

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы»

На правах рукописи

ЧАН ВАН КУАНГ

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

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

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук

Научный руководитель:

Пакина Елена Николаевна,

доктор сельскохозяйственных наук,

доцент

г. Москва 2024 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Цитрусовые культуры.....	10
1.2. Род <i>Phytophthora</i>	11
1.3. Способы распространения <i>Phytophthora spp.</i>	13
1.4. Эпидемиология	13
1.5. Симптоматика.....	14
1.6. Меры борьбы	16
1.7. Бактерии рода <i>Bacillus</i> в биологическом контроле болезней цитрусовых культур	21
1.7.1. Обзор рода <i>Bacillus</i>	21
1.7.2. Механизмы действия	23
1.7.3. Антимикробные вещества.....	23
1.7.4. Конкуренция за питательные вещества и пространство	24
1.7.5. Индуцированная устойчивость	25
1.8. Потенциал <i>Bacillus pumilus</i> в биоконтроле грибных фитопатогенов	25
1.8.1. Формирование биопленки <i>Bacillus pumilus</i>	25
1.8.2. <i>Bacillus pumilus</i> и индуцированная системная устойчивость (ИСУ)	26
1.8.3. Липопептиды, синтезируемые <i>Bacillus pumilus</i>	26
1.8.4. Гидролитические ферменты, продуцируемые <i>Bacillus pumilus</i>	27
1.8.5. Летучие органические соединения, продуцируемые <i>Bacillus pumilus</i>	28
1.8.6. Потенциал <i>Bacillus pumilus</i> для стимулирования роста растений.....	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	30
2.1. Материалы исследований.....	30
2.2. Методы проведения исследований.....	32
2.2.1. Исследование и сбор пораженных образцов с цитрусовых деревьев	32
2.2.2. Выделение <i>Oomycetes</i>	33
2.2.3. Морфологические исследования.....	33

2.2.4. Молекулярная идентификация видов <i>Oomycetes</i>	34
2.2.5. Тестирование патогенности.....	35
2.2.6. Чувствительность фитофторы к фунгицидам <i>in vitro</i>	36
2.2.7. Изоляты бактерий и условия культивирования.....	37
2.2.8. Определение антагонистической активности с помощью пластинчатой конфронтационной культуры	38
2.2.9. Определение антагонистической активности диско - диффузионным методом ..	38
2.2.10. Антимикробный тест бактериальных ЛОС.....	39
2.2.11. Производство ферментов	39
2.2.12. Производство вторичных метаболитов	40
2.2.13. Экстракция, очистка ДНК, ПЦР и филогенетический анализ бактерий	41
2.2.14. Влияние бактериального раствора <i>B.pumilus</i> на зооспоры <i>Phytophthora spp.</i>	43
2.2.15. Биологический контроль на citrusовых растениях	43
2.2.16. Статистический анализ	44
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
3.1. Анализ производства citrusовых деревьев в горных провинциях северного Вьетнама	45
3.1.1. Состояние современного производства.....	45
3.1.2. Состав заболеваний, влияющих на citrusовые деревья.....	47
3.1.3. Оценка распространенности <i>Phytophthora spp.</i> , в основных регионах выращивания citrusовых.....	49
3.2. Сбор образцов оомицетов.....	51
3.3. Характеристика <i>Phytophthora spp.</i> , связанной с гуммозом citrusовых в Северном Вьетнаме.	53
3.3.1. Морфологический анализ	53
3.3.2. Идентификация изолятов <i>Phytophthora</i>	57
3.3.3. Испытание патогенности изолятов <i>Phytophthora</i>	62
3.3.4. Чувствительность <i>Phytophthora spp</i> к фунгицидам.....	66

3.4. Первое сообщение о наличии <i>Pythium deliense</i> , ассоциированном с гуммозом во Вьетнаме	69
3.4.1. Изоляция и идентификация изолятов <i>Pythium spp.</i>	70
3.5. Различные бактерии ризосферы с ингибирующей активностью против роста <i>Phytophthora spp.</i>	76
3.5.1. Идентификация антагонистических бактерий.....	79
3.5.2. Ферменты, продуцируемые <i>Bacillus pumilus</i>	82
3.5.3. Гены биосинтеза <i>Bacillus pumilus</i> , кодирующие противогрибные соединения.....	86
3.6. Влияние бактериального раствора <i>Bacillus pumilus</i> на зооспоры <i>Phytophthora</i> ...	90
3.7. Биологическая борьба «in vivo» с <i>Phytophthora spp.</i> на апельсиновых деревьях (<i>C. sinensis</i> , сорт Sanh)	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	101
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	125

ВВЕДЕНИЕ

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 [181]. 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 [167]. Однако одним из основных препятствий для выращивания цитрусовых является фитофтороз, приводящий к гибели растений и значительной потере урожая [42]. *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 [208, 209]. 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 [161]. 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 [37, 42, 168]. Однако многие виды фитофтороза остаются неидентифицированными [38]. 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 [213, 214].

