS, 0,85% NaCl в дистиллированной воде); затем образец грубо измельчали пестиком. Оставляли на 10-20 минут для диффузии бактерий в мацерате, после чего

мацерат помещался в пробирку на 1,5 мл. В пробирке производилась повторная гомогенизация образца с помощью пестика, затем пробирку заполняли 1 мл стерилизованной воды. Полученный экстракт осаждали на центрифуге, работали в дальнейшем с супернатантом.

По данным Международного центра сельского хозяйства и биологических наук оптимальными средами для роста и идентификации фитопатогенов *Curtobacterium flaccumfaciens* являются среды NBY (Nutrient broth yeast extract agar medium) и YPGA, а для более строгого определения такие среды как MSCFF (Semiselective medium for *C.flaccumfaciens pv. flaccumfaciens*) и SSMF (Semiselective medium). Однако ни одна среда не является строго селективной. Ситуация так же осложняется тем, что *C. flaccumfaciens* проявляют различную окраску, ее насыщенность, структуру и другие морфологические признаки в зависимости от вида растения, из которого был выделен патоген, рН среды, температуры и влажности термостата.

В нашей работе было принято решение выделять целевые бактерии по следующей схеме:

- первичный посев суспензии растительной ткани на MSCFF;
- выбор изолятов, дающих специфичную реакцию на агаризованной среде;
- проверка грампринадлежности;
- пересев колоний на YDC с содержанием 7% NaCl;
- пересев на среду SSM.

Для получения изолированных колоний наносили пипеткой по 100 мкл суспензии с пятью десятикратными разведениями, шпателем Дригальского равномерно распределяли материал по поверхности среды MSCFF. Чашки помещали в термостат при температуре 28°C, где выдерживали в течение 96 часов. Таким образом получали смешанные культуры бактерий.

Далее исследовались те колонии, которые демонстрировали специфические изменения окраски селективной среды. При отборе типичных колоний ориентировались на референтный штамм CFBR 3418, имевший следующие характеристики: цвет колоний желтоватооранжевый, консистенция мукоидная, вокруг колоний на среде MSCFF прозрачная зона 7-10 мм, как признак гидролиза казеина и красителя конго ред.

Колонии, показавшие рост на среде MSCFF проверяли на грампринадлежность при помощи КОН-теста [81]. Изоляты, оказавшиеся грамположительными пересевали на среду YDC с 7% NaCl.

Чашки культивировали 7 дней при температуре 28 °С, после чего оценивали рост по появлению колоний на месте посева, сравнивая с ростом референтного штамма. Колонии, выросшие на данной среде, пересевали на среду SSM. Бактерии на данной среде образовывали колонии желтоватого цвета, при этом меняя цвет самой среды с фиолетового на желтый.

Грамположительные изоляты, дающих характерный для *Curtobacterium* эффект на селективных средах, с помощью стерильной петли переносили на неселективную среду YDC для описания морфологических характеристик. Рассев проводили методом истощающего штриха, после помещали чашки в аналогичные условия на 72-96 часов. Пересев повторяли до получения микробиологически чистой колонии. Фиксировались культуральные свойства единичной колонии каждого изолята по стандартной методике: размер, форма, цвет, профиль, консистенция, структура.

Приготовление питательных сред

Для приготовления полуселективной среды MSCFF на 1 л среды использовалось 5 г пептона ферментативного, 5 г пептона мясного, 5 г сахарозы, 15 г агара. Отдельно от основных компонентов в дистиллированной растворялось 5 г обезжиренного сухого молока, которое доводилось до

кипения в микроволновке. После автоклавирования в среду добавлялся краситель конго красный 0,05г, хлороталонил* (Браво, КС, Сингента) – 0,01 г, тиофанат-метил (Топсин-М, КС, НИППОН СОДА КО., ЛТД.) – 0,01 г, налидиксовая кислота (Диаэм) – 0,01 г, нитрофурантоин (Sigma) – 0,01 г, охациллин натрия (Sigma) - 0,001 г, азид натрия – 0,001 г. Автоклавирование проводилось при 121 в течение 20 минут. Хранение неиспользованной среды допускается только в холодильнике при 4 не более 7 дней. Селективность среды проявляется в способности бактерий *C. flaccumfaciens* гидролизовать казеин, что влечет за собой обесцвечивание красителя конго ред [64].

Для подтверждения наличия целевой бактерии в чистой культуре использовалась агаризованная среда YDC с добавлением 7% раствора натрия хлористого. На 1 л среды использовалось 15 г агара, 10 г глюкозы, 5 г дрожжевого экстракта 20 г CaCO₃, 70 г NaCl [19].

Состав селективной среды SSM включает в себя: на 1 л рамноза 5,0 г, дрожжевой экстракт 2,0 г, KH₂PO₄ 0,5 г, K₂HPO₄ – 2,0 г, NH₄Cl – 1,0 г, LiCl - 10.0 г, MgSO₄·7H₂O* - 0,25 г, Tris-HCl 1,2 г, азид натрия* - 2,0 г, циклогексимид* (Sigma) – 0,1 г, полимиксин сульфат В* (Sigma) – 0,04 г, бромкрезолпурпурный (Диаэм)* (15% раствор в этаноле) 1 мл, агар 15 г; * - добавлялись после автоклавирования базальной среды [88].

Неселективная среда YDC использовалась в работе для проведения очистки культур. На 1л среды используется 20г глюкозы, дрожжевого экстракта – 10г, кальция углекислого в виде тонкой измельченной пудры – 20г, агар – 20г. Глюкоза растворяется в отдельном сосуде с дистиллированной водой и объединяется с раствором других компонентов только после автоклавирования.

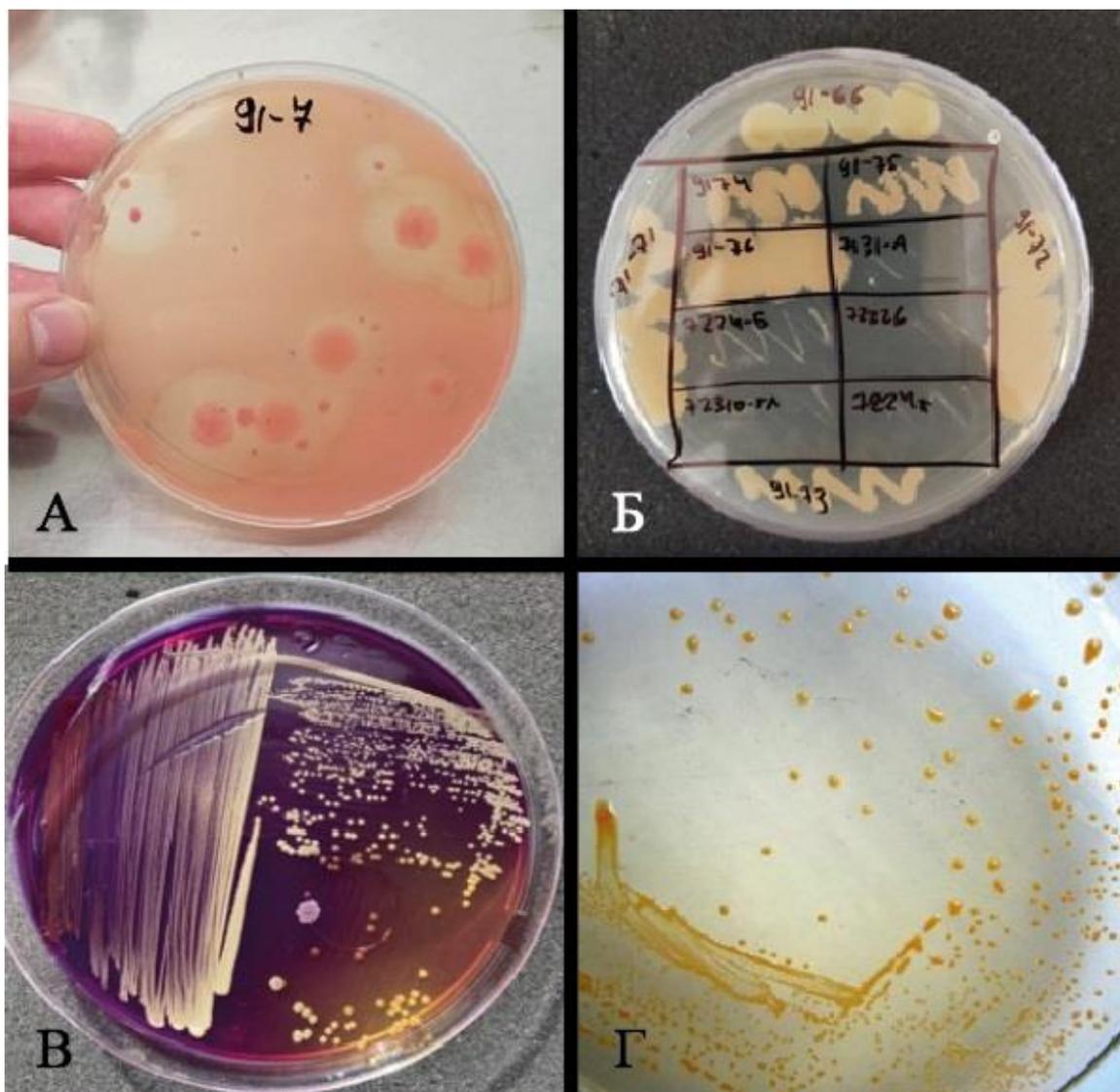


Рисунок 4. Рост референтного штамма CFBR 3418 и изолятов нв различных питательных средах. А – референтный штамм на среде MSCFF; Б – изоляты на среде YD с добавлением 7% NaCl; В – референтный штамм на среде SSMF; Г – референтный штамм на среде YDC.

Условия хранения коллекции изолятов

После наращивания достаточной биомассы единичной колонии на твердой агаризованной среде, стерильной петлей набиралось определенное количество бактериальной биомассы и помещалось в эппендорфы на 1.5 мл, в которые заранее была разлита смесь жидкой среды LB (триптон – 10г/л, дрожжевой экстракт – 5г/л, натрий хлористый – 10 г/л) и стерильного

глицерина. Ресуспендирование бактерий в смеси включало в себя следующую последовательность действий: после помещения биомассы в раствор суспензия отстаивала в течение часа, после чего содержимое пробирок перемешивалось стерильным носиком на 1000 мкл. После пробирки помещались на вортекс и замораживались при -80°C . Для проверки криостока биомассу после разморозки высевали на чашку Петри с любой подходящей агаризованной средой.

Выделение ДНК

Геномную ДНК экстрагировали методом на основе лизиса клеток буфером СТАВ. Образцы выращивали на чашках Петри и ресуспендировали в пробирке 200 мкл буфера для ресуспендирования (50 мМ Tris-Cl, рН 8,0, 10 мМ ЭДТА). Затем смешивали с 600 мкл буфера СТАВ, 10 мкл 2-меркаптоэтанол и 3 мкл протеиназы К, инкубировали при 65°C в течение 30 мин. После добавляли 500 мкл хлороформа и образцы подвергали центрифугированию при $13000\times g$ в течение 5 мин. Супернатанты переносили в другую пробирку, смешивали с 0,6 объема изопропанола и центрифугировали при $13000\times g$ в течение 5 мин. Жидкость сливали, а осадок дважды промывали 500 мкл этанола (70%). Открытые пробирки оставляли при 65°C до испарения остаточного этанола. полностью. После выпаривания добавляли 400 мкл деионизированной воды.

Постановка ПЦР для идентификации патогенов

Полученные из растительного материала изоляты бактерий проходили дальнейшей проверке на принадлежность к роду *Curtobacterium sp.* и виду *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* методом постановки классической ПЦР и ПЦР в реальном времени с использованием видоспецифичных праймеров (табл. 3). Классическая ПЦР проводилась с

использованием термоциклера BioRad T100 ThermalCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), ПЦР в реальном времени - LightCycler 96 (Roche, Basel, Switzerland).

В литературных источниках единственным способом молекулярной диагностики является набор праймеров (CffFOR2-CffREV4), разработанный для диагностики *Curtobacterium flaccumfaciens* еще в 2002 году [87]. Они вызывают амплификацию участка 3'-конца гена трипсиноподобной сериновой протеазы и некодирующей области, находящейся в острове патогенности, обнаруженном в геномах и плаزمиде *Curtobacterium*.

