

На правах рукописи

ЧАН ВАН КУАНГ

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ФИТОФТОРОЗА
ЦИТРУСОВЫХ КУЛЬТУР В ГОРНОЙ МЕСТНОСТИ
СЕВЕРНОГО ВЬЕТНАМА**

Специальность: 4.1.3. Агрехимия, агропочвоведение, защита и карантин растений

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата сельскохозяйственных наук**

Москва 2024

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»

Научный руководитель:

доктор сельскохозяйственных наук, доцент,
профессор агробиотехнологического
департамента аграрно-
технологического института

Пакина Елена Николаевна

Официальные оппоненты:

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

Белов Григорий Леонидович

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник
кафедры микологии и альгологии
биологического факультета
ФГБОУ ВО «Московский государственный
Университет имени М.В. Ломоносова».

Александрова Алина Витальевна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет - МСХА имени К. А. Тимирязева».

Защита диссертации состоится «11» декабря 2024 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета ПДС 2021.002 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН) по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д. 8 корп.2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке в УНИБЦ (Научной библиотеке) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН) по адресу: 117198 ул. Миклухо-Маклая, д. 6, и на сайте: <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

и.о. Ученого секретаря,
доктор биологических наук

Игнатов А. Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Цитрусовые культуры входят в десятку экономически важных сельскохозяйственных растений по общемировому урожаю плодов и занимают первое место в международной торговле фруктами в стоимостном выражении (Sawake *et al.* 2022). В северных провинциях Вьетнама цитрусовые в настоящее время являются группой фруктовых деревьев с наибольшей площадью произрастания и урожайностью, средний темп роста которых составляет в год 10% по площади и 12,5% по объему производства. Однако одним из основных препятствий для выращивания цитрусовых является фитофтороз, приводящий к гибели растений и значительной потере урожая (Dang *et al.* 2004). *Phytophthora spp.* является известным почвенным патогеном растений, способным наносить значительный вред цитрусовым культурам. Болезнь сопровождается такими симптомами, как гуммоз, корневая гниль, хлороз листьев и бурая гниль (Van Tran *et al.* 2023). Хотя обработка фунгицидами широкого спектра действия позволяет избавиться от этой и других болезней, передающихся через почву, важно осознавать очевидные проблемы, связанные с их использованием. К последствиям применения химических средств защиты относятся загрязнение окружающей среды, угроза здоровью человека, ущерб водным экосистемам, сокращение численности полезных микроорганизмов в почве и даже истощение основного плодородного слоя (Panth *et al.* 2020). Альтернативой использованию химических фунгицидов является применение микроорганизмов-антагонистов. Некоторые виды рода *Bacillus* признаны одним из наиболее эффективных агентов биологического контроля благодаря их свойствам по ингибированию роста патогенов.

Учитывая вышеизложенное, данное исследование направлено на выяснение состава заболеваний и оценку влияния видов *Phytophthora spp.*, связанных с гуммозом, корневой и плодовой гнилью цитрусовых деревьев в Северном Вьетнаме. Кроме того, были изучены морфологические и биологические характеристики *Bacillus pumilus*, его эффективность в борьбе с фитофторозом, а также его потенциал для стимулирования роста растений. Данное исследование актуально для формирования долгосрочного устойчивого сельского хозяйства и борьбы с болезнями цитрусовых деревьев в Северном Вьетнаме.

Степень разработанности темы исследования. Некоторые виды рода *Phytophthora*, такие как *P. citrophthora*, *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. prodigiosa* и *P. mekongensis*, традиционно считаются патогенными для цитрусовых культур во Вьетнаме (Puglisi *et al.* 2017, Dang *et al.* 2004, Chi *et al.* 2019). Однако многие виды фитофтороза остаются неидентифицированными. Chi *et al.* (2020) подчеркнули необходимость дальнейших исследований видов рода *Phytophthora*. Кроме того, необходим поиск альтернативы химическим пестицидам для эффективной профилактики заболеваний цитрусовых деревьев во Вьетнаме (Vu *et al.* 2023).

Объектами исследований являлись семь видов цитрусовых, включая помело (*C. grandis* cv. Doan Hung, cv. Soi Ha, и cv. Duong), апельсин (*C. sinensis* cv. Vinh, cv. Sanh, и cv. Duong Canh) и лайм (*C. aurantiifolia* cv. Tu Qui).

Шесть штаммов оомицетов, включая *Phytophthora palmivora*, *P. nicotianae*, *P. citrophthora*, *Phytophthora mekongensis*, *Phytophthora parvispora* и *Pythium delicense*, патогенных для цитрусовых, послужили объектом для поиска эффективных нехимических мер контроля.

Штаммы *Bacillus pumilus* VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13, выделенные из ризосферы здоровых цитрусовых деревьев, исследовались на антагонистическую активность против видов р. *Phytophthora* и способность стимулировать рост растений.

Предмет исследования. Разработка элементов биологического контроля фитофтороза цитрусовых культур.

Цель и задачи исследований. Целью исследований являлось выявление видов рода *Phytophthora*, поражающих цитрусовые культуры на разных этапах их роста и развития, а также идентификация и оценка эффективности антагонистических бактериальных штаммов для контроля фитофтороза и стимулирования роста растений. Для достижения указанной цели решались следующие задачи:

Оценить текущее состояние производства и распространенность фитофтороза цитрусовых деревьев в северных горных провинциях Вьетнама.

Идентифицировать виды рода *Phytophthora* и изучить их морфологию, биологию, патогенность и воздействие на цитрусовые деревья.

Оценить чувствительность патогенов к различным фунгицидам.

Выделить штаммы бактерий с высоким антагонистическим потенциалом против видов рода *Phytophthora* в лабораторных условиях.

Оценить морфологические и биологические характеристики бактериальных штаммов.

Определить эффективность антагонистических бактериальных штаммов в борьбе с *Phytophthora* и стимулировании роста растений в условиях «*in vitro*» и «*in vivo*».

Научная новизна исследований. Были собраны новые данные о распространении видов рода *Phytophthora* в горных районах северного Вьетнама. Выявлены различия между изолятами по морфологии, чувствительности к фунгицидам и агрессивности. Впервые во Вьетнаме были обнаружены *Phytophthora parvispora* и *Pythium deliense*, а *Phytophthora mekongensis* была впервые выявлена в горных районах северного Вьетнама.

Это первое исследование, которое показало, что штаммы *Bacillus pumilus* (VN-H5, VN-H8, VN-F8, VN-K13) могут подавлять рост пяти опасных видов р. *Phytophthora*, поражающих цитрусовые деревья во Вьетнаме.

Установлено, что штаммы *Bacillus pumilus* могут продуцировать летучие органические соединения (ЛОС), аммиак (NH₃), индол-3-уксусную кислоту (ИУК) и ферменты, включая протеазу, фосфатазу, каталазу, хитиназу и целлюлазу.

Идентифицированы гены синтеза антибиотиков в штаммах *Bacillus pumilus*, ответственные за производство итурина, субтилина, бацилизина и бацилломицина. В данном исследовании впервые выявлены штаммы *B. pumilus* (VN-K13, VN-F8), положительные по наличию гена бацилломицина B.

Показано, что штамм *B. pumilus* VN-K13 способствует увеличению массы стеблей и корней цитрусовых саженцев в опытах «*in vivo*».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Определение видового состава фитопатогенных оомицетов рода *Phytophthora* на растениях цитрусовых культур в горной местности северного Вьетнама.
2. Наиболее эффективные препараты для борьбы с фитофторозом цитрусовых культур.
3. Механизм ингибирования фитопатогенов штаммом *Bacillus pumilus* VN-K13

Теоретическая и практическая значимость. Идентификация новых видов *Phytophthora spp.*, изучение их характеристик и чувствительности к различным методам контроля будет способствовать пониманию разнообразия и эволюции этих патогенов растений.

Оценка эффективности штаммов бактерий-антагонистов в борьбе с целевыми видами р. *Phytophthora* в лабораторных и тепличных условиях может послужить основой для будущих исследований в области биологического контроля болезней цитрусовых культур.

Результаты этого исследования могут быть использованы для разработки более эффективных и устойчивых стратегий борьбы с болезнями цитрусовых культур во Вьетнаме.

Апробация и публикации по результатам исследований. Результаты работы представлены на научных конференциях «Молодежь и наука XXI века: актуальные теоретические исследования» 29 мая 2024 г. и «Время науки: актуальные вопросы, достижения и инновации» 30 мая 2024 г. Материалы диссертации опубликованы в 8 работах, в том числе 3 статьи в журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science, 2 статьи в журналах из списка ВАК.