Объекты исследования 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*, *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora 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 Б.

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

Достоверность результатов исследований подтверждается значительным объемом полученных автором экспериментальных данных, полученных в лабораторных, тепличных и полевых условиях с применением микробиологического анализа, а также молекулярно-генетических методов исследований, подтвержденных современным статистическим анализом с использованием международной системы обработки данных, а также публикациями основных результатов диссертации.

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.

Благодарность. Это исследование стало возможным благодаря непрерывной поддержке, руководству и труду моих научных руководителей (профессор Пакина Елена Николаевна, доцент В.В. Валентинович и доцент Ха Вьет Куонг), и я чувствую, что многое узнал у них. Я благодарен своим родителям (Чан Ван Зы и покойной Ле Тхи Минь), моей жене (Буй Тхи Хоа) и моим друзьям, которые всегда поддерживали меня. Я благодарен всем сотрудникам и аспирантам РУДН и ВНУА, которые нашли время помочь мне организовать мою научную работу. В РУДН много замечательных людей. Мое время в РУДН было замечательным опытом. Кроме улучшения моих навыков и знаний в области науки, мне предоставилась возможность встретиться и подружиться с людьми со всего мира. У каждого человека, которого я встретил, я научился чему-то новому, что теперь формирует меня как личность и дает мне другую перспективу в жизни. Еще раз спасибо!

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Цитрусовые культуры

Цитрусовые культуры входят в топ-10 экономически важных культур по общемировому урожаю плодов и занимают первое место в международной торговле плодами по стоимости. Хотя цитрусовые являются родными для Восточной Азии, в настоящее время они выращиваются по всему миру, особенно в тропических, субтропических и средиземноморских климатических регионах на более чем 10 миллионах гектаров земли [181]. Цитрусовые являются одной из наиболее экономически важных фруктовых культур во Вьетнаме. В настоящее время площадь и производство цитрусовых во Вьетнаме составляют 140.841 га и 1.983.299 тонн соответственно [66].

Цитрус является крупнейшим родом в семействе Рутовые. Род *Citrus* состоит из нескольких видов, и каждый вид имеет множество сортов. Таксономическая идентификация очень сложна, и точное количество видов до сих пор неизвестно, потому что есть множество естественных и коммерческих гибридов. По системе Свингла было признано 16 видов, а система Танака определяет 156 видов в этом роде. Цитрусовые плоды можно обычно классифицировать следующим образом: сладкие апельсины (*Citrus sinensis*), мандарины (например, сатсума (*C. unshi*), мандарины (*C. tangerina*), *C. reticulata* и клементины (*C. clementina*)), горькие апельсины (например, Севильский (*C. aurantium*)), лимоны (*C. limon*), лаймы (*C. aurantifolia* и *C. latifolia*), грейпфрут (*C. paradisi*) и померанец (*C. grandis*), гибриды (например, танжелос, тангоры и лаймкуаты).

Цитрус является вечнозелёным культурным растением, требующим плодородной почвы с быстрым дренажем, состоящей из песчано-иловатых пород с pH в диапазоне 6-7. Цитрусовые деревья очень чувствительны к температурным изменениям и требуют теплой температуры 20°C ночью и 35°C днем для правильного роста и созревания плодов. Изобилие солнечного света 6-7 часов в день необходимо для их наилучшей продуктивности. Цитрусовые деревья не

нуждаются в высокой влажности, особенно во время цветения, и избыточная влага вредна для их роста. Одним из основных ограничений для производства цитрусов является болезнь, приводящая к гибели растений и значительной потере урожая [42]. Во Вьетнаме корневая гниль, базальный стебель, гуммоз и коричневая гниль фруктов являются распространенными и разрушительными заболеваниями цитрусовых, особенно апельсинов и помело. Виды *Phytophthora* считаются одной из наиболее важных групп патогенов, вызывающих тяжелые симптомы, включая гуммоз, корневую и стебельную гниль, хлороз листьев, опадение листьев, отмирание побегов и слабый рост [30, 108]. Гуммоз является распространенным заболеванием цитрусовых по всему миру и ежегодно приводит к потерям урожая от 10% до 30% [199].

1.2. Род *Phytophthora*

Виды рода *Phytophthora* - это оомицетные патогены растений, которые вместе поражают широкий спектр растений [64, 102, 235] и оказывают значительное экономическое, экологическое и социальное воздействие [51]. Оомицеты морфологически похожи на грибы с нитевидными гифами, но классифицируются как страменопилы, группа, которая также включает диатомовые водоросли и коричневые водоросли [46]. Оомицеты включают в себя множество родов, кроме *Phytophthora*, в том числе многочисленные виды рода *Pythium*, которые вызывают гнили семян, сеянцев, корней и плодов, а также широкое разнообразие облигатных биотрофов, которые вызывают настоящую мучнистую росу.

Впервые уничтожение растений цитруса из-за видов *Phytophthora* было зафиксировано в 1836 году на острове Азоры. Позже, в 1876 году, Антон де Бари впервые использовал термин *Phytophthora* (что означает «Растительный разрушитель» на греческом), описывая вид *Phytophthora infestans* как возбудителя болезни поздней мучнистой росы картофеля. Эти виды характеризуются образованием устойчивых спорангиев, а их инфекция происходит через выход бифлагеллярных зооспор в почву или поверхностные воды, которые затем привлекаются химическими или электрическими сигналами, генерируемыми

растительным хозяином [17]. Многие факторы окружающей среды были определены, как влияющие на развитие заболевания *Phytophthora spp*, включая климатические, химические, физические и биологические условия, которые могут взаимодействовать друг с другом и в итоге вызывать развитие болезни [196]. На ландшафтном уровне влажность и скорость ветра, геоморфологические и топографические особенности, содержание глины в почве и передвижение животных и людей - все эти факторы связаны с эпидемиологией *Phytophthora spp*. [27, 130, 194].

К 1996 году было описано только 54 вида р. *Phytophthora*, в основном на основе их морфологических характеристик [64]. В последнее время с развитием молекулярно-генетических методов исследования число идентифицированных видов рода *Phytophthora* быстро увеличилось, и их идентификация и классификация стали более точными [20, 41, 114, 175]. Инспекционная служба по здоровью животных и растений Управления сельского хозяйства США (анг. *The Animal and Plant Health Inspection Service of the United State Department of Agriculture, USDA APHIS*) разработала веб-инструмент (IDphy на <https://idtools.org/id/phytophthora/index.php>) для точной идентификации видов рода *Phytophthora* на основе типовых образцов 161 вида.

С 2000 года число описанных видов быстро увеличивалось. Это было частично связано с комбинацией классических и молекулярных методов, а также с обнаружением многих новых видов во время специальных исследований в лесах и природных экосистемах, особенно в отдаленных регионах с низкой доступностью.

Существует более 180 известных видов р. *Phytophthora*, филогенетически объединенных в 12 или более клад и дополнительно разделенных на многочисленные подклады [23, 224]. В мире может остаться еще 200-400 видов, которые еще не были обнаружены в неисследованных лесах и иных природных экосистемах [6].

1.3. Способы распространения *Phytophthora spp.*

Основным способом распространения *Phytophthora spp.* в citrusовых садах является использование инфицированного садового материала [151]. Некоторые патогены могут присутствовать в почве или зараженных корнях, даже если симптомы болезни не проявляются явно. Численность патогенов резко снижается при высушивании почвы, что снижает вероятность распространения. Иригационная вода также может служить источником передачи патогена из одной области в другую. Более серьезные проблемы могут возникнуть в орошаемых citrusовых регионах, где сточные воды переносят патоген в каналы или пруды. Использование воды из этих источников может затем загрязнять ранее незараженные области. Ветер не является основным фактором для распространения *Phytophthora spp.*

Дождь с ветром способствует распространению спорангиев, образующихся на поверхности надземных частей растений. Экологические факторы также играют важную роль в развитии болезни, степени ее тяжести, распространении и выживаемости *Phytophthora spp.*, и в конечном итоге в возникновении эпифитотии [31, 76]. Измерения показали пятикратное увеличение подвижности зооспор *P. citrophthora* при температуре 24°C по сравнению с 30°C, что соответственно препятствует или способствует колонизации. Для зооспор *P. parasitica* было обнаружено увеличение подвижности в 11 раз при благоприятной температуре по сравнению с ингибирующими почвенными температурами 30 и 36°C соответственно [134].

1.4. Эпидемиология

Phytophthora обитает в почве и является оомицетом, любящим влажность. Она выживает в почве благодаря небольшим, толстостенным спорам (хламидоспорам) и ооспорам, которые могут переносить сухие летние условия. Хламидоспоры развиваются при прохладной и сухой погоде с ограниченной влажностью почвы, плохой аэрацией почвы с высокой концентрацией CO₂. При благоприятных условиях высокой влажности и температуры инфицированные корни производят спорангии, которые в свою очередь высвобождают подвижные

зооспоры. Зооспоры привлекаются к зоне роста новых корней за счет питательных веществ в экссудатах. После контакта с корнем зооспоры образуют кисты, прорастают, а затем инфицируют область удлинения корней [57]. Как только оомицет попадает в кончик корня, инфекция может продвигаться в коре, что приводит к гниению всего корешка. Этот цикл может повторяться, пока условия остаются благоприятными и имеется восприимчивая ткань (рис. 1).

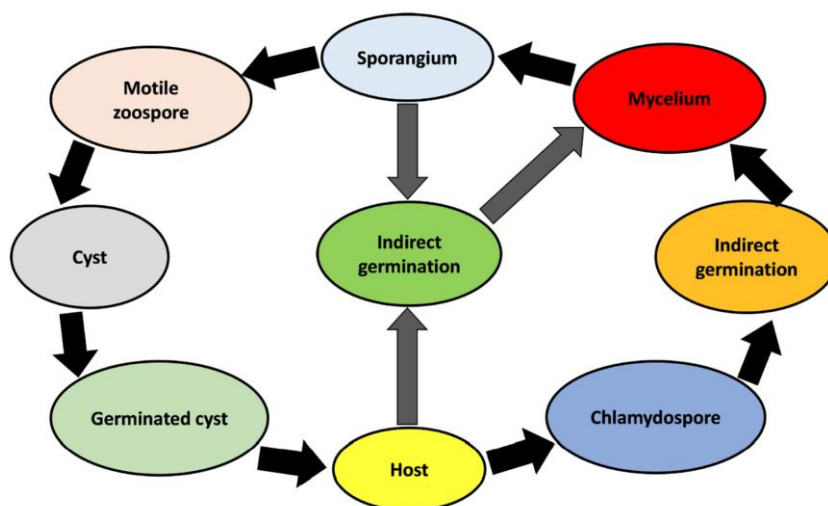


Рисунок 1. Жизненный цикл видов р. *Phytophthora*

1.5. Симптоматика

Phytophthora spp., вероятно, выживает в неблагоприятные периоды в корневых остатках. Гниющий кортекс отмирает и оомицет производит хламидоспоры, которые могут сохраняться в почве длительный период. Когда наступают благоприятные условия, хламидоспоры косвенно прорастают и производят спорангии и зооспоры или прямо образуют мицелий. Когда присутствуют оба типа спаривания, могут быть также образованы ооспоры, которые способствуют выживанию гриба. Рана и влага на стволе или вокруг основания ствола необходимы для заражения. Раны подвержены инфекции в течение 14 дней. При благоприятных условиях плоды и молодые листья могут быть заражены пропадагулами, разбрызганными из почвы. Вторичные инфекции могут быть вызваны инокуляцией из надземных частей растения, которая распространяется дождевыми каплями или дождевым ветром. Это редко происходит с *P. parasitica*, которая не легко производит воздушные спорангии, но

более распространена у *P. citrophthora* и у других видов, которые производят обильные спорангии на поверхности плодов и листьев. Коричневая гниль наиболее распространена в районах, где присутствуют эти виды, особенно при продолжительных зимних дождях [151, 202].

Виды р. *Phytophthora* колонизируют почву, поражая все органы растения и вызывая значительные экономические риски на протяжении всего вегетативного цикла. Потери урожая на плантациях главным образом связаны с корневой гнилью, гуммозом ствола и коричневой гнилью плодов (рис. 2). Инфекция коры обычно происходит возле уровня почвы и проявляется на кроне или стволе в виде поражений, охватывающих дерево по окружности и распространяющихся на вторичные ветви, вызывая отмирание деревьев [180].



Рисунок 2. Симптоматика гуммоза, корневой гнили и гнили плодов на цитрусовых деревьях

Зараженная кора имеет маленькие трещины, из которых выделяется обильная экссудация смолы. Симптомы гуммоза исчезают после сильных дождей, но сохраняются в сухих условиях. Они медленно разрушаются вокруг периметра ствола и часто сопровождаются симптомами на листьях (бледный цвет, желтизна жилок). Саженьцы и молодые деревья в питомниках, имеющие небольшой диаметр ствола, быстро отмирают, в то время как старые деревья более толерантны [198]. Коровая гниль корней обычно менее распространена, чем гуммоз ствола и корней, но более сложна в определении, так как любой фактор, препятствующий развитию корней, может вызвать идентичные симптомы. При серьезной инфекции кора разрушается, оставляя только белую структуру в виде волокон. На

этом этапе регенеративная способность корней больше не может удерживаться на нужном уровне, а дерево не способно обеспечить достаточное поглощение воды и питательных веществ. В надземной части эти эффекты приводят к опадению листьев, отмиранию веток, снижению роста и плодоношения [198].

На поле плоды на нижней части дерева могут быть заражены спорами *Phytophthora spp.*. Сначала эти плоды показывают небольшое изменение цвета кожицы, затем расширение некроза, который в зависимости от сорта, принимает различные оттенки коричневого цвета. Затронутая область расширяется, а ткани размягчаются. При влажных условиях на поверхности фрукта может расти белый мицелий *Phytophthora spp.*. Затем болезнь распространяется на другие плоды дерева, если температура (24–28°C) и влажность благоприятны [198].

Хотя большинство зараженных плодов падает с дерева до сбора урожая, некоторые выглядят здоровыми и проявляют симптомы только через несколько дней хранения, что приводит к значительным послеуборочным потерям. Бурая гниль быстро распространяется на другие плоды в контейнере, и появляется очень характерный запах, вызванный разложением эфирных масел, выделяемых патогеном [180]. Листья редко становятся мишенью для патогена по сравнению с плодами. Однако при благоприятных климатических условиях на листьях могут появляться полупрозрачные пятна, похожие на симптомы заморозков. Со временем эти пятна становятся водянистыми и чернеют. Листья рано опадают, оставаясь зелеными (но с черными пятнами). На нижних ветвях может произойти полная дефолиация [117]. Известно, что лимоны особенно чувствительны к поражению листьев и плодов [77].

1.6. Меры борьбы

Химический контроль

Химические пестициды, от фунгицидов до альгицидов, использовались для борьбы с оомицетами с разной степенью успеха [239]. Эффективность химических препаратов зависит от их механизма действия, стойкости и биологии патогена-мишени. В частности, химическая борьба с почвообитающими патогенами ограничивается использованием системных фунгицидов, которые

поглощаются растением [176, 241, 243]. Профилактические фунгициды, такие как фосетил, фосфорная кислота, металаксил и манкозеп, широко используются для снижения инокуляции *Phytophthora spp.* ниже порога вредносоности, пока деревья не станут достаточно большими, чтобы противостоять патогену [38, 135] но они дороги и представляют значительные проблемы для здоровья человека и окружающей среды.

Интегрированная защита

Интегрированный контроль считается эффективным и более безопасным для окружающей среды и включает в себя объединение нескольких соответствующих методов контроля с целью поддержания экологического баланса, создания неблагоприятных условий окружающей среды для развития болезни, а также повышения устойчивости цитрусовых растений. Интегрированная защита от фитофтороза цитрусовых предполагает минимальное применение фунгицидов с совершенствованием технологии выращивания культур [236].

Устойчивость цитрусовых культур к фитофторозу

Заболеваемость корневой гнилью и гуммозом ствола в полевых условиях можно снизить с помощью таких агротехнических приемов, как ежегодное обследование корней и удаление мертвых или зараженных деревьев, прививка на максимальной высоте, избегание травм ствола и применение методов полива, которые сводят к минимуму контакт ствола с водой. Однако, поскольку болезни, вызванные *Phytophthora spp.* передаются в основном через почву, использование устойчивых подвоев остается наиболее эффективным и долгосрочным методом профилактики. Устойчивость в основном встречается у сортов *P. trifoliata*, *C. medica*, *C. macrophylla*, *C. jambhiri*, *C. grandis* и *C. macroptera*, представляя собой полезные генетические ресурсы для программ селекции цитрусовых [90]. На наиболее устойчивых подвоях скорость регенерации корней превышает способность патогена поражать ткани корней, что компенсирует нанесенный ущерб. С другой стороны, за исключением некоторых незначительных различий

между апельсинами и лимонами, все виды цитрусовых подвержены бурой гнили плодов как в поле, так и во время послеуборочного хранения.

Устойчивость к фитофторе является общей целью программ селекции цитрусовых во всем мире. Первые программы гибридизации начались в конце XIX века в ответ на разрушительные эпидемии фитофтороза [39].

Соляризация почвы

Борьба с корневой гнилью и основанием стеблей цитрусовых с помощью соляризации не нашла широкого применения во Вьетнаме. Соляризация почвы обычно эффективна для борьбы с чувствительными к высоким температурам типами патогенов, включая различные грибы, вызывающие увядание растений, такие как *Verticillium sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium sp.*, *Pythium spp.*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora sp.*, нематоды (*Pratylenchus* и *Xiphinema*), а также некоторые бактерии, такие как *Agrobacterium*, *Clavibacter sp.* и *Streptomyces* [112, 187]. Борьба с помощью соляризации почвы, которая является потенциальным методом борьбы, рекомендуется в местах с сильным затоплением, почвой, зараженной грибом р. *Phytophthora*, и загрязненной водой. Этот метод не наносит вреда окружающей среде, поскольку манипулирует средой вокруг корней с помощью соляризации почвы. Соляризация почвы - это процесс нагревания почвы с использованием энергии солнечного света для дезинфекции почвы, в результате чего патогенные микроорганизмы в почве ослабевают, и болезни растений не развиваются. Соляризация реализуется в виде мульчирования почвы прозрачным полиэтиленом. Пластиковая мульча может повышать температуру до 35-60 °C, особенно в поверхностных слоях почвы.

Применение компоста с куриным пометом и органической мульчей

Применение мульчи и органических удобрений особенно необходимо на почвах, испытывающих недостаток воды, или в сухой сезон. Помимо повышения микробной активности почвы, они способствуют развитию грибов-антагонистов [211]. При использовании навоза важно следить за тем, чтобы не применять еще не перепревший навоз, так как он может повредить корни. Не рекомендуется вносить азотные удобрения, так как они могут усилить распространение болезней.

Мульча стимулирует рост корней растений, увеличивает поглощение питательных веществ, уменьшает испарение из почвы, повышает способность удерживать грунтовые воды, уменьшает поверхностный сток, облегчает дренаж, регулирует температуру почвы и обеспечивает высокий уровень питательных веществ для почвенных микробов [15].

Компост с навозом может усиливать или подавлять болезнь, в зависимости от ее природы. Фитофтору подавляют люцерновая мука, пшеничная солома, куриный помет и мочеви́на. Аммиак и летучие органические кислоты, выделяемые при разложении органических веществ, убивают фитофтору, а остатки органических веществ стимулируют конкурентоспособность и развитие антагонистических микроорганизмов в почве [118]. Любой компост увеличивает органическое вещество почвы, общую биологическую активность и популяции антагонистических микроорганизмов. Добавление компоста необходимо для развития болезней, но недостаточно для биологического контроля. Мульча также может уменьшить развитие корневых гнилей при фитофторозе, если ее использовать с момента первоначальной подготовки сада или если болезнь находится на начальном этапе развития.

Фитосанитарные мероприятия

Эффективность стратегий контроля зависит от способности отдельного вида *Phytophthora* выживать, как в виде мицелия, так и в виде покоящихся спор. Обычно мицелий и зооспоры выживают только несколько недель, в то время как хламидоспоры могут выживать до 6 лет, а ооспоры до 13 лет [52]. Зараженные или мертвые семена, растения и плоды должны быть полностью уничтожены путем сжигания. Части кожуры, которые заражены, должны быть удалены не менее чем на 1 см, а рубцы обработаны фунгицидом. Дезинфицировать сельскохозяйственный инвентарь рекомендуется с помощью 70% спирта или 10% гипохлорита натрия.

Биологический контроль

Биологический контроль - это альтернативная стратегия борьбы с болезнями растений [234, 244], он относится к экологически чистым, недорогим

и устойчивым методом защиты растений [233, 237, 240]. Этот метод, использующий антагонистов, считается одной из наиболее перспективных альтернатив химическому контролю [1, 95, 238]. Многие агенты биоконтроля, такие как дрожжи и бактерии, были изучены и использованы для эффективного подавления послеуборочных болезней фруктов [96]. В цитрусовой промышленности такие микроорганизмы, как *Paenibacillus brasilensis*, *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola*, *Streptomyces* spp. и *Bacillus subtilis*, в настоящее время признаны в качестве важных инструментов для биологической борьбы с болезнями цитрусовых [62, 110, 113]. Бактерии рода *Bacillus* являются естественными обитателями ризосферы и филлосферы и считаются благоприятными для экологической среды [12, 144].

Виды *Bacillus* могут формировать эндоспores и производить различные ценные метаболиты, такие как антибиотики, ферменты, витамины и вторичные метаболиты, которые являются антимикробными или способствуют росту растений. Гомологичное выравнивание на основе обнаружения множества локусов, таких как последовательности 16S rRNA и частичных генов гиразы (*gyrA*), показывает, что виды *Bacillus* имеют высокую идентичность, и многие виды р. *Bacillus* известны как антагонисты [35]. Виды р. *Bacillus* рассматриваются в качестве кандидатов или разрабатываются как биологические агенты для контроля болезней растений [35, 82], они были широко исследованы и описаны на цитрусовых культурах. Например, *B. subtilis* и его метаболиты были использованы для борьбы с грибными заболеваниями цитрусовых, такими как зеленая и синяя плесень, и эти биоконтрольные агенты классифицируются как GRAS (англ. *generally regarded as safe*) [215]. *B. amyloliquefaciens* DH4 также проявляет значительную антигрибковую активность против патогенов цитрусовых после сбора урожая, таких как *Penicillium digitatum* и *P. italicum* [33]. В целом, виды р. *Bacillus* могут использоваться для борьбы с болезнями цитрусовых как до, так и после сбора урожая [24, 191].

1.7. Бактерии рода *Bacillus* в биологическом контроле болезней цитрусовых культур

1.7.1. Обзор рода *Bacillus*

Род *Bacillus* был идентифицирован Коном в 1872 году, изначально включал в себя два видных эндоспорообразующими вида: *Bacillus anthracis* и *B. subtilis*. С тех пор, этот род претерпел значительные таксономические изменения. К началу 1900-х годов таксономисты не ограничивали род только эндоспорообразующими бактериями, что привело к тому, что количество видов, отнесенных к этому роду, составило 146 в 5-м издании "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology". В последующих сравнительных исследованиях Smith *et al.* и Gordon *et al.* на 1114 штаммов аэробных бактерий, образующих эндоспоры, было установлено, что в роде *Bacillus* существует только 22 четко определенных вида, что было отражено в 8-м издании "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" [69]. Бактерии семейства *Bacillaceae* относятся к порядку *Bacillales* внутри рода *Bacillus*. Этот род характеризуется формой палочки в группе грамположительных бактерий [171] и классифицируется как строгие аэробы или факультативные анаэробы и включает в себя 88 видов [69]. Одной из особенностей этого рода является то, что он формирует тип клетки, называемой эндоспорой, в ответ на неблагоприятные условия роста, что меняет структуру клетки. Эта форма спор устойчива к высоким температурам и химическим дезинфектантам [40]. Этот род широко представлен в различных экологических нишах, включая почву, воду и воздух [125, 227], они также встречаются в качестве загрязнителей пищевых продуктов. В целом, бактерии рода *Bacillus*, используемые в биоконтроле, являются подвижными, с перитрихальными жгутиками, но некоторые виды представляют интерес в медицине человека (*B. anthracis*) и характеризуются как неподвижные [53].

Что касается различных биологических методов, микробные антагонисты являются предпочтительными и обладают многообещающей способностью контролировать заболевания плодов [4, 158, 186, 245]. Многие известные виды *Bacillus* были использованы в разработке биологического контроля, включая *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* и *B. pumilus*.

Виды *Bacillus* использовались для контроля болезней растений, вызванных различными патогенами, такими как *Xanthomonas oryzae*, *Fusarium spp.*, *C. gloeosporioides* и *Rhizoctonia solani* [28, 88, 144, 188, 203].

Было проведено множество исследований, сообщающих о биоконтрольных свойствах видов *Bacillus* против различных болезней цитрусовых. Ранее была выявлена значительная антигрибная активность *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus* и *B. megaterium* против *P. digitatum* на лимонных плодах, и показано, что они подавляют рост мицелия и прорастание спор [143]. Как споры *B. subtilis*, так и их культуральный супернатант (содержащий антифунгальные метаболиты) проявляли сильную антагонистическую активность против *P. digitatum* [215]. Кроме того, *B. subtilis* обладает сильной способностью ингибировать бактериальные болезни цитрусовых. Поскольку *B. subtilis* является агентом широкого спектра антибактериального действия, он был отмечен как замечательный антагонист против патогенов *X. citri* (G), *X. oryzae* (LKF), *P. syringae* (JB), *Erwinia sp.* (HBYL), *E. carotovora* (B2) и *R. solanacearum* (WL). Группа *B. subtilis*, группа видов *Bacillus*, включающая *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. atrophaeus*, *B. pumilus* и *B. amyloliquefaciens*, проявляет антагонистическую активность против патогена бактериальной язвы цитрусовых *X. axonopodis* [88]. Штаммы *B. subtilis* LE24, *B. amyloliquefaciens* LE109 и *B. tequilensis* PO80 также ингибировали патогена бактериальной язвы цитрусовых *X. citri subsp. citri* на лайме [43]. В одном исследовании было показано, что виды *Bacillus* подавляют патогенных для цитрусовых бактерий *X. campestris* и *Xylella fastidiosa* [11].

B. amyloliquefaciens, который обычно выделяется из ризосферы и почвы на поверхности растений, может использоваться в качестве агента биоконтроля и был много раз описан на цитрусовых культурах. Он проявил явные ингибирующие эффекты против патогенов цитрусовых *P. digitatum*, *P. crustosum*, *P. italicum* и *G. citri-aurantii* «in vitro» и «in vivo» [14, 33, 87]. *B. amyloliquefaciens* проявил антагонистический эффект против патогена мальсекко *Phoma tracheiphila* на рассаде *Citrus aurantium*, заметно снижая прорастание конидий *P. tracheiphila* и воздействуя на мицелиальную структуру [106]. Кроме того, *B. pumilus* и *Bacillus sp.* w176 были

отмечены как существенно снижающие развитие зеленой плесени на цитрусовых плодах [89, 197]. *B. thuringiensis* использовали для контроля черной пятнистости цитрусовых, при этом наблюдалось существенное ингибирование мицелиального роста патогена *Guignardia citricarpa* [127].

1.7.2. Механизмы действия

По мере расширения списка агентов биоконтроля, изучаются возможные механизмы их действия. В связи с тем, что различные агенты биологического метода защиты имеют неодинаковый механизм действия, а также принимая во внимание сложные взаимодействия между антагонистом, патогеном, растением-хозяином и окружающей средой, остаются невыясненными некоторые моменты их единичного или комплексного влияния на целевые объекты [55]. В настоящее время известно, что механизмы действия агентов биоконтроля включают выработку антимикробных веществ или литических ферментов, конкуренцию за питательные вещества и пространство, паразитизм и индуцированную системную устойчивость (ИСУ) растений. Известно, что один антагонист часто использует более одного механизма действия [54, 155, 222, 225]. Ряд исследований свидетельствуют, что способность к колонизации корней считается предварительным условием и определяющим фактором активности и эффективности биоконтрольных агентов [28, 139]. Считается, что для *Bacillus spp.* одним из важнейших механизмов действия в качестве агента биоконтроля является синтез антимикробных веществ [228], за которым следует конкуренция за питательные вещества и пространство [158, 186]. *Bacillus spp.* также могут косвенно выступать в роли антагонистов, вызывая системную резистентность растений [156, 157].

1.7.3. Антимикробные вещества

Продуцирование антимикробных веществ является одним из основных механизмов антагонизма, и оно происходит чаще у бактерий, чем у дрожжей и грибов [191]. Предыдущие исследования показали, что *Bacillus spp.* может биосинтезировать два типа антимикробных веществ: бактериоцин, который синтезируется рибосомно, и липопептид, который синтезируется нерибосомно

[13], [157]. В среднем 4-5 % генома *B. subtilis* отвечает за синтез более двух десятков структурно разнообразных антимикробных веществ [190]. Липопептиды привлекли к себе большое внимание, вероятно, благодаря своим полезным характеристикам, таким как выраженная антимикробная активность, низкая токсичность, противовирусная и противоопухолевая активность, биоразлагаемость и стабильность при высокой температуре [137]. Липопептиды считаются более безопасными для окружающей среды, чем химические вещества [19].

1.7.4. Конкуренция за питательные вещества и пространство

Взаимодействие между микроорганизмами обычно включает в себя конкуренцию за питательные вещества и пространство, что связано с их ростом и развитием. Конкуренция за питательные вещества и пространство является одним из наиболее важных механизмов действия агентов биоконтроля, и все чаще сообщается, что она является преобладающим способом действия для дрожжей и бактерий [4, 160]. