

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV. *GLYCINEA* И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ЗАЩИТЕ СОИ ОТ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА

Р.И. ТАРАКАНОВ¹, А.Н. ИГНАТОВ^{2,3}, Ф.С. ДЖАЛИЛОВ¹

¹ ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет –
МСХА имени К.А. Тимирязева;

² ООО «Исследовательский Центр «ФитоИнженерия»;

³ Российский университет дружбы народов)

Бактериальный ожог является одним из основных бактериальных заболеваний бобовых культур, снижающих рентабельность выращивания сои в Российской Федерации. Среди псевдомонад, изолированных из семян растений сои, пораженных бактериальным ожогом, были отобраны 4 штамма *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg). Их свойства совпадали с референтным штаммом CFBP 2214 по результатам заражения растений, ЛОПАТ-тестов, ПЦР-анализа на ген коронафакат лигазы, и частично – по профилю вирулентности бактериофагов. Из образцов почвы с полей, на которых выращивалась соя, были выделены 4 изолята бактериофагов, способных поражать Psg. По результатам проверки штаммовой специфичности бактериофагов для дальнейшего использования в качестве средства защиты растений сои от бактериального ожога был выбран бактериофаг фG17, способный поражать 4 из 5 испытанных штаммов патогена. Проверка эффективности бактериофага на вегетирующих растениях сои на искусственном инфекционном фоне показала достоверное снижение распространенности и развития болезни при двукратном применении фагового препарата. Биологическая эффективность данного приема была близка к эталону (Стрекар, КС, 0,5%) и составляла 74,75%.

Ключевые слова: бактериальный ожог сои, бактериоз, бактериофаги, биологическая защита растений, органическое растениеводство, *Pseudomonas savastanoi* pv. *Glycinea*.

Введение

Соя культурная (*Glycine max* (L.) Merr., 1917) – стратегическая зернобобовая и масличная культура многоцелевого назначения. В 2018 г. в мире было произведено более 356 млн т соевых бобов [21]. Потребление данной культуры возрастает год от года, появляются инновационные отрасли использования сои, и она может стать одним из ключевых растительных объектов развивающейся биоэкономики и биоэнергетики. Широкое внедрение в производство сои – эффективный путь решения проблем недостатка кормового и пищевого белка, успешно используемый в мировом сельском хозяйстве [27]. Однако рост урожайности ограничивается несколькими факторами, и прежде всего – засоренностью посевов, вредителями и болезнями. Болезни сои экономической значимости вызывают более 45 видов грибов, 15 видов вирусов и 6 видов фитопатогенных бактерий [16, 17].

Известны несколько бактериальных болезней сои: бактериальный ожог (син. бактериальная угловатая пятнистость, англ. «bacterial blight») – пустульная, или ржаво-бурая бактериальная пятнистость, и др. Однако наиболее вредоносным является бактериальный ожог [20].

Возбудителем болезни является бактерия *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Coerper, 1919) Gardan et al., 1992 (Psg, синоним – *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Coerper, 1919) Young et al., 1978) [1]. Патоген распространен во всех основных зонах

выращивания сои, включая 41 страну мира [3, 10]. Psg принадлежит геномовиду 2 комплекса *Pseudomonas syringae* и был реклассифицирован как *P. savastanoi*, включающий в себя патоварианты (pvs.) *savastanoi*, *glycinea*, *tabaci* и *phaseolicola* [17]. Psg поражает все надземные части сои, но характерные симптомы обычно наблюдаются на листьях среднего и верхнего ярусов и на стручках. Через 5–15 дней после заражения на листьях появляются некротические маслянистые пятна, окруженные хлоротичным ореолом. Обычно эти пятна увеличиваются и сливаются, образуя некротичные зоны на листьях [5]. Если заражение прошло на раннем этапе, то болезнь проявляется в виде карликовости и быстрой гибели растений [13].

Основным источником первичной инфекции являются зараженные семена [26], реже – сорные растения, зараженные растительные остатки. Потери урожая сои по причине этой болезни могут достигать 40% при благоприятных для патогена погодных условиях и других факторах [4]. При этом снижаются не только урожайность и масличность, но и всхожесть зараженных семян [18]. Массовое проявление бактериального ожога обычно наблюдается во второй половине лета, когда происходит вторичное заражение растений [17, 25].

Меры защиты включают в себя выращивание устойчивых сортов, соблюдение севооборота, предпосевное протравливание семян и обработку растений во время вегетации. Одним из самых надежных способов защиты от патогена является селекция устойчивых к патогену сортов, однако эффективность этого направления снижается ввиду быстрого появления вирулентных к устойчивым сортам рас патогена [14, 24]. Сложность борьбы с Psg обусловлена также высокой исходной изменчивостью популяции патогена и ее малой изученностью [18].

Для химической защиты растений от заболевания используются пестициды на основе меди, антибиотиков и бактерий-антагонистов [6]. Но, к примеру, использование антибиотиков приводит к быстрому накоплению в фитоценозе резистентных к ним форм бактерий, медь имеет свойство накапливаться в продукции и экосистеме, а биологический эффект от применения антагонистов является невысоким и зависит от условий применения [23].

С учетом вышесказанного и в связи с принятием в 2019 г. закона о производстве органической продукции актуальным становится поиск новых способов биологической защиты растений. В этом плане весьма перспективным представляется применение бактериофагов как агентов биологического контроля возбудителя бактериального ожога сои [11, 22].

Целью нашей работы являлось выделение изолятов бактериофагов *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, определение их специфичности по отношению к штаммам фитопатогена и оценка эффективности защитного действия на сое при искусственном заражении растений.

Методика исследования

Исследование проводили в 2019–2020 гг. в лаборатории защиты растений РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева.

Выделение патогена. После проращивания поверхностно-стерилизованных семян на фильтровальной бумаге в течение 5 дней из непроросших, а также из имеющих типичные симптомы бактериального заражения (некроз семядольных листьев, подсемядольного колена, бактериальный экссудат) проростков выделяли бактерии путем гомогенизации пораженных фрагментов семени и проростков пестиком в ступке с добавлением стерильной воды. Последовательные 10-кратные разведения гомогената высевали на среду Кинга Б и инкубировали при 28°C в течение 4-х сут.

При отборе типичных флуоресцирующих колоний псевдомонад их признаки сравнивались с референтным штаммом *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* CFBP 2214.

Отобранные изоляты имели следующие биохимические и морфологические характеристики: белый, слегка кремоватый цвет колоний, колонии круглые, блестящие, 3-дневные колонии образуют сидерофор-пиовердин, диффундирующий в среду и окрашивающий ее при УФ-излучении в синий цвет, не обладают пектолитической активностью.

У выделенных изолятов анализировали биохимические признаки по системе ЛОРАТ (образование левана, оксидазы, пектолитическая активность на ломтиках картофеля, аргининдигидролазная активность и реакция сверхчувствительности (СВЧ) на растениях табака) согласно ранее описанным методам [9] с использованием коммерческих экспресс-тестов Микро-Цитохромоксидаза и Микро-Аргинин (ЗАО «НИЦФ», Санкт-Петербург).

Изоляты бактерий, имевшие характерные для вида *Pseudomonas savastanoi* признаки, анализировали методом ПЦР со специфичными праймерами. Выделение ДНК проводили с 2-суточных колоний чистых культур бактерии при помощи набора для выделения ДНК «ГС-проба» (ООО «АгроДиагностика»). Для проведения анализа использовали праймеры PsgFOR-1 (5'-GGC GCT CCC TCG CAC TT-3') и PsgREV-2 (5'-GGT ATT GGC GGG GGT GC-3'), специфичные для фрагмента гена *cfl* (размер продукта – 650 п.н.), кодирующего коронафакат лигазу (coronafacate ligase), терморегулируемый ген, требующийся для синтеза фитотоксина коронатина [5].

Для проведения амплификации готовили ПЦР-смесь, содержащую 5x Master Mix (5x MasDDTaqMIX-2025, «Диалат ЛТД») – 5 мкл; 1,0 мкл каждого праймера с концентрацией 10 пМ/мкл; 5 нг целевой ДНК – 5 мкл; воду для ПЦР – 13 мкл. Окончательный объем смеси составлял 25 мкл. ПЦР-амплификацию проводили в термоциклере АТС 201 «Nuxtechnik» по программе [28]. Ампликоны разделяли методом электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле с бромистым этидием в буфере TBE0,5x (рис. 1).

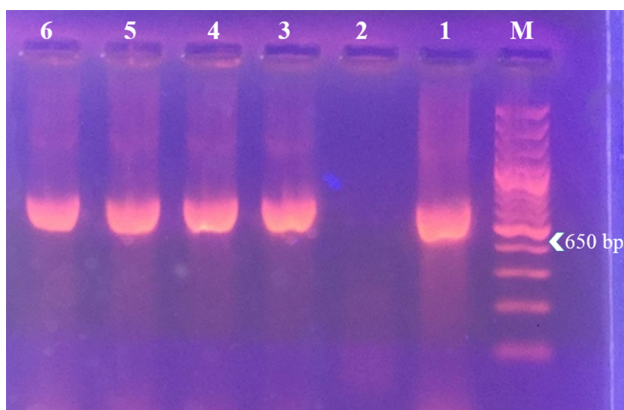


Рис. 1. Результаты амплификации по праймерам PsgFOR-1 и PsgREV-2:
М – маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp, Fermentas;
1 – положительный контроль (штамм CFBP 2214); 2 – отрицательный контроль;
3 – штамм *Psg* A31; 4 – A7-1; 5 – AF-3; 6 – B-7)

Проверку патогенности изолятов проводили на 25-дневных растениях сои сорта Батя, выращенных в пластиковых горшках объемом 0,5 л с торфяным субстратом с перлитом (ООО «Велторф») в теплице при средней температуре 25/20°C (день/ночь) и естественном освещении (июнь-август).

Суспензию бактериальных клеток 2-суточной культуры патогена готовили в стерильной воде с первоначальным разведением до оптической плотности 0,5, измеряемой

фотометром при 590–610 нм и последующим доведением до концентрации 10^8 КОЕ в 1 мл. За двое суток до инокуляции и в течение суток после нее в теплице поддерживали повышенную влажность воздуха (95%) и постоянную температуру воздуха 27°C.

Заражение проводили методом опрыскивания поверхности листьев суспензией патогена с добавлением 0,01%-ного адьюванта Сильвет Голд, ВЭ для улучшения проникновения патогена в устьица. В качестве отрицательного контроля использовали стерильную воду с адьювантом, в качестве положительного – суспензию референтного штамма патогена CFBP 2214. Учет результатов проводили через 14 дней после заражения (рис. 2).

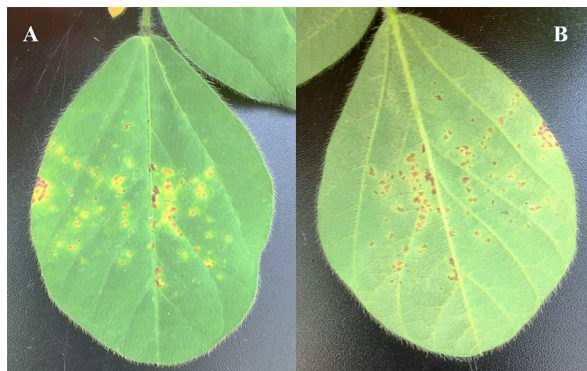


Рис. 2. Симптомы поражения бактериальным ожогом сои сорта Батя на 14-е сутки после искусственного заражения референтным штаммом CFBP 2214: А – верхняя сторона; В – нижняя сторона листа

Выделение бактериофагов. Из образцов почв с полей с посевами сои, пораженными бактериальным ожогом сои, проводили выделение бактериофагов общепринятыми методами [10]. Выделенные изоляты фагов хранили при +4°C для дальнейшей оценки литической активности против штаммов *Psg*.

Тестирование специфичности бактериофагов. В работе использованы 4 высоковирулентных штамма *Psg*, выделенные из семян и проростков сои в 2020 г., и референтный штамм CFBP 2214. Для подготовки к тестированию фагочувствительности бактерии фитопатогена выращивали в течение 48 ч при температуре 27°C на среде Кинга Б с 1,5% агара.

Для тестирования вирулентности изолятов бактериофагов использовали капельный метод на двухслойном агаре [21]. В качестве верхнего слоя при титровании фагов выступала среда Кинга Б с содержанием агара 0,7%. Реакцию считали положительной, если на месте нанесения капли суспензии фага через 12 ч при температуре 27°C происходило формирование бляшки (полное просветление бактериальной культуры).

Эффективность применения бактериофагов в защите сои от бактериального ожога. Оценку проводили при искусственном заражении растений в теплице лаборатории защиты растений РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева в июле и августе 2020 г. Для оценки биологической эффективности бактериофагового препарата против бактериального ожога сои проводили обработку растений суспензией фагов в концентрации 10^7 бляшкообразующих единиц в 1 мл (БОЕ/мл). Концентрацию фагов проверяли путем серийных разведений и посевом на верхний агар с бактерией-хозяином. Предварительно за 2 дня до обработки фагами проводили заражение патогеном растений сои (фаза 3–4 настоящих листьев) согласно методике, описанной выше. Вторую обработку фагами проводили через 6 дней после заражения патогеном. В качестве эталона использовали также двукратную обработку препаратом Стрекар, КС (25 г/л фитобактериомицина + 70 г/л карбендазима, НПЦ «ФармБиомед», Москва). Для защиты

фагов от воздействия УФ компоненты солнечного света добавляли 0,75% обезжиренного молока [7]. Расход рабочего раствора препаратов составлял 10 мл/10 растений. Повторность вариантов опыта – трехкратная, по 15 растений в каждой.

Оценку развития болезни проводили на 14-е сутки после заражения с помощью ранее разработанной шкалы [12]. Статистическую обработку анализируемых данных проводили методом дисперсионного анализа с помощью программ Statistica 12.0 (StatSoft Co, USA) и Microsoft Excel 2013 (Microsoft Co., USA) при сравнении средних по критерию Дункана. Данные, выраженные в процентах, перед обработкой преобразовывали в арксинусы.

Результаты и обсуждение

Из образцов семян сои, полученных из Амурской и Воронежской областях в 2018 и 2019 гг., нами выделено более 50 изолятов флуоресцирующих псевдомонад, из которых отобраны 4 штамма *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. Они были патогенными на растениях сои, идентичны референтному штамму CFBP 2214 по морфологическим признакам культуры на среде Кинга Б, по результатам LOPAT-теста (+, -, -, -,+) и ПЦР-анализа со специфичными праймерами для гена *cfl*. Список штаммов, а также их происхождение указаны в таблице 1.

Таблица 1

Штаммы *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, использованные в работе

Названия штаммов	Сорт сои	Место выращивания	Год выращивания
A31, A7-1, AF-3	Батя	Амурская область, Благовещенский район	2018, 2019
B-7	ОАК Пруденс	Воронежская область, Лискинский район	2019
CFBP 2214	Нет данных	Новая Зеландия	1958

Из образцов почв с полей под посевами сои из Амурской и Воронежской областей, а также из Краснодарского и Хабаровского краев в 2020 г. было выделено 4 изолята фагов, полученных при использовании вышеописанных 5 штаммов бактерии-хозяина.

Тестирование вирулентности изолятов бактериофагов по отношению к штаммам *Psg* проводили капельным методом (рис. 3). За положительный результат принимали только литическое действие на месте нанесения капли с суспензией фага.

Результаты испытания специфичности 4 изолятов фагов к 5 штаммам патогена представлены в таблице 2. Наиболее вирулентным являлся изолят бактериофага фG17, способный поражать 4 из 5 штаммов бактерии-хозяина, используемых в данном исследовании. Этот изолят был выбран для дальнейшей работы по оценке защитного действия на растениях сои против бактериального ожога.

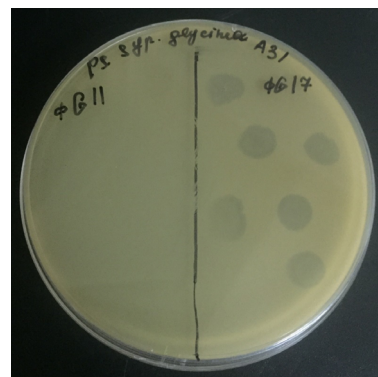


Рис. 3. Тестирование вирулентности изолятов бактериофагов фG11 и фG17 по отношению к штамму *Psg* A31 капельным методом

**Специфичность изолятов бактериофагов
по отношению к коллекции штаммов *P. savastanoi* pv. *glycinea***

Штаммы PsG \ Изоляты фагов	φG3	φG11	φG17	φG4
A31	-	-	+	+
A7-1	-	+	+	-
AF-3	-	+	-	-
B-7	+	-	+	-
CFBP 2214	-	+	+	-
Положительная реакция фагов к штаммам <i>Psg</i> , %	20	60	80	20

Представляет интерес то, что два из четырех изолятов бактериофагов (φG11 и φG17) были вирулентны по отношению к референтному штамму CFBP 2214, выделенному в Новой Зеландии в 1958 г. Штамм патогена A7-1 из Амурской области имел идентичный референтному фаготип. Остальные штаммы патогена также поражались чаще двумя изолятами бактериофагов, а два фага (φG3 и φG4) были вирулентны только к одному штамму бактерии, соответственно A31 и AF-3.

Результаты двух независимых вегетационных экспериментов приведены в таблице 3. Обработка вегетирующих растений сои суспензией бактериофага φG17 при искусственном заражении приводила к снижению развития болезни почти в 4 раза в варианте с обработкой бактериофагами в сравнении с контролем. Таким образом, биологическая эффективность применения фагового препарата была близка к эффективности эталонного пестицида Стрекар, КС, составив примерно 75%.

Таблица 3

**Эффективность бактериофагового препарата на основе изолята φG17
против бактериального ожога сои при искусственном заражении (сорт Батя, 2020)**

Название препарата	Эксперимент 1 (июль 2020 г.)			Эксперимент 2 (август 2020 г.)			Среднее		
	P, %	R, %	БЭ, %	P, %	R, %	БЭ, %	P, %	R, %	БЭ, %
Контроль (вода)	93,2 a	62,4 a	-	86,6 a	49,6 a	-	89,9	56,0	-
Стрекар, КС, (0,5%) – эталон	24,4 b	13,1 b	79,0	26,6 b	11,0 b	77,8	25,5	12,1	78,4
Суспензия бактериофага φG17, 10 ⁷ БОЕ/мл	26,6 b	15,9 b	74,5	28,7 b	12,4 b	75,0	27,7	14,2	74,8

Примечание. В таблице между вариантами, обозначенными одинаковыми буквами, отсутствуют статистически достоверные различия по критерию Дункана при 95%-ном уровне вероятности.

Выводы

1. Из зараженных растений сои выделены и охарактеризованы как *Psg* штаммы, вызывающие бактериальный ожог сои. Их свойства совпадали с референтным штаммом CFBR 2214 по результатам LOPAT-тестов, ПЦР-анализа на ген коронафакат лигазы, и частично – по профилю вирулентности бактериофагов.

2. Из образцов почвы выделено 4 изолята бактериофагов с использованием 5 штаммов-мишеней *Psg*. Все они проявляли штамм-специфическое литическое действие по отношению к 5 штаммам патогена.

3. По результатам фаготипирования предложен для использования при защите сои от бактериального ожога бактериофаг фG17, способный поражать 4 из 5 штаммов патогена.

4. Обработка вегетирующих растений бактериофагом фG17 при искусственном заражении *Psg* способствовала значительному снижению развития болезни (почти в 4 раза) по сравнению с вариантом без обработки и биологической эффективности в 74,8%, статистически неразличимой от применения эталонного пестицида Стрелкар, КС, в рекомендованной концентрации препарата 0,5%.

Выполнено в рамках тематического плана-задания на выполнение научно-исследовательских работ Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» по заказу Министерства сельского хозяйства Российской Федерации за счет средств федерального бюджета в 2020 г.

Библиографический список

1. Qi, M. Genome Sequence Analyses of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and Subtractive Hybridization-Based Comparative Genomics with Nine *Pseudomonads* / M. Qi, D. Wang, C.A. Bradley, Y. Zhao // PLoS ONE. – 2011. – № 6 (1), e16451. DOI: 10.1371/journal.pone.0016451.

2. Игнатов А.Н. Распространение бактериальных и фитоплазменных болезней растений в России / А.Н. Игнатов // Защита и карантин растений. – 2015. – № 5. – С. 6–10.

3. Глобальная база данных ЕОКЗР. URL: <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMGL>.

4. Jagtap D. Bio-efficacy of different antibacterial antibiotic, plant extracts and bio-agents against bacterial blight of soybean caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* / D. Jagtap // Scientific Journal of Microbiology. – 2012. – № 1 (1). – P. 1–9.

5. Ignjatov M. Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* isolates F Лазарев А.М., rom Vojvodina / M. Ignjatov // Phytopathologia Polonica. – 2007. – № 4. – P. 43–54.

6. Лазарев А.М. Ареал и зона вредоносности угловатой пятнистости (бактериального ожога) сои / А.М. Лазарев // Пути повышения эффективности использования ресурсов зернобобовых в селекции. – СПб., 2016. – С. 72–74.

7. Орынбаев А.Т., и др. Выделение бактериофагов *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* и их использование для защиты капусты от сосудистого бактериоза / А.Т. Орынбаев и др. // Известия ТСХА. – 2019. – № 2. – С. 35–48.

8. Fatmi M. // Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material, First Edition. The American Phytopathological Society (APS) / M. Fatmi, R.R. Walcott, N.W. Schaad Minnesota. – USA, 2017. – P. 372.

9. *Lelliott R.A.* Methods in Plant Pathology. Vol. 2: Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Blackwell Scientific Publications. – Oxford, UK, 1987. – P. 216.
10. Бактериофаги: биология и практическое применение / Под ред. Э. Каттер, А. Сулаквелидзе: Пер. с англ. – коллектив переводчиков; Науч. ред. А.В. Летаров. – М.: Научный мир, 2012. – 640 с.
11. Jones, Jeff. Bacteriophages for Plant Disease Control // Annual review of phytopathology. – 2007. – № 45. – P. 245–262. DOI: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094411.
12. Jadhav, Sachin. Grading of Soybean Leaf Disease Based on Segmented Image Using K-means Clustering // IAES International Journal of Artificial Intelligence. – 2016. – P. 15–18. DOI: 5. 13. 10.11591/ijai.v5.i1.pp13–21.
13. *Semangun H.* Penyakit-Penyakit Tanaman Pangan di Indonesia // Gadjah Mada University Press. – 2004. – Yogyakarta. – P. 145.
14. *Farhatullah Dr.* Genetic analysis of race-specificity of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* // Pakistan Journal of Botany. – 2011. № 43. – P. 7–13.
15. *Nomura K., Melotto M.* Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas savastanoi* interactions / K. Nomura, M. Melotto // Curr Opin Plant Biol. – 2005. – № 8. – P. 361–368.
16. Diseases of Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) Glen L. Hartman, collator (last update: 6/25/15). URL: <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Soybean.aspx>.
17. Young JM, Saddler GS, Takikawa Y, DeBoer SH, Vauterin L. *et al.* Names of plant pathogenic bacteria 1864–1995. Rev Plant Pathol. – 1996. – № 75. – P. 721–763.
18. *Monteil C.L.* Population-genomic insights into emergence, crop adaptation and dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pathogens / C.L. Monteil // Microbial genomics. – 2016. – Vol. 2. – № 10. DOI: 10.1099/mgen.0.000089.
19. *Abo-Moch F.* Determination of Races of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* Occurring in Europe / F. Abo-Moch A. Mavridis, K. Rudolph. Journal of Phytopathology. – 2008. – Vol. 143. – P. 1–5. DOI: 10.1111/j.1439–0434.1995.tb00190.x.
20. *Заостровных В.И.* Мониторинг видового состава болезней сои в различных зонах соеяния / В.И. Заостровных // Дальневосточный аграрный вестник. – 2018. – № 4 (48). – С. 51–67.
21. OEC – Soybeans (HS92: 1201) Product Trade, Exporters and Importers”. oec.world. Retrieved May 17, 2020).
22. *Fujiwara A.* Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages / A. Fujiwara, M. Fujisawa, R. Hamasaki, T. Kawasaki, F. Makoto Yamada // Applied and Environmental Microbiology. – 2011. – Vol. 77 (12). – P. 4155–4162.
23. *Volksch B.* Biological Control of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* by Epiphytic Bacteria under Field Conditions / B. Volksch // Microbial Ecology. – 2001. – Vol. 41 (2). – P. 132–139.
24. *Keen N.T.* New disease resistance genes in soybean against *Pseudomonas savastanoi* pv *glycinea*: evidence that one of them interacts with a bacterial elicitor / N.T. Keen, R.I. Buzzell // Theoret. Appl. Genetics. – 1991. – Vol. 81. – P. 133–138. URL: <https://doi.org/10.1007/BF00226123>.
25. *Giesler L.J.* Bacterial diseases of soybean. The Board of Regents of the University of Nebraska on behalf of the University of Nebraska-Lincoln Extension, 2011. – P. 1–2.
26. *Krawczyk K.* *Kosakoniacowanii* as the New Bacterial Pathogen Affecting Soybean (*Glycine max* Willd.) / K. Krawczyk, N. Borodynko-Filas // European Journal Plant Pathology. – 2020. – Vol. 157. – P. 173–183. URL: <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01998-8>.

27. Магомедов К.Г. Влияние регуляторов роста на структуру урожая и урожайность сои / К.Г. Магомедов // Фундаментальные исследования. – 2008. – № 5. – С. 35–37.

28. Schaad N. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria / N. Schaad, J.B. Jones, W. Chun // APS Press St. Paul, Minnesota, USA. – 2001. – P. 373.

ISOLATION OF SPECIFIC BACTERIOPHAGES – *PSEUDOMONAS SAVASTANOI* PV. *GLYCINEA* – AND THEIR USE IN SOYBEAN BACTERIAL BLIGHT CONTROL

R.I. TARAKANOV¹, A.N. IGNATOV^{2,3}, F.S. DZHALILOV¹

(¹Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy

2 “FitoInzheneriya (PhytoEngineering)” R&D Center

³Russian University of People’s Friendship)

Bacterial blight is one of most harmful diseases of legumes, reducing the profitability of soybean production in Russian Federation. Among a number of Pseudomonas isolates obtained from diseased seeds and plants of soybean, 4 strains were selected and confirmed as Pseudomonas savastanoi pv. glycinea (Psg). Properties of the isolated bacteria were similar to type strain of Psg CFBP 2214 in plant virulence, LOPAT tests, and PCR analysis for coronafacate ligase gene, and partly – in the phage reaction profile. Four isolates of bacteriophages specific to Psg were obtained from soil samples taken from fields with soybean crops. Virulence testing for the bacteriophages showed that bacteriophage ϕ G17 infected 4 of 5 tested Psg strains, and it was chosen for further experiments with bacterial blight control. The bacteriophage effect control conducted on soybean plants inoculated by Psg experiments confirmed that 2 treatments of plants by the bacteriophage significantly reduced the disease development. Biological effect of the bacteriophage application was 74.75%, which is very close to the pesticide Strekar in a concentration of 0.5%.

Key words: soybean bacterial blight, bacterial diseases, bacteriophages, biological control of plant diseases, organic farming, *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

References

1. Qi, M., Wang D., Bradley C.A., Zhao Y. Genome Sequence Analyses of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and Subtractive Hybridization-Based Comparative Genomics with Nine Pseudomonads // PLoS ONE. 2011. 6(1), e16451. DOI: 10.1371/journal.pone.0016451.

2. Ignatov A.N. Rasprostranenie bakterial'nykh i fitoplazmennykh bolezney rasteniy v Rossii [Spread of bacterial and phytoplasmic plant diseases in Russia] // Zashhita i karantin rasteniy. 2015; 5: 6–10. (In Rus.)

3. Global'naya baza danny'x EOKZR [EPPO Global Database] // [Electronic resource] <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMGL>. (In Rus.)

4. Jagtap D. Bio-efficacy of different antibacterial antibiotic, plant extracts and bio-agents against bacterial blight of soybean caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* // Scientific Journal of Microbiology. 2012; 1(1): 1–9.

5. Ignjatov M. Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* isolates From Vojvodina // Phytopathologia Polonica. 2007; 4: 43–54

6. Lazarev A.M., Areal i zona vredonosnosti uglovatoy pyatnistosti (bakterial'nogo ozhoga) soi [Area and zone of harmfulness of angular spotting (fire blight) of soybeans // Puti

povysheniya effektivnosti ispol'zovaniya resursov zernobobovykh v selektsii. Sankt-Peterburg. 2016: 72–74. (In Rus.)

7. *Orynbaev A.T. et al.* Vydelenie bakteriofagov *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* i ikh ispolzovanie dlya zashchity kapusty ot sosudistogo bakterioza [Isolation of bacteriophages *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and their use to protect cabbage from vascular bacteriosis] // *Izvestiya TSXA*. 2019; 2: 35–48. (In Rus.)

8., *M. Fatmi, R.R. Walcott., N.W. Schaad* // *Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material*, First Edition. The American Phytopathological Society (APS). Minnesota, USA. 2017: 372.

9. *Lelliott R.A.* *Methods in Plant Pathology Vol. 2: Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 1987: 216

10. Bakteriofagi: biologiya i prakticheskoe primeneniye [Bacteriophages: biology and practical application] / Ed. by E. Katter, A. Sulakvelidze // Translated from English by a group of translators; ed. by A.V. Letarov. – Moskva: Nauchniy mir, 2012: 640. (In Rus.)

11. *Jones, Jeff.* Bacteriophages for Plant Disease Control // Annual review of phytopathology. 2007. 45. P. 245–262. DOI: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094411.

12. *Jadhav, Sachin.* Grading of Soybean Leaf Disease Based on Segmented Image Using K-means Clustering // *IAES International Journal of Artificial Intelligence*. 2016: 15–18. DOI: 5. 13. 10.11591/ijai.v5.i1.pp13–21.

13. *Semangun H.* *Penyakit-Penyakit Tanaman Pangan di Indonesia* // Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 2004: 145.

14. *Farhatullah Dr.* Genetic analysis of race-specificity of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* // *Pakistan Journal of Botany*. 2011; 43: 7–13.

15. *Nomura K., Melotto M.* Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas savastanoi* interactions // *Curr Opin Plant Biol*. 2005; 8: 361–368.

16. *Diseases of Soybean (Glycine max [L.] Merr.)* Glen L. Hartman, collator (last update: 6/25/15) <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Soybean.aspx>.

17. *Young JM, Saddler GS, Takikawa Y, DeBoer SH, Vauterin L, et al.* Names of plant pathogenic bacteria 1864–1995. *Rev Plant Pathol*. 1996; 75: 721–763.

18. *Monteil C.L.* Population-genomic insights into emergence, crop adaptation and dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pathogens // *Microbial genomics*. – 2016; 2; 10. DOI: 10.1099/mgen.0.000089

19. *Abo-Moch F., Mavridis A., Rudolph K.* Determination of Races of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* Occurring in Europe. *Journal of Phytopathology*. 2008; 143: 1–5. DOI: 10.1111/j.1439–0434.1995.tb00190.x.

20. *Zaostrovnykh V.I.* Monitoring vidovogo sostava bolezney soi v razlichnykh zonakh soseyaniya [Monitoring of the species composition of soybean diseases in different zones of soybean growing] // *Dal'nevostochniy agrarniy vestnik*. 2018; 4 (48): 51–67. (In Rus.)

21. OEC – Soybeans (HS92: 1201) Product Trade, Exporters and Importers”. oec.world. Retrieved May 17, 2020.

22. *Fujiwara A., Fujisawa M., Hamasaki R., Kawasaki T., Yamada T.* Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages // *Applied and Environmental Microbiology*. 2011; 77(12): 4155–4162

23., *B. Volksch.* Biological Control of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* by Epiphytic Bacteria under Field Conditions // *Microbial Ecology*. 2001; 41 (2): 132–139.

24. *Keen N.T., Buzzell R.I.* New disease resistance genes in soybean against *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*: evidence that one of them interacts with a bacterial elicitor // *Theoret. Appl. Genetics*. 1991; 81: 133–138. <https://doi.org/10.1007/BF00226123>

25. *Giesler L.J.* Bacterial diseases of soybean. The Board of Regents of the University of Nebraska on behalf of the University of Nebraska–Lincoln Extension. 2011: 1–2.
26. *Krawczyk K., Borodynko-Filas N. Kosakoniacowanii* as the New Bacterial Pathogen Affecting Soybean (*Glycine max Willd.*) // *European Journal Plant Pathology*. 2020; 157: 173–183. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01998-8>
27. *Magomedov K.G.* Vliyanie regulatorov rosta na strukturu urozhaya i urozhaynost' soi // *Fundamental'ny'e issledovaniya*. 2008; 5: 35–37.
28. *Schaad N., Jones J.B., Chun W.* Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria // APS Press St. Paul, Minnesota, USA. 2001: 373.

Тараканов Рашит Ислямович, магистрант кафедры защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-12-79; e-mail: tarakanov.rashit@mail.ru).

Игнатов Александр Николаевич, заместитель генерального директора по научной работе, доктор биологических наук, Исследовательский центр ООО «ФитоИнженерия» (141880, Московская область, Рогачево, ул. Московская, 58, Российская Федерация); Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6; тел.: (926) 197-36-00; e-mail: an.ignatov@gmail.com).

Джалилов Февзи Сеид-Умерович, доктор биологических наук, профессор, зав. кафедрой защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел.: (499) 976-12-79; e-mail: labzara@mail.ru).

Rashit I. Tarakanov – postgraduate student, the Plant Protection Department, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49; phone: (499) 976-12-79; e-mail: tarakanov.rashit@mail.ru).

Aleksandr N. Ignatov – DSc, Research Director, “FitoInzheneriya (PhytoEngineering)” R&D Center, Moskovskaya Str., 58, 141880, Rogachevo, Moscow reg., Russian Federation; Peoples’ Friendship University of Russia, Miklukho-Maklay Str., 6, 117198, Moscow; phone: (9926) 197-36-00; e-mail: an.ignatov@gmail.com

Fevzi S. Dzhalilov – DSc (Bio), Professor, Head of the Plant Protection Department, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (127550, Moscow, Timiryazevskaya Str., 49; phone: (499) 976-12-79; e-mail: labzara@mail.ru).