Личный вклад автора заключается в проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, подготовке материалов научных публикаций и написании диссертационной работы.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, выводов. Объем диссертации составляет 151 страницы. Содержит 11 таблиц, 19 рисунков и 3 приложения. Список литературы включает 232 наименований на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен всеобъемлющий обзор биологии цитрусовых культур и различных видов оомицетов рода *Phytophthora*, включая симптомы поражения и способы передачи. Также рассматриваются стратегии борьбы с болезнями цитрусовых деревьев и отмечается роль штаммов *Bacillus* для биологической борьбы с ними.

Во второй главе подробно описаны методики исследования, в том числе: сбор данных о распространении фитопфтороза, выделение и идентификация видов р. *Phytophthora spp*, анализ их патогенности и тестирование чувствительности к фунгицидам. Выделение и идентификация штаммов *Bacillus*, а также оценка их антагонистической активности. Качественный анализ ферментативной активности штаммов бактерий, включая протеазу, хитиназу, целлюлазу, β -1,3-глюканазу, амилазу, индол-3-уксусную кислоту, производство сидерофоров и аммиака, солюбилизацию фосфатов, каталазу, утилизацию цитрата, липазу и уреазу. Выявление генов, ответственных за биосинтез специфических противомикробных антибиотиков, таких как бацилломицин, итурин, бацилизин, субтилин, фенгицин и сурфактин, с помощью ПЦР. Представлены методы оценки эффективности штаммов бактерий *Bacillus* в биологическом контроле и их потенциала для стимулирования роста растений цитрусовых в условиях «*in vivo*».

В третьей главе приводятся данные исследований о состоянии цитрусовых насаждений в горных провинциях северного Вьетнама. Полученные результаты из обширного обзора 815 цитрусовых садов показывают, что преобладающая часть исследованной территории (61,80%) занята цитрусовыми деревьями в возрасте от 7 до 15 лет, в то время как деревья старше 15 лет занимают лишь 2,40% территории. В обследованных фруктовых садах, 552 использовали привитые саженцы, что составляет 67,73%. 238 садов применяли метод размножения черенкованием, что составляет 29,20%, в то время как 25 садов выращивали деревья с использованием традиционного метода размножения семенами. В садах, где применяли методы черенкования и семенного размножения, деревья имели возраст от 7 до более 15 лет. В отличие от этого, привитые саженцы были в основном моложе, в возрасте от 1 до 7 лет.

В ходе нашего исследования выявили 11 вредоносных заболеваний, поражающих цитрусовые деревья, включая 8 грибных, 2 бактериальных и одно заболевание неинфекционной природы.

Оценка распространенности *Phytophthora spp*, в основных регионах выращивания цитрусовых. Районы, характеризующиеся обширным и долгосрочным выращиванием цитрусовых, особенно те, где наблюдаются плохо дренируемые почвы, демонстрируют значительно более высокие уровни заболеваемости. Самое серьезное поражение отмечается в районе Хам Иен (Туен Куанг) с процентом заболевания в 19,5%. За ним следуют Ван Чан (Йен бай) - 15,8%, Йен Сон (Туен Куанг) - 15,2%, Ви Суен (Ха Зянг) - 12,7%, тогда как самый низкий уровень заражения отмечается в районе Доан Хунг (Фу Тхо) - 1,4% (Рис. 1).

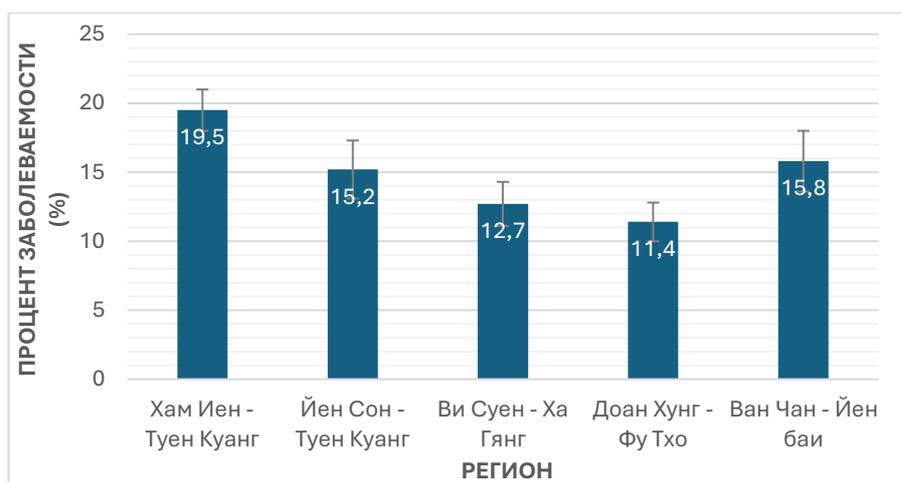


Рисунок 1. Уровень заболеваемости *Phytophthora* в основных областях выращивания цитрусовых в северных горных регионах Вьетнама

Фитофтороз имеет наибольшее распространение на низменных участках и подножиях, где отмечаются уровни заболеваемости в 17% и 13,6% соответственно. Напротив, на склонах уровень поражения составляет 7,2%, а на ровных участках - 4,8%. Заметно, что на вершинах холмов заболевание проявляется наименее сильно, регистрируя уровень заболеваемости всего лишь 3% (Рис. 2).

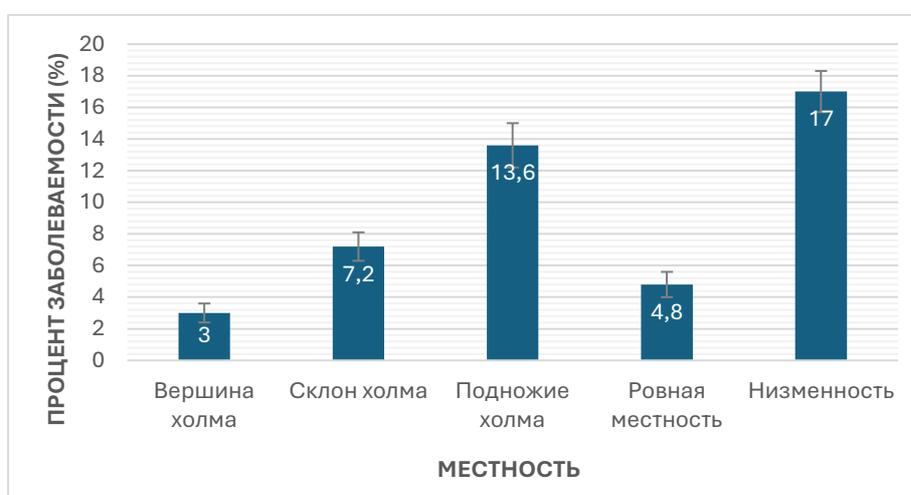


Рисунок 2. Влияние рельефа местности на пораженность фитофторозом

Сбор образцов оомицетов: Было идентифицировано пять видов *Phytophthora* (*P. citrophthora*, *P. nicotianae*, *P. mekongensis*, *P. parvispora*, *P. palmivora*) и четыре вида *Pythium* (*P. deliense*, *P. cucurbitacearum*, *P. inflatum*, *P. carolinianum*). Изоляты были представлены в Genbank.

Морфологический анализ: Изоляты *Phytophthora* были разделены на четыре подгруппы на основе морфологии колоний и скорости роста мицелия (Табл. 1, рис. 3, 4).

Таблица 1. Морфологические характеристики видов рода *Phytophthora*

Параметры	подгруппа	подгруппа	подгруппа	подгруппа	подгруппа	
	1 (<i>P. palmivora</i>)	2 (<i>P. mekongensis</i>)	3 (<i>P. citrophthora</i>)	4 (<i>P. nicotianae</i>)	5 (<i>P. parvispora</i>)	
Изученные изоляты	VN-Oo33 VN-Oo38	VN-Oo68 VN-Oo72	VN-Oo76 VN-Oo78	VN-Oo58 VN-Oo65	VN-Oo3 VN-Oo10	
Спора нгии ¹ (μm)	Д×Ш среднее	63.91 ± 8.54 × 40.43 ± 4.53	54.23± 5.84 × 34.33 ± 2.93	52.92 ± 6.34 × 32.22 ± 3.83	59.82 ± 10.74 × 35.82 ± 2.94	61.5 ± 7.6 x 37.3 ± 3.8
	Диапазон средних значений	44.28 – 82.03 × 31.54 –	42.82 – 66.43 × 28.94 –	44.30 – 70.04 × 24.83 –	45.25 – 79.90 × 30.31 –	45.6-74.8 x 32.5 – 45.6
	изолята	51.73	39.84	43.32	42.84	
	Д/Ш соотноше ние	1.59	1.58	1.64	1.67	1.64
	Морфология колонии на PDA ²	звездчаты й узор	звездчаты й узор с полосками	плотный хлопковый , розеточны й узор	легкий розеточн ый узор	хлопковы й, рисунок хризанте мы
Морфология колонии на V8 ³	гладкий, слегка радиальн ый	гладкий, слегка радиальны й	гладкий, слегка радиальны й	слегка волокнист ый	волокнис тый, рыхлый, хризанте моподобн ый	
Средняя скорость роста на PDA* (25°C, мм/день)	5.50 ± 0.83 a	5.60 ± 1.16 a	8.50 ± 0.83 b	6.30 ± 0.67 a	9.90 ± 0.88 bc	
Средняя скорость роста на V8 (25°C, мм/день)	6.60 ± 0.84 a	10.20 ± 1.23 c	10.10 ± 0.99 c	5.60 ± 0.70 a	11.90 ± 1.52 d	

Примечание: Значения скорости роста мицелия в обеих колонках и строках, за которыми следуют одинаковые буквы, статистически не различаются ($p < 0,05$, тест ХСД Тьюки).

Сокращения: Ш – ширина; Д – длина; PDA – агар картофельно-декстрозный; V8 – агар из сока V8.

¹ Измерение спорангиев производилось по 30 спорангиям для каждого изолята.

Морфологические особенности определялись по трем повторениям для каждого изолята.

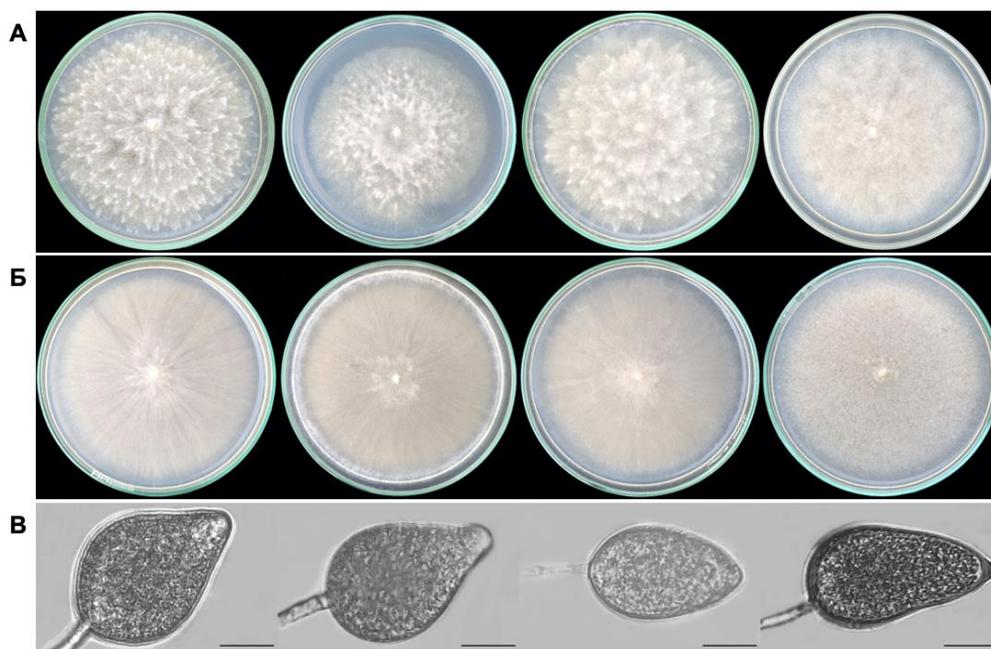


Рисунок 3. Морфология видов *Phytophthora*, связанных с гуммозом citrusовых. А-Б. Пятидневные культуры *P. mekongensis* - изолят VN-0068, *P. palmivora* - изолят VN-0038, *P. citrophthora* - изолят VN-0076 и *P. nicotianae* - изолят VN-0065 на PDA и V8 соответственно (слева направо). В. Спорангии *P. mekongensis*, *P. palmivora*, *P. citrophthora* и *P. nicotianae* (слева направо). Шкалы = 15 мкм

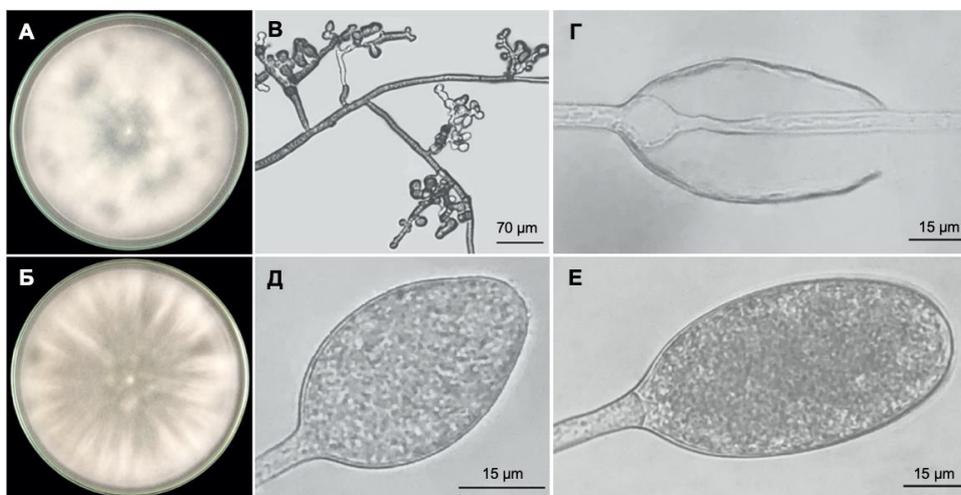


Рисунок 4. Морфология *Phytophthora parvispora*. - изолята Oo10-VN. А-Б. Пятидневные культуры на питательных средах PDA и V8 соответственно; В. Типичные кораллоидные мицелии; Г-Е. Различные формы спорангиев

Идентификация видов р. *Phytophthora*: На основании морфологических характеристик и анализа последовательностей гена *cox1* и области ITS в данном исследовании были определены *P. mekongensis*, *P. palmivora*, *P. citrophthora*, *P. nicotianae* и *P. parvispora* как современные виды *Phytophthora*, ассоциированные с гуммозом стеблей citrusовых (рис. 5).

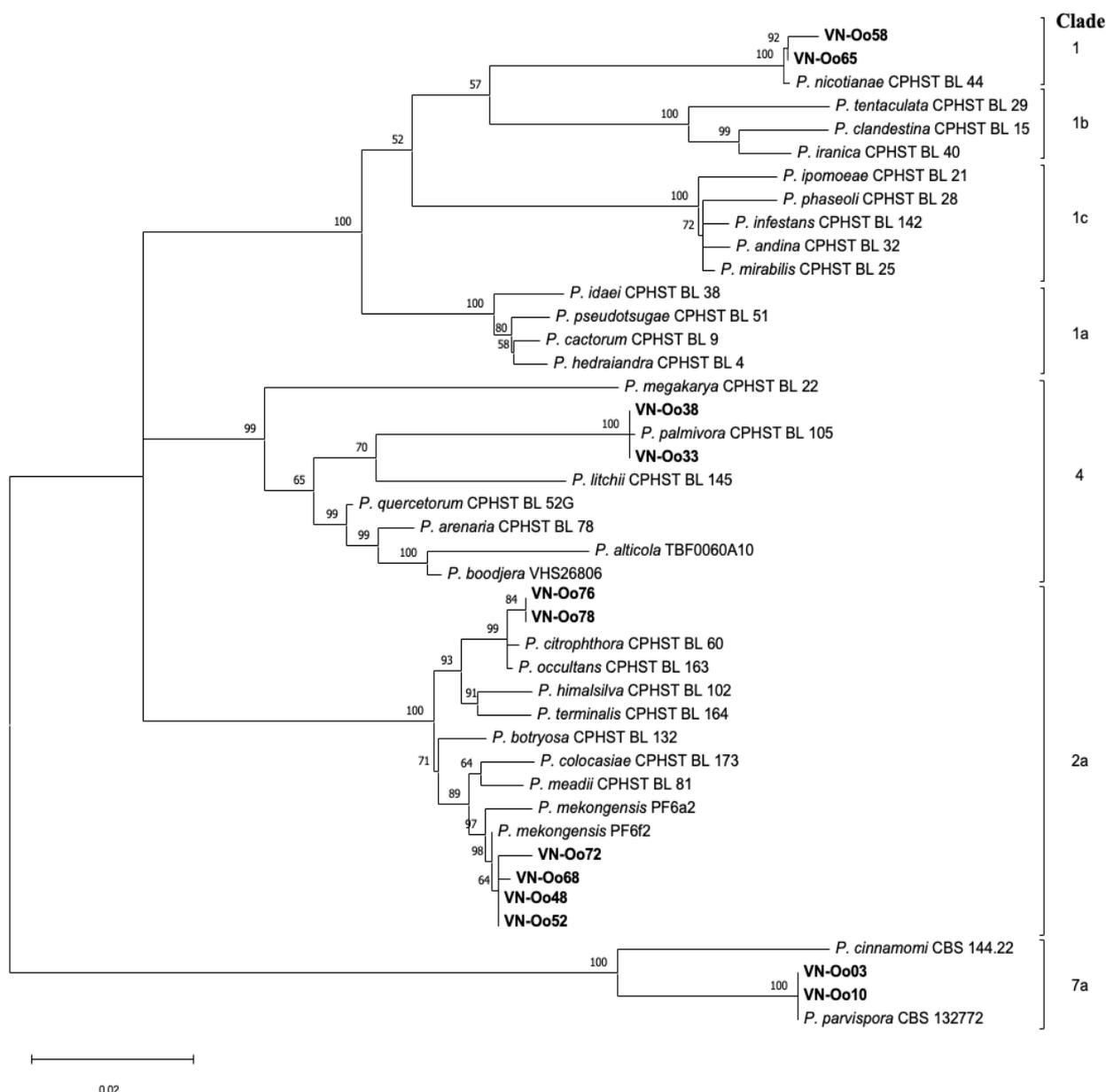


Рисунок 5. Деревья максимального правдоподобия изолятов *Phytophthora* spp., основанные на конкатенированных последовательностях ITS и *cox1*

Это первое сообщение, фиксирующее *P. parvispora* в качестве патогенного агента, вызывающего гуммоз и корневые гнили на citrusовых деревьях во Вьетнаме. Кроме того, благодаря успешному выделению *P. mekongensis* из пораженных тканей апельсинов и лимонов, это исследование также является первым документальным подтверждением естественного заражения *P. mekongensis* апельсинов и лимонов в citrusовых садах.

Испытание патогенности видов р. *Phytophthora*: *P. mekongensis* и *P. citrophthora* являются наиболее агрессивными видами среди протестированных *Phytophthora* spp., при этом помело оказалось более восприимчивым к инфекции *Phytophthora*, чем плоды апельсина и лайма. При инокуляции стебля инфекция развилась на саженцах помело, апельсина и лайма, что привело к гуммозу и коричневой окраске некротических участков на инокулированных участках через 7 дней (Рис. 6).

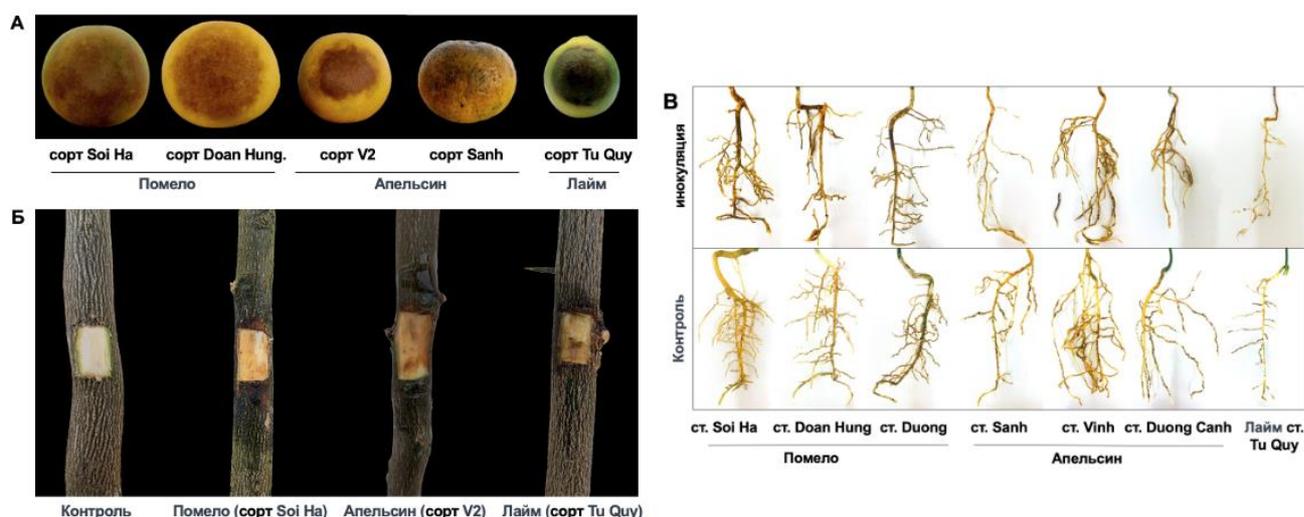


Рисунок 6. Симптомы болезни на различных частях citrusовых деревьев, вызванные *P. mekongensis* — изолят VN-0068. Симптомы на плодах, стеблях и корнях были зафиксированы на 7, 14 и 28 дней после инокуляции, соответственно

Чувствительность видов р. *Phytophthora* к фунгицидам: Все протестированные фунгициды ингибировали рост всех видов *Phytophthora* «*in vitro*» (табл. 2, рис.7).

Таблица 2. Чувствительность к фунгицидам видов р. *Phytophthora*, ассоциированных с гуммозом в citrusовых

Активный ингредиент (а. и.)	Концентрация а. и.	Концентрация используемого а.и.	PIRG (%)*				
			<i>P. palmivora</i>	<i>P. mekongensis</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. citrophthora</i>	<i>P. parvispora</i>
Манкозоб ¹	80%	2.75 g/l	24.44 ^a	16.22 ^a	24.55 ^a	16.00 ^a	20.23 ^a
Хлороталонил ²	75%	1.35 g/l	44.11 ^b	66.45 ^{de}	48.00 ^{bc}	44.78 ^b	44.35 ^b
Фосетил алюминий ³	800 g/kg	2.0 g/l	21.00 ^a	20.44 ^a	20.78 ^a	15.11 ^a	43.95 ^b
Фосфонат калия ⁴	400 g/l	10 ml/l	17.00 ^a	43.33 ^b	25.45 ^a	43.89 ^b	44.28 ^b
Диметоморф ⁵	50%	0.7 g/l	56.00 ^{cd}	46.78 ^{bc}	50.22 ^{bc}	67.00 ^e	68.25 ^e
Металаксил ⁶	350 g/kg	1.71 g/l	98.44 ^f	93.33 ^f	90.33 ^f	74.67 ^e	91.25 ^f
Контроль			0 ^g	0 ^g	0 ^g	0 ^g	0 ^g

Примечание: Концентрации каждого фунгицида использовались в соответствии с рекомендациями производителя для применения в полевых условиях. Пятьдесят микролитров испытуемого раствора добавляли в каждую лунку в центре пластины картофельно-декстрозного агара. Три мицелиальные пробки были размещены в трех местах на равном расстоянии друг от друга по периметру каждой пластины..

Сокращения: PIRG: процентное ингибирование роста радиуса.

1 Fovathane 80WP (Nantong Baoye Chemical Co., Ltd, Китай)

2 Daconil 75WP (SDS Biothech K.K., Токио, Япония)

3 Aliette 800WG (Bayer, Берлин, Германия)

4 Agri-fos 400 (Agrichem, Квинсленд, Австралия)

5 Phytocide 50WP (Jiangsu Changlong Chemicals Co. Ltd, Кунтай)

6 Metalaxyl 500WP (Nantong Dyes Chemicals Factory, Кунтай)

*Средние значения ($n = 3$) в столбцах и строках, сопровождаемых одинаковыми буквами, достоверно не различаются ($p < 0,05$ тест Тьюки HSD).

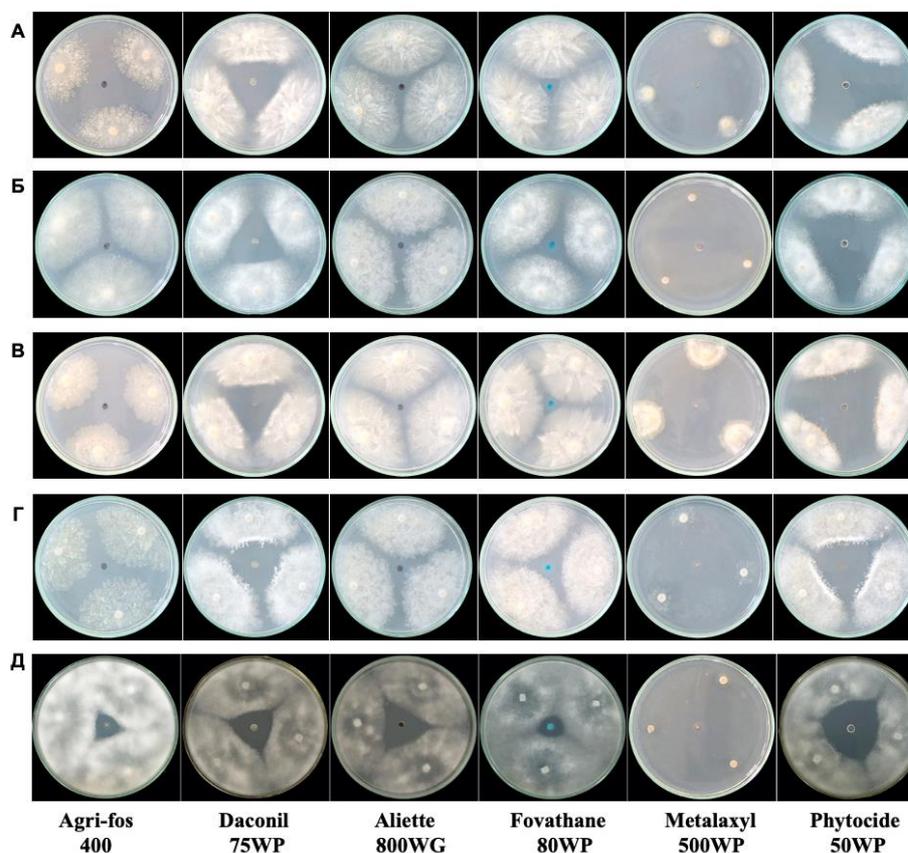


Рисунок 7. Ингибирующая активность различных фунгицидов на рост мицелия видов *Phytophthora*: (а) *P. mekongensis*. (б) *P. palmivora*. (в) *P. citrophthora*. (г) *P. nicotianae*. (д) *P. parvispora*

Различные бактерии ризосферы из почвы с супрессирующим действием на болезни с ингибирующей активностью против роста *Phytophthora*: Из 143 полученных бактериальных изолятов, четыре, обозначенные как VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13, проявили значительную антагонистическую активность. Эта оценка включала наблюдение за зонами ингибирования, когда данные изоляты инкубировались с пятью патогенными видами р. *Phytophthora*, известными своей патогенностью для цитрусовых деревьев.

В проведенных опытах изолят VN-K13 последовательно продемонстрировал наивысшую степень антагонистической активности в подавлении радиального роста видов *Phytophthora* (рис. 8). Это делает его перспективным претендентом для включения в стратегию биологического контроля. VN-F8 также показал значительную антагонистическую активность, в то время как VN-H8 и VN-H5 проявили умеренные и более низкие уровни антагонизма.

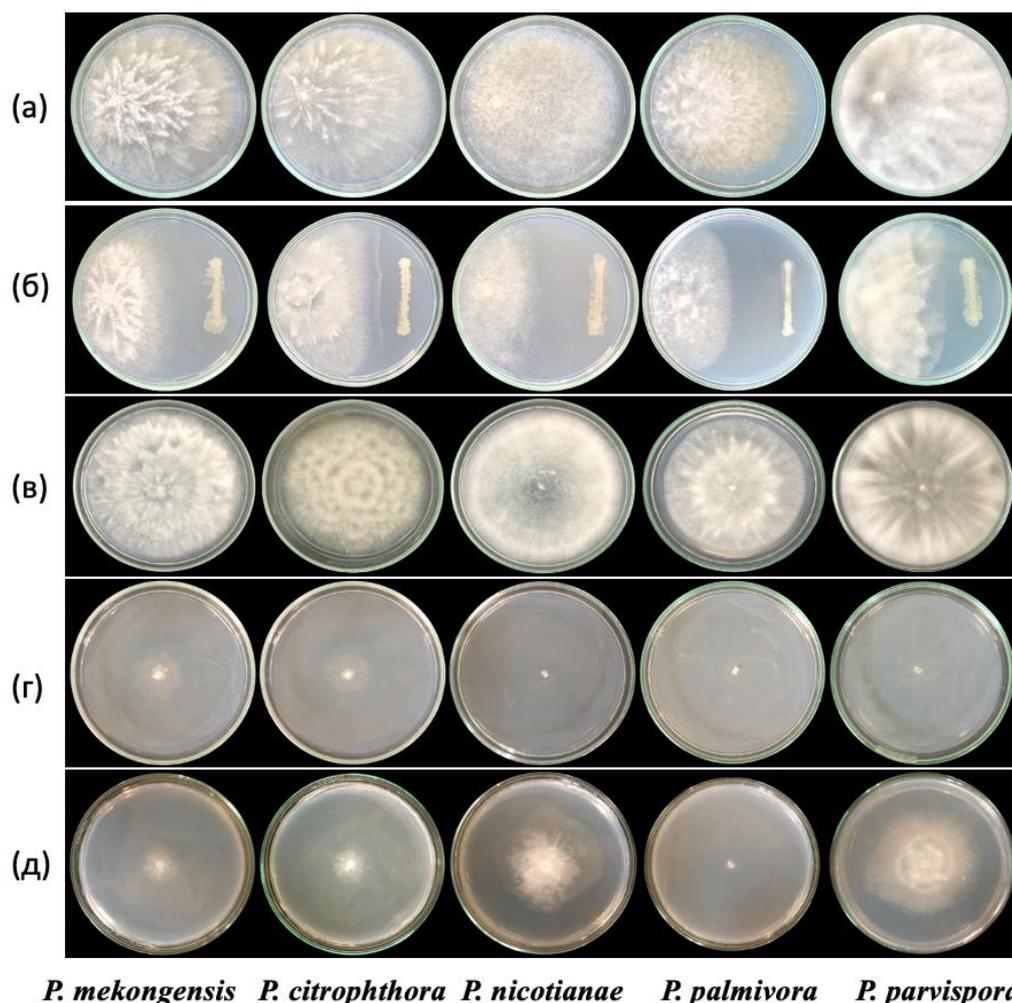


Рисунок 8. Оценка антагонистического потенциала бактериального изолята VN-K13 против пяти видов р. *Phytophthora*. (а) и (в) Контрольные условия; (б) Оценка антагонистической активности с помощью пластинчатой конфронтационной культуры; (г) Оценка антагонистической активности диско-диффузионным методом; (д) Обнаружение летучих органических соединений

Идентификация антагонистических бактерий: Идентичность четырех изолятов была подтверждена путем выравнивания конкатенированных последовательностей 16S рРНК, *gyrB* và *pyrE* с эталонными последовательностями родственных видов *Bacillus* из группы *B. pumilus* и проведения анализа максимального правдоподобия. Филогенетическое дерево группировало VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13 с экс-типовым штаммом (DMS 27) и другими эталонными штаммами *B. pumilus* со 100% поддержкой (рис. 9). В совокупности эти результаты подтвердили идентичность VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13 как *B. pumilus*.

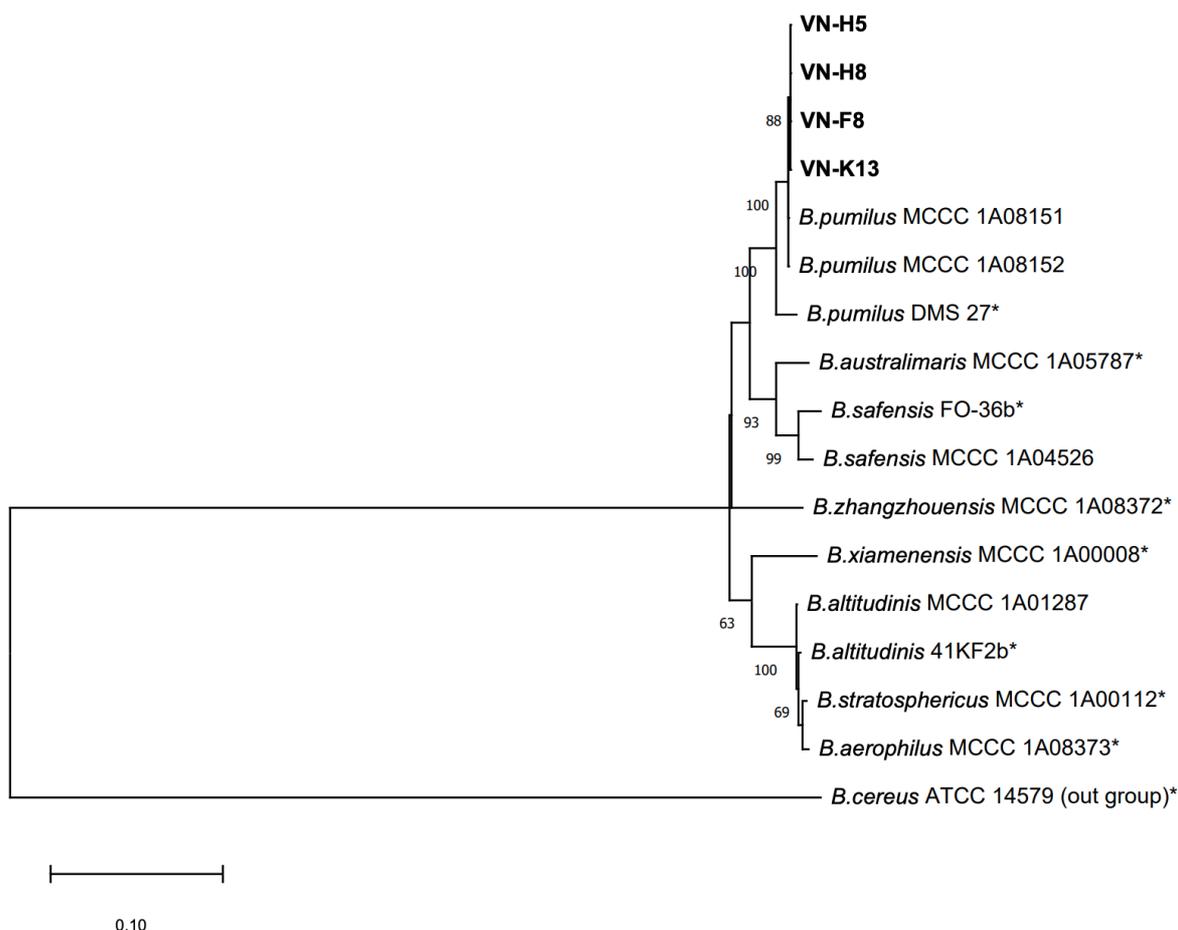


Рисунок 9. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия для 16 штаммов группы *Bacillus pumilus* на основе модели TN 93 + G + I с использованием конкатенированных последовательностей 16S рРНК, *gyrB* и *pyrE*

Результаты проведенных экспериментов значительно расширили наши представления о потенциальных механизмах антигрибной активности *B. pumilus*. Насколько нам известно, это первое исследование, посвященное биоконтролю на цитрусовых культурах с использованием антагонистической бактерии *B. pumilus*.

Способность *Bacillus pumilus* продуцировать ферменты. Результаты теста на обнаружение индол-3-уксусной кислоты (ИУК) показали, что после 24-часовой инкубации только штамм бактерий VN-K13 демонстрировал выработку ИУК. Кроме того, оба штамма VN-H5 и VN-K13 продемонстрировали способность вырабатывать аммиак (NH₃). Важно отметить, что все четыре штамма оказались способны продуцировать сидерофоры. В экспериментах по индукции ферментов только бактериальный изолят VN-K13 продемонстрировал способность продуцировать ферменты целлюлазы и хитиназы (рис.10).

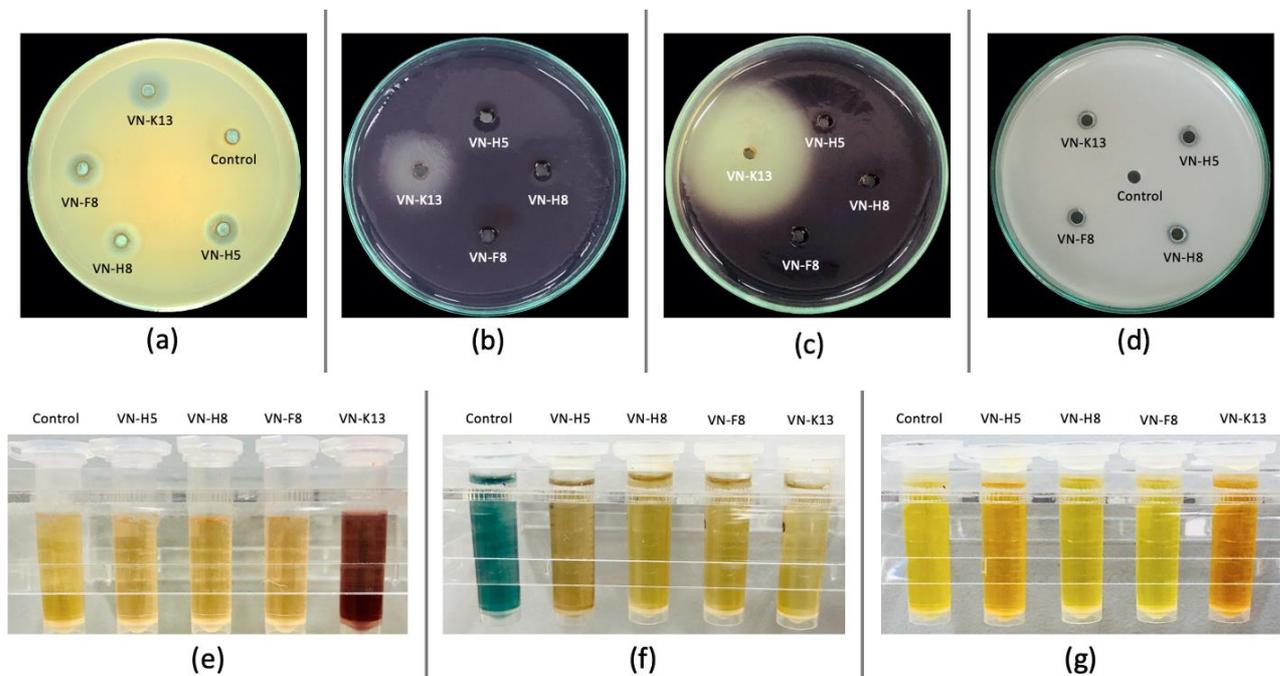


Рисунок 10. Биохимические характеристики изолятов *Bacillus pumilus*. Представленные характеристики включают: (а) фермент протеазы; (б) фермент хитиназы; (с) фермент целлюлазы; (д) фермент фосфатазы; (е) продукцию ауксина; (ф) продукцию сидерофоров; (г) продукцию аммиака

Все четыре бактериальных изолята VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13 демонстрировали выработку ферментов протеазы. Кроме того, они продуцировали фермент амилазу и продемонстрировали способность солюбилизировать фосфаты. Выделение пузырьков газа при добавлении перекиси водорода непосредственно к бактериальным образцам на предметном стекле подтвердило их способность продуцировать фермент каталазу. Ни один из этих изолятов не продуцировал ферменты β -1,3-глюканазы, цитрата, липазы или уреазы.

Bacillus pumilus имеет различные гены биосинтеза, кодирующие антигрибные соединения. Положительные амплификации были выявлены с помощью пары праймеров *basA*, связанной с производством бацилизина, у трех изолятов VN-H8, VN-F8 и VN-K13. Одновременно все четыре штамма показали положительные результаты ПЦР с парами праймеров *ituC* и *spaS*, коррелирующих с продукцией итурина и субтилина. Что касается пары праймеров *bmyB* для производства бацилломицина, то положительная амплификация наблюдалась только у двух изолятов, VN-H8 и VN-K13. Однако два других целевых гена, *fenD* и *srfAA*, связанные с продукцией фенгицина и сурфактина, не дали никаких продуктов ПЦР (рис. 11).

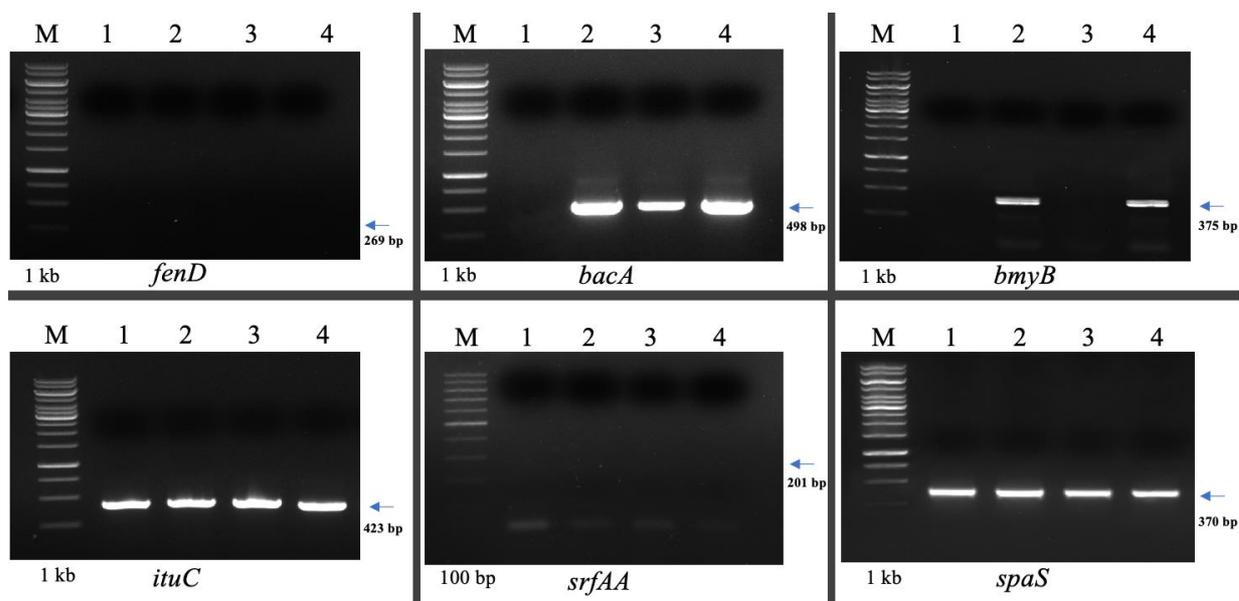


Рисунок 11. Наличие шести генов антимикробных пептидов было определено в соответствующих изолятах *Bacillus*. М: маркер 1 кб (*bmyB*, *fenD*, *ituC*, *bacA* и *spaS*). М: маркер 100 п.н. (*srfAA*); Линия 1: VN-H5. Линия 2: VN-H8. Линия 3: VN-F8. Линия 4: VN-K13

Влияние бактериального раствора *B. pumilus* на зооспоры *Phytophthora*:
 Применение бактериального раствора *Bacillus pumilus* (VN-K13) эффективно снижало заражение корней citrusовых деревьев спорами *Phytophthora* в тепличных условиях. Эти многообещающие результаты имеют важное значение и открывают путь к разработке стратегий биоконтроля для борьбы с болезнями и снижения потерь citrusовых культур (рис. 12).

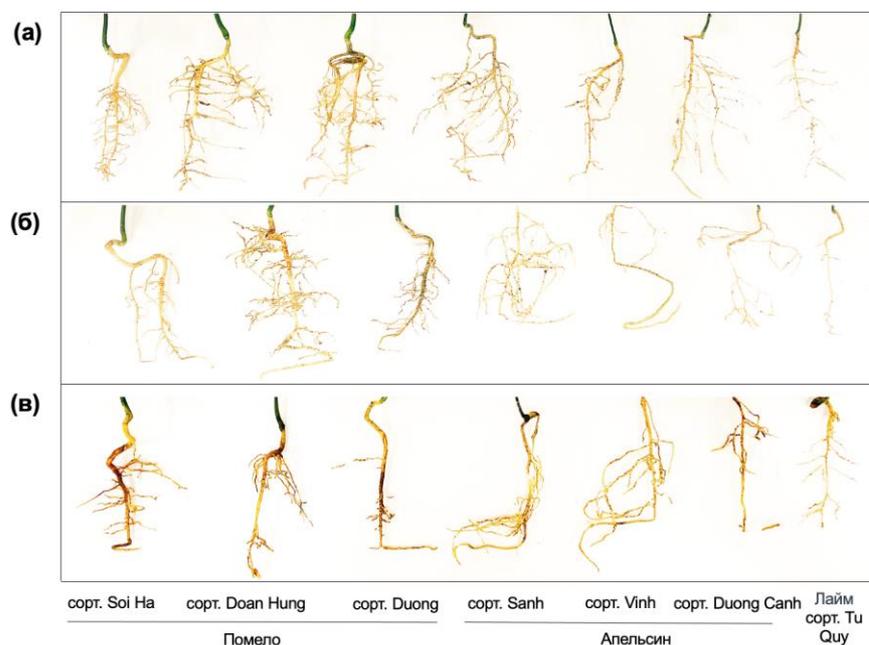


Рисунок 12. Ингибирующее действие раствора *B. pumilus* VN-K13 на зооспоры *P. parvispora* (VN-Oo10) на корнях citrusовых деревьев. (а) отрицательный контроль (не инокулированные); (б) совместная инокуляция раствором *B. pumilus* (VN-K13) и зооспорами *P. parvispora* (VN-Oo10) и (в) положительный контроль (инокулированные *P. parvispora*)

Биологический контроль *in vivo* *Phytophthora* sp. на апельсиновых деревьях (*C. sinensis*, сорт *Sanh*): в результате обработки *B. pumilus* VN-K13 наблюдалось снижение распространенности фитопфторозных корневых гнилей и улучшение выживаемости сеянцев апельсина (*C. sinensis*, сорт *Sanh*) в условиях теплицы (рис. 13). Кроме того, выделение индол-3-уксусной кислоты (ИУК) *B. pumilus* VN-K13, могло способствовать росту сеянцев апельсина, стимулируя увеличение размера и дифференциацию клеток, тем самым увеличивая рост и производство биомассы. В варианте, обработанном антагонистическими бактериями, длина и сухая масса корня сеянцев апельсина значительно превышали аналогичные показатели у инокулированной контрольной группы.



Рисунок 13. Реакция листьев и корней проростков апельсина на обработку изолятом *Phytophthora parvispora* VN-Oo10 и изолятом *Bacillus pumilus* VN-K13. (А) Слева направо: Контроль без инокуляции; инокуляция *P. parvispora* и *B. pumilus* VN-K13; инокуляция *P. parvispora* и (Б) корень, соответственно

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведенный в 2022 году мониторинг, оценил заболеваемость цитрусовых деревьев в четырех северных горных провинциях Вьетнама: Туен куанг, Ха Зянг, Фу Тхо и Йен баи. В ходе исследования было выявлено 11 вредоносных болезней, затрагивающих цитрусовые деревья, включая 8 грибных, 2 бактериальных и 1 заболевание неинфекционной природы. Анализ данных, полученных из 815 цитрусовых садов, выявил значительное количество случаев пожелтения листьев, гнили корней и гуммоза, затрагивающих более 40% садов. В регионах с низколежащими участками, предгорьями и плохо дренированными

почвами отмечалась повышенная восприимчивость цитрусовых культур к вспышкам заболеваний, что привело к увеличению уровня инфекции. Наивысшая степень распространения болезней, зафиксированная на уровне 19,5%, наблюдалась в Хам Йен провинции Туен Куанг.

2. Этиологические агенты, ответственные за такие симптомы как гуммоз, пожелтение листьев, гниль корней и плодов, выделенные из почвенной ризосферы и тканей цитрусовых деревьев, были подвергнуты как морфологическому анализу, так и молекулярной идентификации. Этот всесторонний анализ классифицировал их как виды рода *Phytophthora* и *Pythium*, среди которых были выявлены пять видов *Phytophthora* и четыре вида *Pythium*. Отмечено, что *P. parvispora* и *Pythium deliense* зафиксированы как новые патогены, связанные с болезнями цитрусовых деревьев во Вьетнаме, в то время как *P. mekongensis* впервые была идентифицирована в горных регионах Северного Вьетнама. Кроме того, *P. palmivora*, *P. nicotianae* и *P. citrophthora* были признаны распространенными патогенами, серьезно повреждающими цитрусовые деревья по всему Вьетнаму.

3. Была проведена оценка шести монокомпонентных фунгицидов для определения их эффективности против видов р. *Phytophthora in vitro*. Испытанные активные ингредиенты фунгицидов, а именно манкоцеб, хлорталонил, фосэтил алюминия, агрифос-400, металаксил и диметоморф, проявили ингибирующую активность против роста *Phytophthora sp.* Металаксил и диметоморф проявили наибольшую ингибирующую активность, за которой следовали хлорталонил и фосэтил алюминия. Агрифос-400 проявил наименьшую эффективность в ингибировании изолятов *Phytophthora*.

4. Четыре изолята бактерий *Bacillus pumilus*, а именно VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13, проявили замечательные ингибирующие эффекты против пяти видов р. *Phytophthora*, ассоциированных с болезнями цитрусовых культур. Изолят VN-K13 проявил наивысшую эффективность, с процентом ингибирования радиального роста (PIRG) в диапазоне от 53,13% до 68,31%. Это первые сведения о способности видов *Bacillus pumilus* ингибировать *Phytophthora* во Вьетнаме.

5. Все четыре изолята бактерий *B. pumilus*, VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13, обладают способностью производить сидерофорные соединения. Кроме того, два из этих штаммов, *B. pumilus* VN-H5 и *B. pumilus* VN-K13, могут вырабатывать аммиак (NH_3), а *B. pumilus* VN-K13 также способен производить индол-3-уксусную кислоту (ИУК), известную своей способностью стимулировать рост растений.

6. Штаммы бактерий, идентифицированные как *B. pumilus* VN-H5, *B. pumilus* VN-H8, *B. pumilus* VN-F8 и *B. pumilus* VN-K13, обладают способностью производить ферменты, такие как протеаза, фосфатаза и каталаза. Особенно следует отметить, что штамм *B. pumilus* VN-K13 дополнительно синтезирует ферменты хитиназу и целлюлазу, при этом целлюлаза является особенно важным ферментом среди антагонистических микроорганизмов для ингибирования патогенов, таких как *Phytophthora*.

7. Изоляты бактерий обладают способностью производить летучие органические соединения (ЛОС), которые эффективно подавляют рост изолятов *Phytophthora*, с наблюдаемыми зонами ингибирования в диапазоне от 30,28% до 90,72%.

8. Все четыре штамма бактерий *B. pumilus* VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13 несут гены биосинтеза антибиотиков, способные производить итурины и субтилины. Среди них штаммы VN-H8, VN-F8 и VN-K13 также содержат гены биосинтеза антибиотиков, ответственные за производство бацилизина. Ни один из штаммов бактерий не обладает генами биосинтеза антибиотиков для производства фенгицина и сурфактина.

9. В условиях защищенного грунта обработка *B. pumilus* VN-K13 привела к снижению заболеваемости фитопфторозной корневой гнилью и увеличению выживаемости апельсиновых деревьев (*C. sinensis*, сорт Sanh). Длина корней и сухая масса корней обработанных апельсиновых деревьев значительно превысили показатели контрольной группы. Это исследование демонстрирует эффективность *B. pumilus* VN-K13 в качестве надежного биологического агента против *Phytophthora spp.*, выделяя его как перспективный штамм для борьбы с фитопфторозом и стимулирования роста апельсиновых деревьев.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

База данных Scopus и Web of Science

1. **Quang V. T.,** Ha, C. V., Vvedensky, V. V., Han, V.-C. Current status and characterization of *Phytophthora* species associated with gummosis of citrus in Northern Vietnam. *Journal of Phytopathology*. 2023. **171** (9):478-88. doi: <https://doi.org/10.1111/jph.13204>
2. **Quang V. T.,** Ha, C. V., Vvedensky, V. V., Linh Le, T. T., Han, V.-C. Pathogenicity and fungicide sensitivity of *Phytophthora parvispora*, a new pathogen causing gummosis and root rot disease on citrus trees. *Microbial Pathogenesis*. 2023; **175**:105986. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.105986>
3. **Quang V. T.,** Ha, C. V., Vvedensky, V. V., Han, V.-C. Pathogenicity of *Pythium deliense* isolated from the rhizosphere soil of orange in Vietnam. *J. ISSAAS*. 2023. **29** (1): 90-101.

Перечень ВАК

1. **Куанг В. Ч.,** Пакина Е. Н., Кыонг В. Х. Biocontrol of phytophthora disease in citrus using *Bacillus pumilus* isolated from disease-suppressive citrus rhizosphere. *International agricultural journal*. 2024. **8** (3): 828-843.
2. **Куанг В. Ч.,** Пакина Е. Н., Кыонг В. Х. Identification of antimicrobial peptide biosynthetic genes of *Bacillus pumilus* in suppression of *Phytophthora spp.* *Dal'nevostochnyj agrarnyj vestnik*. 2024. **18** (2): 80–88.
3. **Куанг В. Ч.,** Пакина Е. Н., Кыонг В. Х. Assessment of antagonistic and plant growth promoting activities of *Bacillus pumilus* against *Phytophthora spp.* (*Reviewing the Manuscript*).

Публикации в международных, Всероссийских, региональных научно-практических конференциях, журналах и сборниках трудов

1. Куанг В. Ч. *Phytophthora mekongensis* associated with gummosis of lime in Northern Vietnam. *Время науки: актуальные вопросы, достижения и инновации*, 2024. 140-144.
2. Куанг В. Ч. Isolation and identification of pythium deliense from orange orchard in Tuyen Quang province, Viet Nam. *Молодежь и наука XXI века: актуальные теоретические*, 2024. 15. 15-17.

АННОТАЦИЯ
ИДЕНТИФИКАЦИЯ И БИОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ФИТОФТОРОЗА
ЦИТРУСОВЫХ КУЛЬТУР В ГОРНОЙ МЕСТНОСТИ
СЕВЕРНОГО ВЬЕТНАМА

В данной диссертации представлено комплексное исследование четырех северных горных провинций Вьетнама, в ходе которого было выявлено 11 болезней цитрусовых деревьев: 8 грибных, 2 бактериальных и 1 заболевание неинфекционной природы. Наиболее распространенными были пожелтение листьев, корневая гниль и гуммоз, которые поразили более 40 % из 815 обследованных садов. В низменных, плохо дренируемых районах заболеваемость была выше, а в Хам Йене в Туен Куанге она была самой высокой 19,5%. Морфологический и молекулярный анализы выявили виды *Phytophthora* и *Pythium* в качестве патогенов, причем *P. parvispora*, *Pythium Deliense* и *P. mekongensis* были обнаружены впервые. Испытания «in vitro» пяти фунгицидов показали, что металаксил и диметоморф наиболее эффективны против *Phytophthora*. Четыре изолята *Bacillus pumilus* значительно подавляли *Phytophthora*, причем *B. pumilus* VN-K13 показал самую высокую эффективность. Эти штаммы продуцировали сидерофоры, аммиак, индол-3-уксусную кислоту, а также ферменты, такие как хитиназа и целлюлаза. Их летучие органические соединения (ЛОС) также подавляли рост *Phytophthora*, и были идентифицированы гены для производства итурина, субтилина и бацилизина. Тепличные испытания *B. pumilus* VN-K13 уменьшили корневую гниль *Phytophthora* и улучшили параметры роста апельсиновых деревьев (*Citrus sinensis* cv. Sanh), продемонстрировав его потенциал в качестве эффективного агента биологического контроля.

ABSTRACT
IDENTIFICATION AND BIOLOGICAL CONTROL OF PHYTOPHTHORA
ON CITRUS SPECIES IN THE UPLAND REGION
OF NORTHERN VIETNAM

This dissertation presents a comprehensive survey across four northern mountainous provinces of Vietnam, identifying 11 citrus tree diseases: 8 fungal, 2 bacterial, and 1 physiological disorder. Leaf yellowing, root rot, and gummosis were the most prevalent, affecting over 40% of the 815 orchards surveyed. Low-lying, poorly drained areas showed higher disease incidence, with Ham Yen in Tuyen Quang having the highest prevalence at 19.5%. Morphological and molecular analyses

identified *Phytophthora* and *Pythium* species as pathogens, with *P. parvispora*, *Pythium deliense*, and *P. mekongensis* being newly reported. In vitro tests of five oomycota fungicides found metalaxyl and dimethomorph most effective against *Phytophthora*. Four *Bacillus pumilus* isolates significantly inhibited *Phytophthora*, with *B. pumilus* VN-K13 showing the highest efficacy. These strains produced siderophores, ammonia, indole-3-acetic acid, and enzymes such as chitinase and cellulase. Their volatile organic compounds (VOCs) also suppressed *Phytophthora* growth, and genes for iturin, subtilin, and bacylisin production were identified. Greenhouse trials with *B. pumilus* VN-K13 reduced *Phytophthora* root rot and improved growth parameters of Orange (*Citrus sinensis* cv. Sanh) trees, demonstrating its potential as an effective biological control agent.