Таблица 3

Праймеры, использованные в работе для установления родовой и видовой принадлежности

Название	Сквенс праймера	Температура отжига	Амплифицируемый участок	Продукт п. н.	Ссылка
Видовые праймеры для <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>					
CffFOR 2	GTTATGA CTGAACT TCACTCC	62°C	Наличие острова патогенности	307	Tegli et al., 2002
CffREV 4	GATGTTC CCGGTGT TCAG	62°C			
Родовые праймеры для <i>Curtobacterium</i> sp.					
Curto-F	CGGATGT GTATCCC AAGTAG CAC	61.0°C	23s pPHK	259	Peter V. Evseev, 2022

Curto-D- R	ACGGGTT AACCTCG CCACA	61.5°C			
---------------	-----------------------------	--------	--	--	--

Поиск BLAST с использованием праймеров CffFOR2 и CffFOR4 показал отсутствие гомологичных праймерам последовательностей среди представителей других, кроме *C. flaccumfaciens*, таксонов, что говорит о их высокой селективности. Однако, идентичные последовательности не были также найдены в большинстве из 43 “филогенетических” *Curtobacterium flaccumfaciens*, то есть для этих штаммов результат ПЦР-диагностики был бы отрицательным, не смотря на их принадлежность к данному виду. Таким образом, данные праймеры позволяют определить наличие в штамме острова патогенности в штамме, однако не позволяют идентифицировать штаммы, в которых данный участок отсутствует. Таким образом, тест является информативным с точки зрения определения наличия острова патогенности штаммов, однако не самодостаточным при идентификации выделяемых штаммов, в силу узкой специфичности и не выявляет часть штаммов, относящихся к *Curtobacterium*.

Для упрощения процедуры отбора полевых изолятов *Curtobacterium* был предложен набор родоспецифичных праймеров, относящихся к участку 23S рРНК, для первичной оценки выделенных на полуселективной среде образцов [30].

При определении принадлежности изолятов к роду *Curtobacterium* методом классической ПЦР готовили следующую реакционную смесь. Одна реакция объемом объемом 11 мкл содержала 2 мкл готовой смеси для ПЦР 5 х ScreenMix (ЗАО «Евроген», Москва), по 0,5 мкл каждого праймера, 1 мкл целевой ДНК и стерильную воду (табл. 4).

**Состав реакционной смеси на для амплификации на род
*Curtobacterium***

Реагенты	Рабочая концентрация	Объем на реакцию, мкл
Вода деионизированная	-	7
ScreenMix	5x	2
Праймер Curto-F	10 нМ	0.5
Праймер Curto-D-R	10 нМ	0.5
Объем реакционной смеси без ДНК		10
ДНК		1
Общий объем смеси		11

Условия амплификации на приборе составили:

1. Денатурация 3 мин – 95°C;
2. 45 циклов:
 - Денатурация 0,3 мин – 94°C;
 - Отжиг 0,1 мин – 65°C;
 - Элонгация 0,2 мин – 72°C;
3. Элонгация 3 мин – 72°C.

При определении принадлежности изолятов бактерий к виду *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* методом классической ПЦР готовили реакционную смесь, объемом 25 мкл. Одна реакция содержит 5 мкл готовой смеси для ПЦР 5 x ScreenMix (ЗАО «Евроген», Москва), по 2 мкл каждого праймера, 13.5 мкл воды и 2.5 мкл целевой ДНК (табл. 5).

**Состав реакционной смеси для амплификации на вид
Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens методом классической
ПЦР**

Реагенты	Рабочая концентрация	Объем на реакцию, мкл
Вода деионизированная	-	13.5
ScreenMix	5x	5
Праймер CffFOR2	10 нМ	2
Праймер CffREV4	10 нМ	2
Объем реакционной смеси без ДНК		22.5
ДНК		2.5
Общий объем смеси		25

Условия амплификации на приборе составили:

1. Денатурация 3 мин – 95°C;
2. 28 циклов:
 - Денатурация 0,3 мин – 94°C;
 - Отжиг 0,2 мин – 52°C;
 - Элонгация 0,3 мин – 65°C;
3. Элонгация 4 мин – 65°C.

После амплификации 5 мкл ПЦР-продукта раскапывали в лунки 1,0% агарозного геля с бромистым этидием в 0.5 x TBE-буфере и разделяли с помощью электрофореза. В дальнейшем проводили визуализацию с использованием гель-документирующей системы.

При определении принадлежности изолятов бактерий к виду *C. flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* методом ПЦР в реальном времени готовили

реакционную смесь, объемом 10 мкл. Одна реакция содержит 2 мкл готовой смеси для ПЦР 5 x HsqPCRmix (ЗАО «Евроген», Москва), по 0,03 мкл каждого праймера, 4,94 мкл воды и 3 мкл целевой ДНК (табл. 6).

Таблица 6

**Состав реакционной смеси для амплификации на вид
Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens методом ПЦР в реальном
времени**

Реагенты	Рабочая концентрация	Объем на реакцию, мкл
Вода деионизированная	-	4,94
HsqPCRmix	5x	2
Праймер CffFOR2	100 нМ	0,03
Праймер CffREV4	100 нМ	0,03
Объем реакционной смеси без ДНК		7
ДНК		3
Общий объем смеси		10

Условия амплификации на приборе составили:

1. Денатурация 3 мин – 95°C;
2. 45 циклов:
 - Денатурация 10 с – 94°C;
 - Отжиг 60 с – 52°C;
 - Элонгация 1 с – 65°C;
3. Элонгация 10 мин – 65°C.

Выделение генов «домашнего хозяйства»

Выяснение популяционной генетики, а также таксономического и эволюционного родства между штаммами бактерий основано на анализе множественных ядерных генов и паттернов кластеризации штаммов. Эти подходы, называемые многолокусным анализом последовательностей (MLSA) и многолокусным типированием последовательностей (MLST), были успешно использованы для пересмотра таксономии очень близкородственных штаммов или более отдаленно родственных штаммов. MLSA основан на сравнении частичных последовательностей ДНК каждого гена или конкатенированных последовательностей между штаммами, обеспечивает основу для определения видов и позволяет идентифицировать виды с помощью электронной таксономии [50].

Для оценки генетического родства между членами всемирной коллекции *C. flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* и некоторыми изолятами коллекции, а также в целях дополнительного подтверждения видовой и родовой принадлежности были проанализированы участки 16S рРНК [63] и гены «домашнего хозяйства» *gyrB*, *atpD* (табл. 7) [50, 74].

Таблица 7

Праймеры, использованные для анализа изменчивости

Название	Сквенс праймера	Температура отжига	Аmplифицируемый участок	Продукт п. н.	Ссылка
Праймеры для участка рибосомальной РНК					
27f	AGAGTTT GATCMT GGCTC	62°C	16S рРНК	1300	Marchesi R. et al, 1998

1387r	CRTGTGT GGCGGG CA	62°C			
Праймеры для участка ДНК-гизары β субъединицы					
2F	ACCGTCG AGTTCGA CTACGA	50 °C	gyrB	1006	Richert et al. 2005
6R	AGSACG ATCTTGT GGTA	61.5°C			
Праймеры для участка АТФ-синтазы β цепь					
atpD2F	GACATC GAGTTCC CGCAC	55°C	atpD	1104	Jacques et al. 2012
atpD2R	CGATGAT CTCCTGG AGCTCCT TGT	55°C			

Для амплификации праймеров на участок 16S рРНК методом классической ПЦР готовили реакционную смесь, объемом 50 мкл. Одна реакция содержит 10 мкл готовой смеси для ПЦР 5 x ScreenMix (ЗАО «Евроген», Москва), по 1,5 мкл каждого праймера, 34 мкл воды и 3 мкл целевой ДНК (табл. 8).

**Состав реакционной смеси для амплификации на участок 16S
pРНК**

Реагенты	Рабочая концентрация	Объем на реакцию, мкл
Вода деионизированная	-	34
ScreenMix	5x	10
Праймер 27F	100 нМ	1,5
Праймер 1492R	100 нМ	1,5
Объем реакционной смеси без ДНК		54
ДНК		3
Общий объем смеси		50

Условия амплификации на приборе составили:

1. Денатурация 5 мин – 95°C;
2. 25 циклов:
 - Денатурация 15 с – 94°C;
 - Отжиг 20 с – 55°C;
 - Элонгация 60 с – 72°C;
3. Элонгация 10 мин – 72°C.

Для амплификации праймеров на участок ДНК-гиразы методом классической ПЦР готовили реакционную смесь, объемом 25 мкл. Одна реакция содержит 5 мкл готовой смеси для ПЦР 5 x ScreenMix (ЗАО «Евроген», Москва), по 0,125 мкл каждого праймера, 17,75 мкл воды и 2 мкл целевой ДНК (табл. 9).

Состав реакционной смеси для амплификации на участок *gyrB*

Реагенты	Рабочая концентрация	Объем на реакцию, мкл
Вода деионизированная	-	17,75
ScreenMix	5x	5
Праймер 2F	100 нМ	0,125
Праймер 6R	100 нМ	0,125
Объем реакционной смеси без ДНК		23
ДНК		2
Общий объем смеси		25

Условия амплификации на приборе составили:

1. Денатурация 3 мин – 95°C;
2. 30 циклов:
 - Денатурация 1 мин – 94°C;
 - Отжиг 1 мин – 50°C;
 - Элонгация 3 мин – 72°C;
3. Элонгация 5 мин – 72°C.

Для амплификации праймеров на участок АТФ-синтазы методом классической ПЦР готовили реакционную смесь, объемом 25 мкл. Одна реакция содержит 5 мкл готовой смеси для ПЦР 5 x ScreenMix (ЗАО «Евроген», Москва), по 0,125 мкл каждого праймера, 17,25 мкл воды и 2,5 мкл целевой ДНК (табл. 10).

Состав реакционной смеси для амплификации на участок atpD

Реагенты	Рабочая концентрация	Объем на реакцию, мкл
Вода деионизированная	-	17,25
ScreenMix	5x	5
Праймер atpD2F	100 нМ	0,125
Праймер atpD2R	100 нМ	0,125
Объем реакционной смеси без ДНК		22,5
ДНК		2,5
Общий объем смеси		25

Условия амплификации на приборе составили:

1. Денатурация 5 мин – 95°C;
2. 35 циклов:
 - Денатурация 30 с – 94°C;
 - Отжиг 30 с – 55°C;
 - Элонгация 60 с – 72°C;
3. Элонгация 10 мин – 72°C.

Подготовка проб, секвенирование и анализ последовательностей

Ампликоны очищали с помощью коммерческого набора Qiagen (QIAquick PCR Purification Kit). К реакционной смеси, содержащей ДНК, добавляют связывающий буфер и помещают на специальные колонки, содержащие кремниевую мембрану. Хаотропный агент связывающего буфера денатурирует белки и способствует связыванию ДНК с силикатной мембраной

в колонке. Далее ненужные элементы раствора удаляются путем обычного промывания специальным буфером. Очищенная ДНК затем элюируется из колонки буфером для элюции [113].

Анализ нуклеотидной последовательности проводила компания ЗАО «Евроген» методом секвенирования. В процессе выполнения секвенирования были использованы те же праймеры, которые использовались для ПЦР амплификации исследуемого участка. Каждую последовательность читали 2 раза – с прямого и обратного праймеров. Для построения филогенетических деревьев использовали алгоритм test Neighbor Joining tree в программе Mega 11.

Постановка BOX-PCR

В современных условиях разработка быстрых и точных методов диагностики возбудителей заболеваний растений является приоритетной задачей. Для биологической защиты растительного материала, агенты которой проявляют высокую специфичность к патогену, особенно важен анализ генетического разнообразия, при этом не прибегая к дорогостоящему и трудоемкому полногеномному секвенированию. Метод BOX-PCR фингерпринт был выбран как наиболее подходящий для идентификации патогенов на уровне штаммов.

Геномный фингерпринтинг BOX-PCR использует праймеры ДНК, которые комплементарны встречающимся в природе высококонсервативным повторяющимся последовательностям ДНК, присутствующим в множественных копиях в геномах большинства грамотрицательных и некоторых грамположительных бактерий. Несколько ампликонов разного размера можно фракционировать с помощью электрофореза, что позволяет установить образцы отпечатков ДНК, характерные для отдельных бактериальных штаммов. Некоторые из этих вкрапленных повторяющихся

элементов сохраняются у различных родов бактерий и, следовательно, позволяют использовать наборы отдельных праймеров для ДНК-фингерпринтинга многих различных микроорганизмов [94].

В анализе использовались изоляты, полученные в 2020-2021 годах и изоляты, предоставленные лабораторией молекулярной биоинженерии ИБХ РАН. Для анализа был использован универсальный праймер ВОХА1R (табл. 11) [85]. Реакционную смесь для амплификации готовили объемом 35 мкл (табл. 12). Одна реакция содержит 3,5 мкл 10x Turbo buffer (ЗАО «Евроген», Москва), 1,4 мкл dNTP, 2,1 мкл праймера, 0,3 мкл Taq ДНК-полимеразы, 26,7 мкл деионизированной воды.

Таблица 11

Характеристика праймера для ВОХ-PCR

Название	Сквенс праймера	Температура отжига	Амплифицируемый участок	Продукт п. н.	Ссылка
ВОХА1R	CTACGGC AAGGCG ACGCTAC G	53°C	ВОХ- последовательности	100– 3500	Smith et al., 2001

Таблица 12

Состав реакционной смеси для амплификации ВОХА1R

Реагенты	Рабочая концентрация	Объем на реакцию, мкл

Вода деионизированная	-	26,7
Turbo buffer	10x	3,5
Праймер ВОХА1R	10 нМ	2,1
dNTP	-	1,4
Тақ ДНК-полимераза	-	0,3
Объем реакционной смеси без ДНК		34
ДНК		1
Общий объем смеси		35

Условия амплификации на приборе составили:

1. Денатурация 10 мин – 95°C;
2. 35 циклов:
 - Денатурация 1 мин – 95°C;
 - Отжиг 1 мин – 52°C;
 - Элонгация 2 мин – 72°C;
3. Элонгация 10 мин – 72°C.

Продукты реакции ПЦР обрабатывали с помощью аппарата автоматического капиллярного электрофореза QIAxcel (QUIAGEN, Германия) в соответствии с протоколом производителя с использованием маркера QX Alignment (15bp/3kb) и маркер размера QX (100bp/2,5kb) [114].

Проверка патогенности штаммов

Полученные штаммы выращивали на среде YD (глюкоза–10 г/л, дрожжевой экстракт – 10 г/л, агар-агар – 18 г/л) при 26 градусах 72 часа. Колонии растворяли в воде и доводили до OD 600 ≈0,2 по 2 мл в

спектрофотометре NanoDrop OneC (Thermo Fisher, USA). Для анализа патогенности штаммов *Cff* использовали сорт сои (*Glycine max*) Касатка (Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ) и фасоль (*Phaseolus vulgaris*) сорта Пурпурная королева (ООО “Агрофирма АЭЛИТА”). Семена высевали в пластиковые горшки объемом 0,5 л, с торфяным субстратом с перлитом (ООО «Велторф», Великие Луки, Россия) и выращивали в теплице лаборатории защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева при средней температуре 25/20°C (день/ночь) и естественном освещении. Сою выращивали до фазы 3-ей пары настоящих листьев, фасоль до 2-ой пары настоящих листьев. Растения поливали ежедневно до достижения полной влагоемкости субстрата.

Растения фасоли заражали путем инъекции побегов в область подсемядольного колена 0,3-0,6 мл суспензии бактерии концентрацией 10^8 КОЕ/мл с помощью инъекционной шприца со стерильной иглой [53]. На каждый штамм приходилось по пять растений для избежания ошибок в интерпретации симптомов. В качестве отрицательного контроля растения инокулировались стерилизованной водой, положительный контроль – суспензия референтный штамм CFBR 3418. Для растений фасоли оценивали количество дней, прошедших от инокуляции до появления признаков увядания и количество дней, прошедших от момента инокуляции до полного увядания.

Растения сои заражали путем сдавливания пинцетом с намотанной на зубчики ватой, смоченной в суспензии бактерий [59]. Инокулировали по одному растению сои на штамм. Для избежания контаминации пинцет окунали в чистый спирт и воду при переходе от одного штамма к другому. Учеты после заражения проводили ежедневно начиная с 7 дня после инокуляции. На растениях сои собирали все листья со всех растений через 18 дней после инокуляции и сканировали через программу LeafDoctor (на базе

ОРРО А9) на черном фоне, настраивая трешхолд по полному покрытию хлоротичной и некротичной зон согласно рекомендациям разработчика [71].

Выделение бактериофагов, поражающих *Curtobacterium flaccumfaciens*

В качестве природного источника нахождения бактериофагов использовались образцы почвы и сточных вод, полученные с различных хозяйств Московской области. За лето 2021 года было поставлено 22 накопительных культуры. В качестве источников для выделения бактериофагов были использованы речные воды, сточные воды и образцы почвы, собранные летом 2021 года на территории РФ.

Сбор вирусодержащего материала образцов проводили с использованием стерильных инструментов (перчатки, контейнер, скальпель и т.д.). Почвенные образцы получили из выбранных источников с глубины 10-15 см от поверхности верхнего слоя почвы. Образцы воды забирали из водоема на глубине 10 см. Все образцы транспортировали и хранили в холодном и темном месте с защитой от прямых солнечных лучей.

Для поиска фагов было выбрано несколько изолятов бактерий, подтвержденных микробиологическими и патогенными тестами на принадлежность к *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens*.

В лабораторных условиях для получения вирусов бактерий из образцов почвы и воды пользовались следующей методикой: к 200 мкг почвенного образца, либо к 200 мкл исследуемой воды добавляли 700 мкл заранее приготовленного инокулята конкретного индикаторного штамма и 2 мл жидкой питательной среды. Для обеспечения инфицированности бактерий вирусами и репродукции новых дочерних вирусных частиц смесь культивировали в течение 24 ч при 37°C с аэрацией. Далее смесь центрифугировали в течение 30 мин при 3000 об/мин (Orto Alresa,

Испания). Супернатант отфильтровали через стерильные бумажные фильтры и помещали в микропробирку, прогревали в термостате при 65°C в течении 30 мин., а затем обрабатывали хлороформом (50 мкл на 1мл суспензии), осторожно встряхивая в течение 1 мин. Полученную суспензию, предположительно содержащую вирусы, хранили в холодильнике при 4°C.

Наличие фагов подтверждали методом агаровых слоев. Для этого использовали ТВА (триптон нижний агар) и ТТА (триптон верхний агар). Для приготовления 1л нижнего агара используется 1 г глюкозы, 8 г хлористого натрия 1 г хлористого кальция, 11 г агара. На 1 л верхнего агара используется 10 г триптона, 10 г хлористого натрия, 1 г глюкозы, 7 г агара.

После автоклавирования нижний агар разливали по чашкам Петри, оставляли на просушку в стерильных условиях. Верхний агар охлаждают и добавляют в него 5 мл бактериальной суспензии. После перемешивания разливают в те же чашки поверх нижнего агара.

Суспензию фаговых частиц объемом 100 мкл из единой колонии наносили поверх верхнего агара, после высыхания инкубировали не менее 12 часов в термостате. На следующий день фиксировали точки лизиса на верхнем агаре, что означало наличия интересующего бактериофага в суспензии.

Предварительно отмеченные на чашке зоны лизиса бактерий фагами вырезали стерильным шпателем и помещали в стерильную пробирку, добавляя 700 мкл инокулята штамма бактерий, лизис которого позволил выявить фаг, и 2-10 мл жидкой среды. Полученную смесь выращивали в течение 24 ч., центрифугировали 15 мин при 12000 об/мин (Orto Alresa, Испания). Для освобождения смеси от бактерий в стерильных условиях надосадочную жидкость пропускали через микрофильтр диаметром пор 0.45 мкм. Полученную суспензию фагов хранили при 4°C.

Метод Аппельмана позволяет определить литическую активность фага по отношению к чувствительной культуре бактерий, или титр фага. Суть

метода заключается в инкубации бактерий с десятикратными разведениями фагового раствора в жидкой среде и выявлении наибольшего разведения, при котором ещё наблюдается лизис культуры. Значение данного разведения является выражением титра фага (например, 10^{-8}).

Для проведения титрования делали последовательные десятикратные разведения фага в растопленной среде LB. На заранее подготовленный просушенный нижний агар капали каплю суспензии (примерно 100 мкл), и, аккуратно наклоняя чашку, давали стечь ей до противоположной стенки чашки. Инкубировали чашки в термостате при температуре 37°C около 16 часов. Учет результатов производился на следующий день. Максимальное разведение, при котором ещё наблюдается лизис, принимается за значение титра.

Обработка данных

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета анализа данных программы Microsoft Excel. Выравнивание нуклеотидных последовательностей с помощью программы Mega 11.

Результаты

Морфология изолятов

Всего было проанализировано более 100 изолятов, которые подходили по результатам морфологического анализа на полуселективных средах. Таксономическая принадлежность к роду *Curtobacterium* по итогам ПЦР-тестирования, а после секвенирования для части штаммов 16S рРНК подтвердилась для 28 изолятов (табл.13). Остальные штаммы оказались близкородственными представителями *Microbacterium*, *Chryseobacterium*, а также *Pseudomonas*.

Таблица 13

Географическое происхождение штаммов коллекции

№	Количество изолятов в коллекции	Географическое происхождение	Культура, сорт	Год уборки зараженных семян
1	6	Брянская область	Соя, сорт Навигатор	2019
2	4	Псковская область	Соя, сорт Касатка	2020
3	9	Саратовская область	Фасоль, сорт Рубин	2020
4	7	Саратовская область	Фасоль, смесь сортов	2019
5	2	Орловская область	Горох, сорт Софья	2019

Морфологически колонии явно проявляли отличия только в окраске. Остальные признаки варьировали незначительно и были близки к таковым у референтного штамма. На среде YDC колонии среднего размера правильной круглой формы, всегда окрашенные, прозрачные и полупрозрачные,

выпуклые, гладкие. Консистенция колоний могла меняться в зависимости от условий хранения и времени нахождения колоний на среде от мукоидной до более плотной или наоборот водянистой. Цвет культур на неселективной среде YDC варьировал от желтовато-белого до ярко-желтого и ярко-оранжевого. Наблюдались колонии, дающие красноватые оттенки (рис. 5).



Рисунок 5. Разнообразие внешнего вида колоний бактерий *Curtobacterium sp.* на неселективной среде YDC на 6-е сутки.

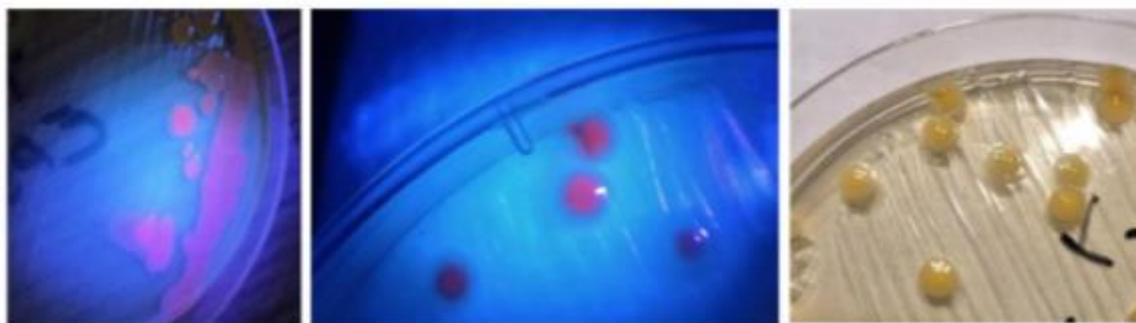


Рисунок 6. Красная флуоресценция колонии *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* в ближнем УФ освещении.

Таблица 14

Влияние токсина, выделяемого *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* на листья картофеля

Вид листьев картофеля через 6 ч. После размещения в чашке Петри с культурой бактерий	Балл поражения
	4
	3
	2
	1
	0

Для большинства штаммов было показано характерное красное свечение в ближнем УФ свете (рис.6). Кроме того, было замечено выделение летучего токсина, оказывающего некротическое действие на листья растений. При инкубации зеленого листа в чашке Петри с растущей культурой для многих штаммов наблюдалось быстрое увядание и почернение листа (табл. 14). Вероятно, бактерии выделяют токсин, который так же вызывает не только некроз листьев на примере картофеля, но и некроз зоны роста корешков у семян сои и фасоли.

Сводная таблица, содержащая перечень штаммов, микробиологические характеристики, результаты ПЦР-тестирования, анализа 16S рНК и прочая информация о штаммах коллекции представлена в Приложении 1.

Проверка патогенности на фасоли и сое

Для проверки патогенности изолятов на фасоли методом инокуляции бактериальной суспензии в стебель были отобраны штаммы, давшие положительный результат с видовыми праймерами на *Cff*. При каждодневном осмотре отмечались первые признаки проявления симптоматики заболевания, выраженности симптомов на 15й день после заражения. Отдельно отмечалось, привело ли заражение к полному увяданию растения (табл. 15).

Таблица 15

Проверка патогенности изолятов *Cff* на растениях фасоли методом инъекции в стебель

№ штамма	Шифр	Происхождение	Первые симптомы, сутки	Наличие симптомов на 15 сутки	Полное увядание, сутки

0	CFBP 3418	Фасоль	10	+	20
1	C2	Соя	13	+	27
2	C13	Соя	11	+	26
3	C18	Соя	19	-	-
4	C21	Соя	16	-	-
5	C22	Соя	10	+	34
6	P20	Фасоль	11	+	28
7	H79	Фасоль	15	+	29
8	H82	Фасоль	17	-	-
9	H83	Фасоль	19	-	-
10	H94	Фасоль	13	+	26
11	H96	Фасоль	15	+	28
12	G01	Горох	16	-	-
13	G04	Горох	9	+	25

В диагностическом протоколе ЕОКЗР РМ 7/102 прописано, что при проведении теста на патогенность методом инокуляции в стебель растения следует держать под наблюдением на предмет развития симптомов до 15 дней. Если по истечении этого периода симптомы отсутствуют, культура не может быть подтверждена как патогенная форма *Cff*, несмотря на наличие «остова патогенности» по результатам ПЦР.

Было выявлено, что штаммы отличались разной степенью патогенности по отношению к фасоли. Заражение штаммами С13, Р20 происходило за 10-11 дней, тогда как другими штаммами за больший промежуток времени (13 – 19). По этому параметру патогенными в коллекции можно признать 8 штаммов. Однако степень проявления симптомов и скорость их проявления могут зависеть от сорта растения. Для полноценного анализа необходимо проводить

исследование по агрессивности изолятов коллекции на нескольких разных видах и сортах растений.

Скрининг коллекции штаммов *Cff* по отношению к сое также показал, что симптомы могут вызывать лишь часть штаммов (табл. 16). Процент площади пораженной поверхности листьев фиксировали на 15й день инфильтрации с помощью программы LeafDoctor (рис. 7).

Таблица 16

Проверка патогенности изолятов *Cff* на растениях сои методом инфильтрации бактериальной суспензии пинцетом с ватой

№ штамма	Шифр	Происхождение	Процент пораженной части листьев на 15 сутки, среднее	Системность по стеблю (поражение сосудистой системы)
0	CFBP 3418	Фасоль	18,04±1,82	+
1	C2	Соя	7,32±0,67	-
2	C13	Соя	20,45±1,16	-
3	C18	Соя	17,92±0,45	-
4	C21	Соя	6,26±0,97	-
5	C22	Соя	10,79±2,11	-
6	P20	Фасоль	4,12±0,43	-
7	H79	Фасоль	14,15±0,85	-
8	H82	Фасоль	10,34±2,87	-
9	H83	Фасоль	4,23±1,23	-
10	H94	Фасоль	9,11±1,91	-

11	H96	Фасоль	7,54±1,0	-
12	G01	Горох	13,98±0,87	-
13	G04	Горох	21,10±2,9	-

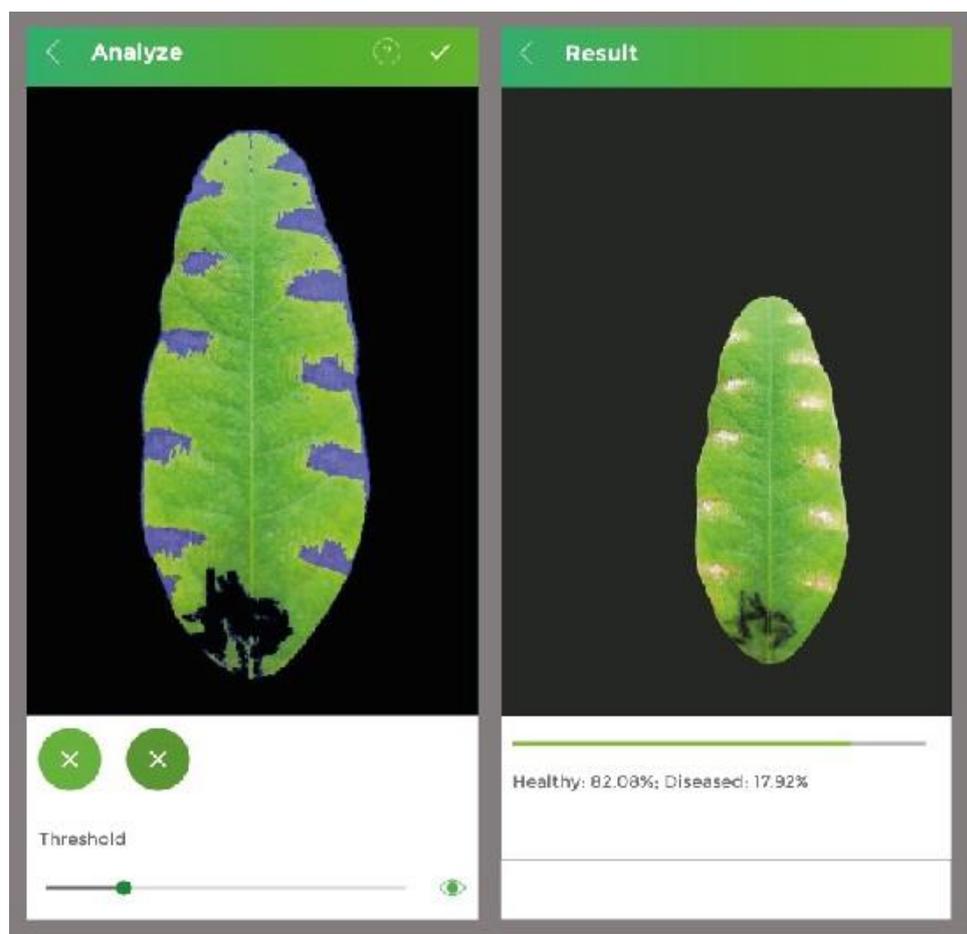


Рисунок 14. Пример анализа площади поражения листовой пластины штаммом *Cff* (C18) с помощью программы LeafDoctor

Все анализируемые штаммы, кроме референтного штамма, не давали системного заражения патогеном с закупоркой сосудистой системы растения, как наблюдалось на растениях фасоли (рис. 15). При этом штаммы С2, Р20 и Н96, которые давали устойчивые симптомы заражения на фасоли, не продемонстрировали на сое ярко-выраженных признаков заражения.

Референтный штамм дал устойчивые симптомы на 15 день, полное увядание наблюдалось на 28 сутки. Возможно, используемый сорт сои имеет в своем гено типе гены горизонтальной устойчивости, препятствующие нарушению транспортной функции стебля сои при заражении.



Рисунок 15. Системное заражение растения сои после инокуляции сои методом инфильтрации бактериальной суспензии пинцетом с ватой референтным штаммом CFBR 3418 на 18 день после заражения

Так как коллекция *Cff* создавалась с целью оценки защитного действия бактериофагов, для чего необходимо обеспечивать достаточно жесткий инфекционный фон, штаммы, патогенные на фасоли и сое ранжировали по параметру наиболее выраженного проявления симптомов на фасоли и наибольшей площади пораженной поверхности листьев при искусственной инокуляции на сое. В результате, были отобраны для дальнейшей научной

работы и рекомендованы для создания инфекционного фона следующие штаммы коллекции: С13, Н79, С22, G04.

Распределение участков ДНК при ВОХ-ПЦР

Методом фингерпринта ВОХ-ПЦР были отобраны штаммы разных представителей рода *Curtobacterium* из коллекции лаборатории молекулярной биоинженерии ИБХ РАН. Были проанализированы капиллярные электрофорезы следующих видов бактерий: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*), *C. flaccumfaciens* pv. *poisettiae* (*Cfp*), *C. citreum* (*Cc*), *C. flaccumfaciens* pv. *betae* (*Cfb*), *C. luteum* (*Cl*), *C. albidum* (*Ca*), *C. herbarum* (*Ch*). Также были добавлены изоляты, полученные в ходе выделения из сельскохозяйственных культур: Н91, С13, Р20 (рис.16).

Результаты показали, что два изолята С13 и Р20, относящиеся по результатам ПЦР к виду *Cff*, показали общую картину распределения полос электрофореза со штаммом того же вида из коллекции. Продукты ПЦР распределялись по четырем полосам примерно от 292 до п.н. до 1047 п.н. (табл. 17). Характер распределения амплифицированных фрагментов в геле имел одинаковый внешний вид для всех образцов.

Все три представителя вида *Curtobacterium flaccumfaciens* продемонстрировали наличие участка около 505 п.н. Наиболее близким штаммом к *Cff* по картине распределения участков ДНК на геле является *Cfpv. poisettiae*. Близки по своим размера участка ПЦР размерами около 505 п.н., 689 п.н., 1014 п.н. Дополнительно у *Cfp* наблюдается участок, меньший по своим размерам – 292 п.н., и участок размером 605 п.н.

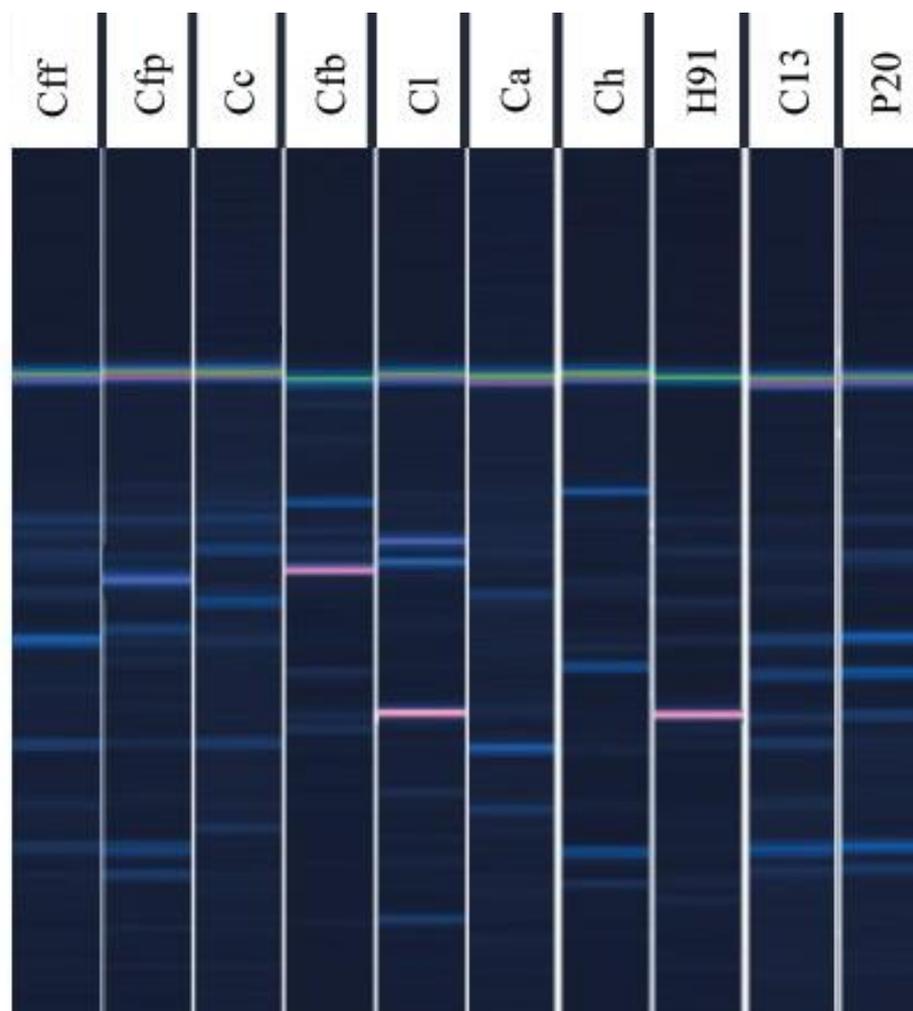


Рисунок 16. Результаты капиллярного электрофореза реакционной смеси BOX-PCR для штаммов рода *Curtobacterium*: *Cff* - *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, *Cfp* - *C. flaccumfaciens* pv. *poissetiae*, *Cc* - *C. citreum*, *Cfb* - *C. flaccumfaciens* pv. *betae*, *Cl* - *C. luteum*, *Ca* - *C. albidum*, *Ch* - *C. herbarum*. H91, C13, P20 – изоляты, полученные автором

Почти у всех представителей рода *Curtobacterium* общим является продукт амплификации размером от 665 п.н. до 738 п.н. Исключением является штамм *C. luteum* и изолят H91, идентифицированный методом классической ПЦР как штамм, относящийся к *Curtobacterium* sp. По характеру распределения участков ДНК изолят дает картину, близкую к *C. flaccumfaciens* pv. *betae*.

Размеры амплифицированных фрагментов ДНК *Curtobacterium* sp.

П.н., среднее	Штаммы представителей рода <i>Curtobacterium</i>									
	<i>Cff</i>	<i>Cfp</i>	<i>Cc</i>	<i>Cfb</i>	<i>Cl</i>	<i>Ca</i>	<i>Ch</i>	H91	C13	P20
	Размер участка, п.н.									
261							261			
300		292			308					
373	345				399		399		351	372
505	489	492		552				477	486	533
611		605				616				
689	696	683	665	711		668	738		672	678
1020	1013	1015					1047		1003	1023
1149			1173	1134		1130		1159		
1208					1208					
1860				1804				1915		

Близкое распределение консервативных участков у коллекционного штамма *Cff* и двух изолятов, подтвержденных как *Cff* с помощью видовых праймеров, дает основание полагать, что метод фингерпринта ВОХ-ПЦР может являться одним из методов идентификации данного вида.

Внутривидовое разнообразие по структуре последовательностей ДНК

16S рРНК

В ходе работы были изучены последовательности участков ДНК, используемые для выявления родовой принадлежности бактериальных организмов. Последовательности рибосомальной РНК были изучены у шести изолятов коллекции, которые были подтверждены как *Cff* с помощью видовых праймеров методом классической ПЦР. Данные о последовательности гена 16S рРНК сравнивали с данными, указанными в базе данных NCBI, с использованием BLAST (база данных за ноябрь 2021 г.) с параметрами по

умолчанию. Выравнивание последовательностей проводили по алгоритму MUSCLE (рис. 17).

Среди изолятов *Cff* наблюдалось большое количество различий. Наблюдались частые делеции пиримидиновых оснований. По результатам выравнивания было построено филогенетическое древо с использованием метода ближайшего соседа (рис. 18).

1. reference strain	C	G	A	T	G	A	T	G	C	C	C	A	G	C	G	T	T	G	C	T	G	G	G	T	G	G	A	T	T	A	G	T	G	G	C	G	A	A	C	G	G	G	-	T
2. P20 beans sарatovskaya obl	C	G	A	T	G	A	T	G	C	C	C	A	G	C	-	T	T	G	C	T	G	G	G	T	G	G	A	T	T	A	G	T	G	G	C	G	A	A	C	G	G	G	-	T
3. H79 beans sарatovskaya obl	C	G	A	T	G	A	T	G	C	C	C	A	G	C	-	T	T	G	C	T	G	G	G	T	G	G	A	T	T	A	G	T	G	G	C	G	A	A	C	G	G	G	-	T
4. G04 peas orlovskaya obl	C	G	A	T	G	A	T	G	C	C	C	A	G	C	-	T	T	G	C	T	G	G	G	T	G	G	A	T	T	A	G	T	G	G	C	G	A	A	C	G	G	G	C	T
5. G01 peas orlovskaya obl	C	G	A	T	G	A	T	G	C	C	C	A	G	C	-	T	T	G	C	T	G	G	G	T	G	G	A	T	T	A	G	T	G	G	C	G	A	A	C	G	G	G	-	T
6. C22 soybeans pskovskaya obl	C	G	A	T	G	A	T	G	C	C	C	A	G	C	-	T	T	G	C	T	G	G	G	T	G	G	A	T	T	A	G	T	G	G	C	G	A	A	C	G	G	G	-	T
7. C13 soybeans bryanskaya obl	C	G	A	T	G	A	T	G	C	C	C	A	G	C	-	T	T	G	C	T	G	G	G	T	G	G	A	T	T	A	G	T	G	G	C	G	A	A	-	G	G	G	-	T

Рисунок 17. Различия последовательностей нуклеотидов участка 16S рРНК у изолятов *Cff*

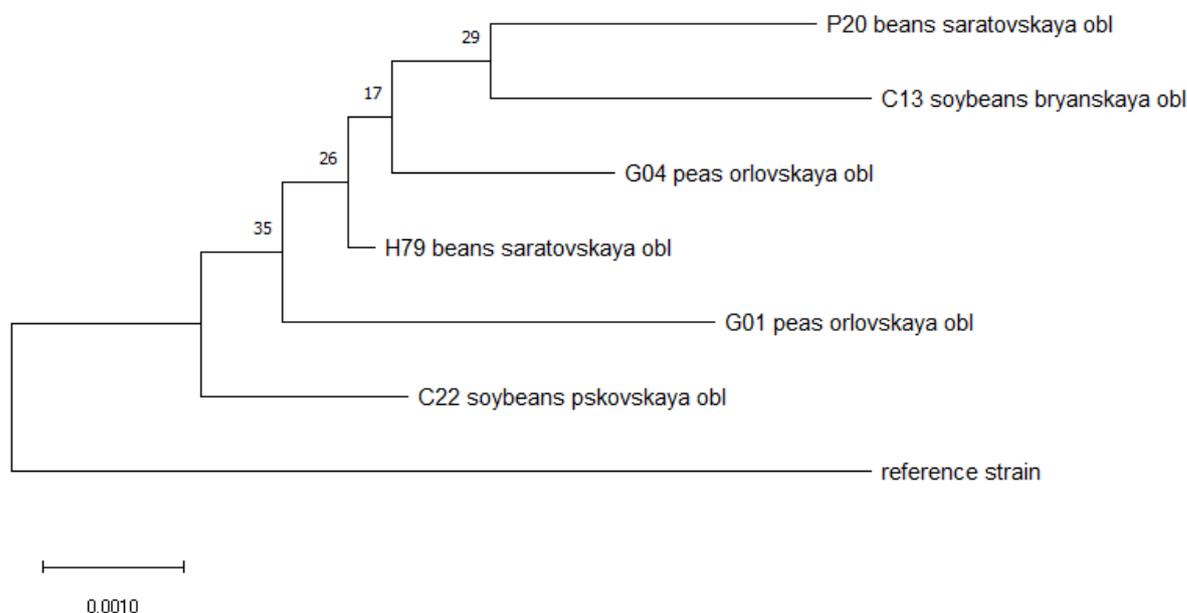


Рисунок 18. Кладограмма сходства между изучаемыми изолятами, построенная на основе последовательностей участка рибосомальной 16S рРНК с использованием метода ближайшего соседа (Neighbour-Joining)

MLST

Для двух изолятов коллекции, выделенных из гороха, был проведен анализ последовательностей участков ДНК гизары β субъединицы (*gyrB*) и АТФ-синтазы β цепи (*atpD*). Последовательности генов «домашнего хозяйства» сравнивались с последовательностями, опубликованными в базе NCBI. По последовательностям *atpD* видно, что изоляты практически идентичны между собой, а также близки к штаммам KX591699.1 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* strain LPPA 392 и KX591703.1 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* strain ICMP 2584 (рис. 19).

1. G01 peas orlovskaya obl	G	C	G	G	T	G	T	C	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
2. G04 peas orlovskaya obl	G	C	G	G	T	G	T	C	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
3. МК167636.1	G	C	G	G	T	G	T	G	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
4. МК167600.1	G	C	G	G	T	G	T	G	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
5. KX591664.1	G	C	G	G	T	G	T	G	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
6. KX591671.1	G	C	G	G	T	G	T	G	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
7. KX591673.1	G	C	G	G	T	G	T	G	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
8. KX591680.1	G	C	G	G	T	G	T	G	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
9. KX591683.1	G	C	G	G	T	G	T	G	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
10. KX591692.1	G	C	G	G	T	G	T	G	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
11. KX591696.1	G	C	G	G	T	G	T	G	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
12. KX591699.1	G	C	G	G	T	G	T	C	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
13. KX591701.1	G	T	G	G	T	G	T	G	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
14. KX591703.1	G	C	G	G	T	G	T	C	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
15. KX591704.1	G	C	G	G	T	G	T	G	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
16. KX591705.1	G	C	G	G	T	G	T	G	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G
17. KX591706.1	G	C	G	G	T	G	T	G	T	C	G	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	G	T	G

Рисунок 19. Различия последовательностей нуклеотидов участка *atpD* у штаммов из коллекции NCBI и изолятов G01, G04

При анализе кладограммы, полученной методом минимальной эволюции последовательностей *gyrB* и *atpD*, выяснилось, что изоляты G01 и G04 действительно близки к штаммам коллекции *Cff* (рис.20).

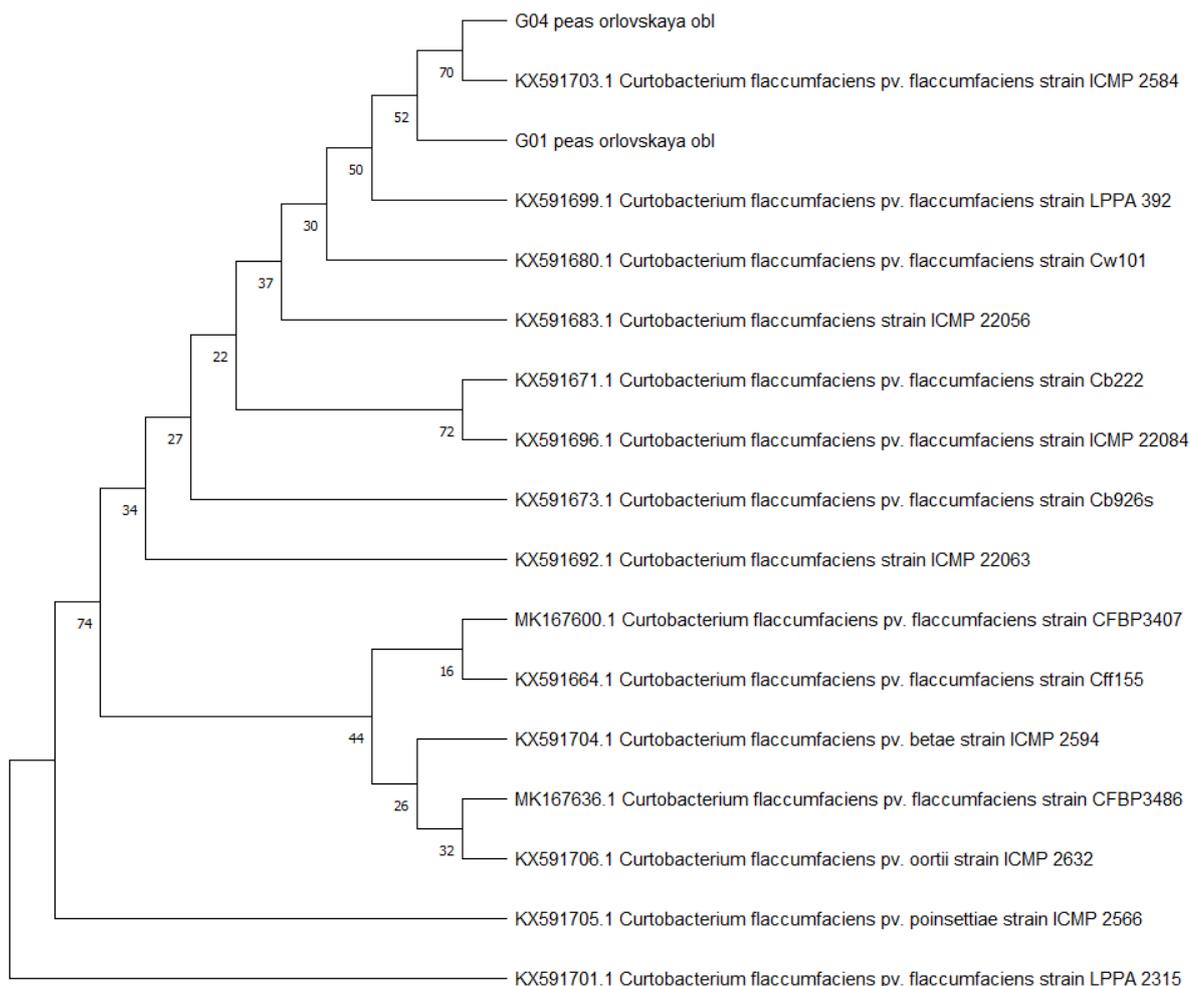


Рисунок 20. Кладограмма сходства между изучаемыми изолятами, построенная на основе последовательностей участка ДНК-гизары β субъединицы (*gyrB*) и АТФ-синтазы β цепи (*atpD*) с использованием метода минимальной эволюции (Minimum Evolution method)

Выделение бактериофагов *Curtobacterium*

За 2021 год было поставлено 5 накопительных культуры. В качестве источников для выделения бактериофагов были использованы речные воды, сточные воды и образцы почвы, собранные летом 2021 года на территории РФ (табл. 18). Несмотря на то, что ранее наиболее перспективными источниками для выделения считались сточные воды, в случае с бактериофагами *Curtobacterium*, наиболее оптимальным источником оказались пробы почвы в

то время, как ни из сточных, ни из речных вод фагов, проявлявших литическую активность, выделено не было.

Таблица 18

Список накопительных культур

№	Источник	Дата	Штаммы в накопительной культуре	Выделенные фаги
1	Очистные сооружения Домодедово	Сентябрь 2021	C13, H79, C22, G04, P20	-
2	Поле люцерны, Пензенская область, Городнинский район	Август 2021	C13, H79, C22, G04, G01	-
3	Органическое удобрение (навоз) на поле, Пензенская область	Август 2021	C13, H79, C22, G04	5-1
4	Поле подсолнечника, Саратовская область, Базарно-Карбулакский район	Ноябрь 2021	C13, H79, C22, G04, P20, G01	14-1

5	Сосновый лес, Пензенская область	Октябрь 2021	C13, H79, C22, G04, P20	16-2
---	----------------------------------------	-----------------	----------------------------	------

Капли полученных накопительных культур, очищенных от нелизированных клеток, образуют на двойном агаре прозрачные пятна, что позволяет предполагать у данных бактериофагов литический жизненный цикл (рис. 17).

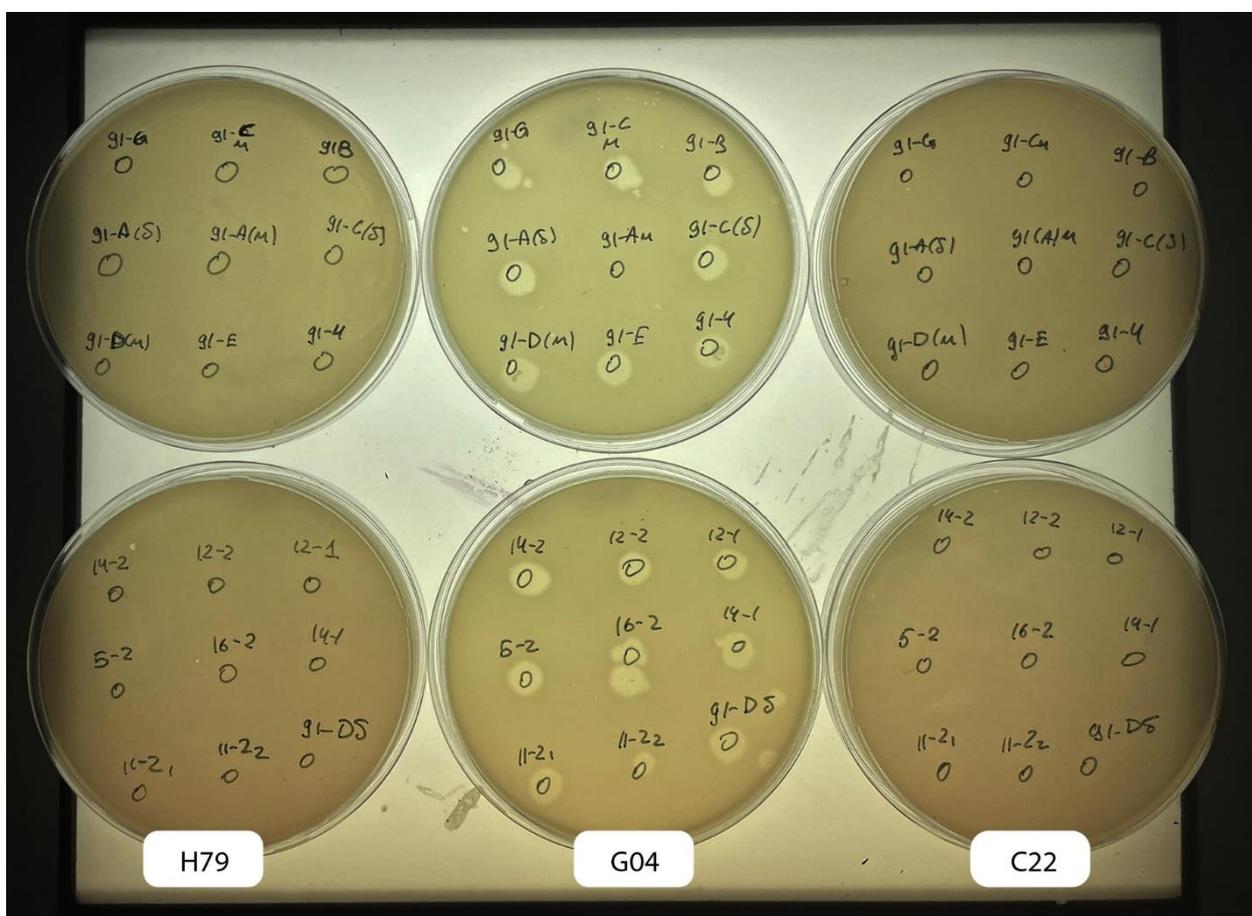


Рисунок 17. Тест бактериофагов на штаммах коллекции H79 (фасоль), G04 (горох), C22 (соя)

Полученные накопительные культуры были раститрованы до единичных колоний. В среднем для каждой накопительной культуры можно было выделить два морфотипа бляшек, не сильно различающихся по размеру:

с диаметром 1 мм и 2 мм соответственно, во всех случаях с четким краем. При титровании выделенных бактериофагов на чашках Петри с двойным агаром при стандартной плотности верхнего слоя 0,75% образуются мелкие, меньше 1 мм в диаметре, бляшки.



Рисунок 17. Бляшки бактериофагов 5-1 (А) и 14-1 (Б) на 0,5% верхнем агаре

Всего было выделено 3 бактериофага (табл. 19). В дальнейшем геномная ДНК бактериофагов будет отправлена на полногеномное секвенирование.

Таблица 19

Список выделенных бактериофагов *Curtobacterium*

№	Название фага	Хост	Источник	Морфология	Получаемых титр в среде YD
1	5-1	G04	Органическое удобрение (навоз) на	Мелкие бляшки	7×10^{10}

			поле, Пензенская область		
2	14-1	P20	Поле подсолнечника, Саратовская область, Базарно-Карбулакский район	Мелкие бляшки	7×10^{10}
3	16-2	P20	Сосновый лес, Пензенская область	Крупные бляшки	6×10^{10}

Выводы

1. Разработанная методика выделения изолятов рода *Curtobacterium* с помощью нескольких полуселективных сред с последующим анализом чистых культур методом ПЦР показала, что большая часть штаммов относилась к распространенным близкородственным эндофитным организмам родов *Microbacterium* и *Chryseobacterium*. Для избежания в дальнейшем получения нецелевых штаммов в методику были внесены изменения. При анализе партий семенного или растительного материала сначала будет проводиться тестирование родовыми праймерами, при наличии положительного отклика будет производиться выделение бактерий в чистые культуры по отработанной схеме для дальнейшего развития коллекции.
2. Колонии *Curtobacterium* spp и *Cff* отличались между собой по культурально-морфологическим признакам. Отличия между колониями заключались в окраске: штаммы, подтвержденные как *Cff* в целом имели более яркие оттенки, штаммы, относящиеся только к роду *Curtobacterium*, в основном были беловатых оттенков.
3. Тест на патогенность показал, что не все штаммы, давшие положительную реакцию с видоспецифичными праймерами, дают симптомы на растениях фасоли и сои. Для дальнейшего анализа вирулентности изолятов необходимо подобрать более восприимчивые сорта этих культур, а также провести тестирование на горохе, люпине, подсолнечнике и других культурах.
4. Метод идентификации патогена фингерпринт BOX-PCR показал воспроизводимые спектры амплифицированных последовательностей ДНК (фрагментов) для референтного штамма и изолятов коллекции. Однако необходимо проанализировать больше различных штаммов как *Cff*, так и других разновидностей *C. flaccumfaciens* для уверенного дальнейшего использования этого метода в области защиты растений.

5. Впервые изоляты *C. flaccumfaciens* были выделены с сои и гороха. Анализ таксономически-важных генов «домашнего хозяйства» подтвердил, что выделенные из гороха бактерии принадлежали именно *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

Заключение

Изучение патогенных микроорганизмов позволяет разрабатывать эффективные меры борьбы и искать новые пути защиты растений. С помощью филогенетического анализа можно пробовать предсказывать свойства новых обнаруженных видов относительно изученных, прогнозировать поражаемый спектр растений хозяев, подбирать методы борьбы на основе данных по генетическому разнообразию и характеру взаимодействия микроорганизма с растением-хозяином.

С нарастающими темпами импорта скорость распространения патогенов также возрастает. Понимание биологии и экологии возбудителя необходимо для прогнозирования ущерба для урожая, анализа и оценки фитосанитарных рисков, необходимости введения фитосанитарных мер, вплоть до карантинных или, наоборот, снятие или смягчение карантинного статуса.

При разработке интегрированной защиты растений отдельное место занимает биологический метод. Хотя в современной интегрированной защите растений главное место занимает химический метод, перспективы использования биологических методов будут неуклонно возрастать в связи с их биоценотической сущностью. Биологические агенты, входя в состав и структуру агроэкосистем, вовлекаются в биоценотический процесс, т. е. в процесс функционирования популяций организмов по обеспечению потока вещества, энергии и информации по трофическим блокам этих систем. Таким образом, принцип биоценотического равновесия лежит в основе биологического метода защиты растений как компонента интегрированной защиты.

В настоящее время в России отмечают усиление вредоносности известных и появление новых агрессивных штаммов фитопатогенных бактерий на сельскохозяйственных культурах, а проявление бактериозов часто носит характер эпифитотий. В рамках современной стратегии защиты от

болезней, в том числе бактериальных, исключительно важным является использование устойчивых сортов, агротехнических методов, малоопасных селективных пестицидов и применение биологических препаратов.

В данной работе были рассмотрены изоляты, распространенные на территории Российской Федерации. В Государственном каталоге пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территорию Российской Федерации, практически отсутствуют химические препараты бактерицидного действия. Вместе с тем распространенность бактериоза оказалась достаточно широкой и требует внедрения новых мер, в том числе таких как биологическая защита.

Благодарности

Хочу поблагодарить д.б.н., профессора Игнатова Александра Николаевича за научное руководство, консультацию на различных этапах проведения работы. Сотрудников ИБХ РАН, а именно руководителя лаборатории молекулярной биоинженерии д.х.н. Мирошникова Константина Николаевича и м.н.с. Лукьянову Анну Алексеевну за помощь в выполнении молекулярного анализа изолятов, содействия в проведении секвенирования и фингерпринта. Сотрудников РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева: зав. каф. защиты растений д.б.н. Джалилова Февзи Сеид-Умеровича за возможность проведения научно-исследовательской работы на базе тепличного стационарного комплекса, а также аспиранта Тараканова Рашита за помощь в освоении различных методов диагностики.

Список работ, опубликованных по теме магистерской диссертации

1. Пилик, Р. И., Игнатов, А. Н. Обнаружение фитопатогенных форм бактерий рода *Curtobacterium* на зернобобовых культурах // XIV Международная научно-практическая конференция молодых ученых «Инновационные процессы в сельском хозяйстве». Доклад с публикацией. – 2022. (В печати)

Список используемой литературы

1. Бактериозы основных зернобобовых культур и меры борьбы с ними: методические рекомендации / составитель А.М. Лазарев ; редактор В.А. Павлюшин. - Санкт-Петербург. : ВИЗР, 2006. – С. 41.
2. Каримова, Е. В., Игнатьева, И. М. Бактериозы - возбудители болезней зернобобовых культур и разработка методов их диагностики // Карантин Растений. Наука и Практика. – 2018. - № 12(14) – С. 28–33.
3. Каттер, Э., Сулаквелидзе, А. Бактериофаги: биология и практическое применение (Пер. с англ. коллектив переводчиков; науч. ред. А.В. Летаров) - М.: Научный мир. – 2012. – С. 111-139.
4. Никитина, К. В., Щелко, Л. Г. Бактериальные заболевания зернобобовых культур // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 1982. - № 71(3). – С. 86-88.
5. Носирова, М. Д., Косымов, Д. К. Влияние удобрений на симбиотические параметры и формирование корневой массы Азиатской фасоли (Маша) в пожнивных посевах // Kishovarz. – 2008. - № 4. - С. 10-11.
6. Сорокина, С. Ю. Обоснование экологически безопасных приемов возделывания фасоли обыкновенной с целью расширения посевных площадей культуры в России // Селекция и сорторазведение садовых культур. – 2021. - № 8. – С. 72-75.
7. Шабалдас, О. Г., Зайцев, Н. И., Пимонов, К. И. Продуктивность сортов сои различных групп спелости в условиях восточной зоны Краснодарского края // Земледелие. – 2019. - № 7. – С. 38-40.
8. Шабалдас, О. Г., Пимонов, К. И., Трубочева, Л. В. Урожайность сортов сои различных групп спелости при естественном плодородии почвы в условиях орошения // Земледелие. – 2020. - № 3. – С. 40-41.

9. Aizawa, T., V., N. B., Kimoto, K. I., Iwabuchi, N., Sumida, H., Hasegawa, I., Sasaki, S., Tamura, T., Kudo, T., Suzuki, K. I., Nakajima, M., Sunairi, M. *Curtobacterium ammoniigenes* sp. nov., an ammonia-producing bacterium isolated from plants inhabiting acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2007. - № 57(7). – P. 1447-1452.
10. Almajali, I.S., Al-Tarawneh, A., Qaralleh, H., Al-Limoun, M., Al-Sarayrah, M.M., Alqaraleh, M., Rayyan, W.A., Khleifat, K.M., Dmour, S.M. Biodegradation of Phenol by *Curtobacterium flaccumfaciens*: Optimization of Growth Conditions // Polish Journal of Environmental Studies. – 2021. - № 30(6). – P. 5435-5442.
11. Aravind, R. Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum l.*) genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsica* // Letters in Applied Microbiology. – 2009. - № 48. – P. 58-64.
12. Araújo, W. L., Marcon J., Maccheroni W., Elsas J. D. E., Azevedo J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella Fastidiosa* in citrus plants // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. - № 68. – P. 4906-4914.
13. Breider, S., Scheuner, C., Schumann, P., Fiebig, A., Petersen, J. Genome-scale data suggest reclassifications in the *Leisingera-Phaeobacter* cluster including proposals for *Sedimentitalea* gen. nov. and *Pseudophaeobacter* gen. // Frontiers in Microbiology. – 2014. - № 5. – P. 416-417.
14. Bruke, D. W. Bacterial wilt of pinto beans on soils of different types and cropping histories // The plant disease reporter. – 1957. - № 41. – P. 671-673.
15. Burke, D. W. Incidence of bacterial pathogens in dry beans in irrigated districts of Nebraska, Wyoming and Colorado in 1954 and 1955 // Plant Disease., - 1957. - №41. – P. 488-490.

16. Bruke, D. W., Seliskar, C. E. Disease incidence and yields of beans in relation to cultivation injury in northeastern Colorado. // The plant disease reporter. – 1957. - № 41. – P. 483-487.
17. Calzolari, A., Tomesani, M., Mazzucchi, U. Comparison of immunofluorescence staining and indirect isolation for the detection of *Corynebacterium flaccumfaciens* in bean seeds // Bulletin OEPP. – 1987. - № 17(2). – P. 157-163.
18. Carlson, R. R., Vidaver, A. K. Taxonomy of *Corynebacterium* plant pathogens, including a new pathogen of wheat, based on polyacrylamide gel electrophoresis of cellular proteins // International journal of systematic bacteriology. – 1982. - № 32(3). – P. 315-326
19. Camara, R.C., Vigo, S.C., Maringoni, A.C. Plant-to-seed transmission of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in a dry bean cultivar // Journal of Plant Pathology. – 2009. - № 91(3). – P. 549-554.
20. Collins, M. D., Jones, D. Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii*, and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium* as *Curtobacterium flaccumfaciens* // Journal of General Microbiology. – 1983. - № 129. – P. 3545-3548.
21. Conde, B.D. and Diatloff, A. (1991) Diseases in mungbean // In Mungbean: The Australian Experience. Proceedings of the first Australian mungbean workshop (Eds B.C. Imrie and R.J. Lawn). – 1991. – P. 73-77.
22. Correa, B. O., Schafer, J. T., Moura, A. B. Spectrum of biocontrol bacteria to control leaf, root and vascular diseases of dry bean // Biological Control. – 2014. - № 72. – P. 71–75.
23. Corrigendum – PM 7/100 Rep-PCR tests for identification of bacteria// EPPO Bulletin. – 2010. - № 40(1). – P. 365-368.
24. Corrigendum – PM 7/102 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* // EPPO Bulletin. – 2021. - № 51(1).

25. Davis, M. J. *Coryneform Phytobacteria* // O. C. Maloy T. D. Murray Eds., Encyclopedia of plant pathology. - № 1. – John Wiley and sons. - P. 255-256.
26. Diatloff, A., Wong, W. C., Wood, B. A. Non-destructive methods of detecting *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in mungbean seeds // Letters in Applied Microbiology. – 1993. - № 16(5). – P. 269-273.
27. Dunleavy, J. M., Keck, J. W., Gobelman, K. S., Reddy, S., Thompson, M. M. Prevalence of *Corynebacterium flaccumfaciens* as incitant of bacterial tan spot of soybean in Iowa // Plant Disease. – 1983. - № 67. – P. 1277-1279.
28. Enya, J., Shinohara, H., Yoshida, S., Tsukiboshi, T., Negishi, H., Suyama, K., Tsushima, S. Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents // Microbial Ecology. – 2007. - № 53. – P. 524-536.
29. Estefani, R. C. C., Miranda Filho, R. J., Uesugi, C. H. Thermal and chemical treatments of common bean seeds: efficiency in *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* eradication and effects on the physiological quality of seeds (Tratamentos Térmico e Químico de Sementes de Feijoeiro: Eficiência na Erradicação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e Efeitos na Qualidade Fisiológica das Sementes) // Fitopatologia Brasileira. – 2007. - № 32(5). – P. 434-438.
30. Evseev, P., Lukianova, A., Tarakanov, R., Tokmakova, A., Shneider M., Ignatov, A., Miroshnikov, K. (2022). *Curtobacterium* spp. and *Curtobacterium flaccumfaciens*: Phylogeny, Taxonomy, Pathogenicity, Diagnostics // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. - № 44(2). – P. 889-927.
31. Evtushenko, L. I., Takeuchi, M. The family *Microbacteriaceae* // The Prokaryotes. – 2006. - № 3. – P. 1020-1098.
32. Goncalves, R. M., Schipanski, C. A., Koguishii, L., Soman, J. M., Sakate, R. K., Silva Junior T. A.F., Maringoni, A. C. Alternative hosts of *Curtobacterium*

Flaccumfaciens pv. flaccumfaciens, casual agent of bean bacterial wilt // European Journal of Plant Pathology. – 2017. - № 148(2). – P. 357-365.

33. Guimaraes, P. M., Palmano, S., Smith, J. J., Sa, M. F. G., Saddler, G. S. Development of a PCR test for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens pv. Flaccumfaciens* // Antonie van Leeuwenhoek. – 2001. - № 80(1). – P. 1-10.

34. Harveson, R. M. Improving yields and managing dry bean bacterial diseases in Nebraska with new copper-alternative chemicals // Plant Health Progress. – 2019. - № 20(1). – P. 14-19.

35. Harveson, R. M. The multicolored bacterium // American Phytopathological Society. – 2013. - № 11.

36. Harveson, R. M., Vidaver, A. K. A New Color Variant of the Dry Bean Bacterial Wilt Pathogen (*Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens*) Found in Western Nebraska // Plant Health Progress. – 2008. - № 9(1). – P. 12-34.

37. Harveson, R. M., Schwartz, H. F. Bacterial diseases of dry edible beans in the central high plains // Plant Health Progress.. – 2018. - № 8(1). – P. 1-12.

38. Harveson, R. M., Schwartz, H. F., Urrea, C. A., Yonts, C. D. Bacterial wilt of dry-edible beans in the central high plains of the U.S.: Past, present, and future // Plant Disease. – 2015. - № 99(12). - 1665–1677.

39. Harveson, R. M., Schwartz, H. F., Vidaver, A. K., Lambrecht, P. A., Otto, K. L. New Outbreaks of Bacterial Wilt of Dry Bean in Nebraska Observed from Field Infections // Plant Disease. – 2006. - № 90(5). – P. 681.

40. Harveson, R. M., Urrea, C. A., Schwartz, H. F., Harveson, R. M., Urrea, C. A. (2011). Bacterial wilt of dry beans in western Nebraska // NebGuide. – 2011. - № 112.

41. Hedges, F. A bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* // Science. – 1922. - № 55(1425). – P. 430–431.

42. Hedges, F. Bacterial wilt on beans (*Bacterium flaccumfaciens*) including comparison with *Bacterium Phaseoli* // *Phytopathology*. – 1922. - № 16(22). – P. 1-22.
43. Holtappels, D., Fortuna, K. The future of phage biocontrol in integrated plant protection for sustainable crop production // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2021. - № 68. – P. 60-71.
44. Hsieh, T. F., Huang, H. C., Erickson, R. S., Yanke, L. J., Mündel, H.-H. First Report of Bacterial Wilt of Common Bean Caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* in Western Canada // *Plant Disease*. – 2002. - № 86(11). – P. 1275.
45. Hsieh, T. F., Huang H. C., Mundel H. H., Conner, R. L., Balasubramanian, P. M. Resistance of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) to Bacterial Wilt Caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* // *Journal of Phytopathology*. – 2005. - № 153(4). – P. 245-249.
46. Huang, H. C., Erickson, R. S., Yanke, L. J., Chelle, C. D., Mundel, H. H. First report of the purple variant of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, causal agent of bacterial wilt of bean in Canada // *Plant disease*. – 2006. - № 90(9).
47. Huang, H. C., Erickson, R. S., Balasubramanian, P. M., Hsieh, T. F., Conner, R. L. Resurfence of bacterial wilt in common bean in North America // *Canadian Journal of Plant Pathology*. – 2009. - № 31(3). – P. 290-300.
48. Huang, H. C., Erickson, R. S., & Hsieh, T. F. Control of bacterial wilt of bean (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) by seed treatment with *Rhizobium leguminosarum* // *Crop Protection*. – 2007. - № 26(7). – P. 1055-1061.
49. Ishimaru, C., Mohan, S. K., Franc, G. D. Bacterial wilt // Schwartz H. F., *Compendium of bean diseases*. – 2005. - 2nd ed. - American phytopathological society. – P. 50–52.
50. Jacques, M. A., Durand, K., Orgeur, G., Balidas, S., Fricot, C., Bonneau, S., Quillévéré, A., Audusseau, C., Olivier, V., Grimault, V., & Mathis, R. Phylogenetic

analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis subsp. Michiganensis* // Applied and Environmental Microbiology. – 2012. - № 78(23). – P. 8388-8402.

51. Jensen, H. L. Studies on saprophytic mycobacteria and *Corynebacteria* // Proceedings of the Linnean Society of New South Wales. – 1934. - № 59. – P. 19-61.

52. Jensen, H. L. The *Coryneform* bacteria // Annual Review of Microbiology. – 1952. - № 6. – P.77-90.

53. Júnior, T. A. F. S., Negrão, D. R., Itako, A. T., Maringoni, A. C. Pathogenicity of *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* to several plant species // Journal of Plant Pathology. – 2012. - № 94(2). – P. 427-430.

54. Kim, B. K., Kim, O. S., Moon, E. Y., Chun, J. Proposal to transfer *Flavobacterium oceanosedimentum* Carty and Litchfield 1978 to the genus *Curtobacterium* as *Curtobacterium oceanosedimentum* // FEMS Microbiology Letters. – 2009. - № 296(1). – P. 137-141.

55. Klenk, H.-P., Goker, M. En Route to a Genome-Based Classification of Archaea and Bacteria? // Systematic and Applied Microbiology. – 2010. - № 33. – P. 175-182.

56. Klement, Z. Two new bacteriophages for bacterial pathogens of the bean // Nature. – 1957. - № 180. – P. 41-42.

57. Komagata, K., Suzuki, K. I. Genus *Curtobacterium* // Bergeys manual of systematic bacteriology. – 1986. - № 2. – P. 1313-1317

58. Leben, C. How plant-pathogenic bacteria survive // Plant disease. – 1981. - № 65. – P. 633-637.

59. Lee, J. H., Kim, J.-C., Jang, K. S. Development of efficient screening method for resistance of cabbage cultivars to black rot disease caused by *Xanthomonas*

campestris pv. *Campestris* // Research in Plant Disease. – 2013. - № 19(2). – P. 95-101.

60. Lenne, J. M., Chavarro, A., Lopez, C. Effect of *Corynebacterium flaccumfaciens* on yield of *Zornia glabra* and *Phaseolus vulgaris* in Colombia // Phytopathology. – 1985. - № 75. – P. 1288.

61. Lehmann, K. B., Neumann, R. O. Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der speziellen bakteriologischen Diagnostik / Lehmann, Ed. – 1896. - 1st ed. – P. 534-536.

62. Magnani, G. S., Didonet, C. M., Cruz, L. M., Picheth, C. F., Pedrosa, F. O., Souza, E. M. Diversity of Endophytic Bacteria in Brazilian Sugarcane // Genetics and Molecular Research. – 2010. - № 9. – P. 250-258.

63. Marchesi, J. R., Sato, T., Weightman, A. J., Martin, T. A., Fry, J. C. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA // American Society for Microbiology Applied and Environmental Microbiology. – 1998. - № 64(2). – P. 795-799.

64. Maringoni, A.C., Camara, R. C., Souza, V. L. Semi-selective culture medium for *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* isolation from bean seeds // International Seed Testing Association. – 2006. - № 34(1). – P. 117-124.

65. Martins, S. J., de Medeiros, F. H. V., de Souza, R. M., de Resende, M. L. V., Ribeiro, P. M. Biological control of bacterial wilt of common bean by plant growth-promoting rhizobacteria // Biological Control. – 2013. - № 66(1). – P. 65-71.

66. Martins, S. J., Medeiros, F. H. V., Souza, R. M., Viela, L. A. F. Is *Curtobacterium* wilt biocontrol temperature dependent? [O biocontrole da murchar-de-*Curtobacterium* é dependente da temperatura?] // Acta Scientiarum – Agronomy. – 2014. - № 36(4). – P. 409-415.

67. McDonald, J. G., Wong, E. (2000). High diversity in *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* characterized by serology and rep-PCR genomic

fingerprinting // Canadian Journal of Plant Pathology. – 2000. - № 22(1). – P. 17-22.

68. Pereira, S. I. A., Castro, P. M. L. Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils // Environmental Science and Pollution Research. – 2014. - № 21. – P. 14110-14123.

69. Pereira, G. V., Magalhaes, K. T., Lorenzetti, E. R., Souza, T. P., Schwan, R. F. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion // Microbial Ecology. – 2012. - № 63. – P. 405-417.

70. Procópio, R. E. L., Araujo, W. L., Maccheroni, W., Azevero, J. L. Characterization of an endophytic bacterial community associated with *Eucalyptus* spp // Genetics and Molecular Research. – 2009. - № 8. – P. 1408-1422.

71. Pethybridge, S. J., Nelson, S. C. Leaf doctor: A new portable application for quantifying plant disease severity // Plant Disease. – 2015. - № 99(10). – P. 1310-1316.

72. Osdaghi, E., Taghavi, S. M., Hamzehzarghani, H., Fazliarab, A., Harveson, R. M., Tegli, S, Lamichhane, J. R. Epiphytic *Curtobacterium flaccumfaciens* strains isolated from symptomless solanaceous vegetables are pathogenic on leguminous but not on solanaceous plants // Plant Pathology. – 2018. - № 67(2). – P. 388-398.

73. Osdaghi, E., Taghavi, S. M., Hamzehzarghani, H., Fazilab, A., Harveson, R. M., Lamichhane, J. R. Occurrence and characterization of a new red-pigmented variant of *Curtobacterium flaccumfaciens*, the causal agent of bacterial wilt of edible dry beans in Iran // European Journal of Plant Pathology. – 2016. - № 146(1). – P. 129-145.

74. Richert, K., Brambilla, E., Stackebrandt, E. Development of PCR primers specific for the amplification and direct sequencing of *gyrB* genes from

Microbacteria, order *Actinomycetales* // Journal of Microbiological Methods. – 2005. - № 60(1). – P. 115-123.

75. Saettler, A. W. Diseases caused by bacteria // Ed. by Hall R., Compendium of bean Diseases. – 1991. – P. 29-32.

76. Seaton, S., Lemaire, J., Inderbitzin, P., Knight-Connoni, V., White, J. F., Trujillo, M. E. *Curtobacterium glycinis* sp. nov. from *Glycine max*, *Curtobacterium gossypii* sp. nov. from *Gossypium hirsutum* and *Curtobacterium oryzae* sp. nov. from *Oryza sativa*, three new *Curtobacterium* species and endophytes from agricultural crops // Biorxiv. – 2021. – preprint

77. Schuster, M. L. Survival of bacterial pathogens of beans // Bean Improvement Cooperative. – 1970. - № 13. – P. 68-70.

78. Schuster, M. L., Coyne, D. P. Survival factors of plant pathogenic bacteria // Research Bulluten – 1975. – P. 268

79. Schuster, M. L., Coyne, D. P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria // Annual Review of Phytopathology. – 1974. - № 12. – P. 199-221.

80. Schuster, M. L., Cristansen, D. W. An orange-coloured strain of *Corynebacterium flaccumfaciens* causing Bean wilt // Phytopathology. – 1957. - № 47(1). – P. 51-53.

81. Schaad, N., Jones, J. B., Chun, W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria // American Phytopathological Society. – 2001. - № 3. – P. 373-375.

82. Schuster, M. L., Sayre, R. M. A *Coryneform Bacterium* induces purple-colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and other *Leguminosae* // Phytopathology. – 1967. - № 57(10). – P. 1064-1066.

83. Schuster, M. L. Relation of root-knot nematodes and irrigation water to the incidence and dissemination of bacterial wilt of bean // Plant Disease Report. – 1959. - № 43. – P. 25-32.

84. Schwartz, H. F., Franc, G. D., Hanson, L. E., Harveson, R. M. Disease management // Dry bean production and pest management. – 2005. – P. 109-143.
85. Smith, N.C., Hennesy, J., Stead, D.E. Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-A1 primer for rapid identification of plant pathogen *Clavibacter michiganensis ssp. Sepedonicus* // European Journal of Plant Pathology. – 2001. - № 107. – P. 739-748.
86. Souza, V. L., Maringoni, A. C. Análise ultraestrutural da interação de *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* em genótipos de feijoeiro // Summa Phytopathologica. – 2008. - № 34(4). – P. 318-320.
87. Tegli, S., Sereni, A., Surico, G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* in bean seeds // Letters in Applied Microbiology. – 2002. - № 35(4). – P. 331-337.
88. Tegli, S, Surico, G, Esposito, A. Studi sulla diagnosi di *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens* nei semi di fagiolo // Notiziario Sulla Protezione Delle Piante. – 1998. - № 9. – P. 63-71.
89. Tripepi, R. R., George, M. W. Identification of bacteria infecting seedlings of mung bean used in rooting bioassays // Journal of the American Society. – 1991. - № 116(1). – P. 80-84.
90. Ulrich, K., Ulrich, A., Ewald D. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions // FEMS Microbiology Ecology. – 2008. - № 63. – P. 169-180.
91. Vega, F. E. Endophytic Bacteria in *Coffea Arabica L.* // Journal of Basic Microbiology. – 2005. - № 45. – P. 371-380.
92. Vidaver, A. K. The plant pathogenic *Corynebacteria* // Annual Review of Microbiology. – 1982. - № 36. – P. 495-517.

93. Vidaver, A. K., Starr, M. P. (1981). Phytopathogenic *Coryneform* and related bacteria // The prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria. - Springer-Verlag. – 1981. – P. 1879-1887.
94. Watts, J.L, Lowery, D.E., Teel, J.F., Ditto, C, Horng, J.S., Rossbach, S. Phylogenetic studies on *Corynebacterium bovis* isolated from bovine mammary glands // Journal of Dairy Science. – 2001. - № 84. – P. 2419-2423.
95. West, E. R., Cother, E. J., Steel, C. C., Ash, G. J. The Characterization and Diversity of Bacterial Endophytes of Grapevine // The Canadian Journal of Microbiology. – 2010. - № 56. – P. 209-216.
96. Yamada, K., Komagata, K. Taxonomic studies on Coryneform bacteria IV. morphological, cultural, biochemical, and physiological characteristics // The Journal of General and Applied Microbiology – 1972. - № 18 (2). – P. 399-416.
97. Yamada, K., Komagata, K. (1972). Taxonomic studies on Coryneform bacteria V. classification of Coryneform bacteria // The Journal of General and Applied Microbiology. – 1972. - № 18 (2). – P. 417-431
98. Zaumeyer, W. J., Thomas, H. R. A monographic study of bean diseases and methods for their control. USDA Technical Bull . – 1957.
99. Zaumeyer, W. J., Thomas, H. R. Bean diseases in some of the mountain states in 1947 // Plant Disease. – 1947. - №31. – P. 432-442.
100. Zaumeyer, W., Thomas, H. A. Monographic Study of Bean Diseases and Methods for Their Control // Technical Bulletins. – 1957. – P. 23-45.
101. Zaychikov, V. A., Potekhina, N. V., Dmitrenok, A. S., Fan, D., Tul'skaya, E.M., Dorofeeva, L.V., Evtushenko, L.I. Cell Wall Rhamnan in Actinobacteria of the Genus *Curtobacterium* // Microbiology. – 2021. - № 90(3). – P. 343-348.
102. Zinniel, D. K., Lambrecht, P. ;, Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A. ;, Barletta, R. G., Vidaver, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie

plants. // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. - № 68. – P. 2198-2208.

103. NCBI taxonomy database [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&iid=2035> (дата обращения 26.04.2021)

104. Florence Hedges [Электронный ресурс}. URL: https://siarchives.si.edu/collections/siris_arc_297432?back=/collections/search%3Fquery%3D%2522Science%2BService%2522%26page%3D133%26perpage%3D10%26sort%3Drelevancy%26view%3Dlist (дата обращения 18.11.2021)

105. *Curtobacterium* [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/2034> (дата обращения 23.08.2021)

106. *Curtobacterium flaccumfaciens Pathovars* [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/2035> (дата обращения 23.08.2021)

107. Бюллетени о состоянии сельского хозяйства. Росстат: Москва Валовые сборы и урожайность сельскохозяйственных культур по РФ в 2019 г. [Электронный ресурс]. URL: <https://rosstat.gov.ru/compendium/document/13277> (дата обращения 10.04.2021)

108. МНИАП. Мировой рынок бобовых культур [Электронный ресурс]. URL: <https://xn--80aplem.xn--p1ai/analytics/mirovoj-rynok-bobovyh-kultur/> (дата обращения 12.05.2021)

109. Распоряжение Правительства РФ от 10.08.2019 №1796р «Долгосрочная стратегия развития зернового комплекса Российской Федерации до 2025 года и на перспективу до 2035 года» [Электронный ресурс]/ Консорциум-кодекс – 1999-2021. URL: <https://docs.cntd.ru/document/560974985> (дата обращения 26.04.2021)

110. Прогноз развития рынка сои в сезоне 2020/21: Россия и мир. [Электронный ресурс]. URL: <https://specagro.ru/news/202006/rynok-soi-rossiya-i-mir> (дата обращения 12.05.2021)
111. Саенко, Г. М., Бушнева, Н. А. Защита сои от болезней и почвообитающих вредителей. [Электронный ресурс]. URL: http://www.vniitti.ru/conf/conf2016/article/SaenkoG.M._BushnevaN.A._statya.pdf (дата обращения 13.05.2021)
112. РФ в августе поставила исторический рекорд по экспорту зерна. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.interfax.ru/business/793814> (дата обращения 26.04.2021)
113. QIAquick PCR Purification Kit [Электронный ресурс]. URL: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-pcr-purification-kit> (дата обращения 12.01.2022)
114. QIAxcel Advanced System [Электронный ресурс]. URL: <https://www.qiagen.com/us/products/instruments-and-automation/quality-control-fragment-analysis/qiaxcel-advanced-system> (дата обращения 12.01.2022)

Приложение 1

Таблица П. 1

Происхождение изолятов и их характеристика

№	Шифр	Происхождение	Год	Цвет колонии и на YDC	Свечение в УФ	ПЦР		Секвенирование	
						Род <i>Curto</i>	Вид <i>Cff</i>	16S рРНК	<i>gyrB</i> и <i>atpD</i>
1	C2	Соя, сорт Навигатор, Брянская область	2019	Ж	+	+	+		
2	C7			Б		+			
3	C10			Б		+			
4	C13			СЖ	+	+	+	+	
5	C18			Ж		+	+		
6	C19			Б		+			
7	C21	Соя, сорт Касатка, Псковская область	2020	Ж	+	+	+		
8	C22			Ж		+	+	+	
9	C28			СЖ		+			
10	C33			СЖ	+	+			
11	C24	Фасоль, сорт Рубин, Саратовская область	2020	Б	+	+			
12	C43			СЖ		+			
13	H41			Б		+			
14	P4			Б		+			
15	P8			Б		+			
16	P20			СЖ	+	+	+	+	
17	P23	Фасоль, сорт Рубин, Саратовская область	2020	СЖ		+			
18	P31			СЖ		+			
19	P32			СЖ	+	+			
20	P39	Фасоль, смесь сортов, Саратовская область	2019	СЖ		+			
21	H79			Ж	+	+	+	+	

№	Шифр	Происхождение	Год	Цвет колонии и на YDC	Свечение в УФ	ПЦР		Секвенирование	
						Род <i>Curto</i>	Вид <i>Cff</i>	16S рРНК	<i>gusB</i> и <i>atpD</i>
22	H82	Фасоль, смесь сортов, Саратовская область	2019	Ж		+	+		
23	H83			СЖ	+	+	+		
24	H91			Б		+			
25	H94			Ж		+	+		
26	H96			Ж		+	+		
27	G01	Горох, сорт Софья, Орловская область	2020	ОК		+	+	+	+
28	G04			О		+	+	+	+

Обозначения окраски колоний: Б – беловато-желтые колонии, СО – светло-оранжевые, СЖ- светло-желтые, Ж – желтые, О – оранжевые, ОК – оранжево-красные.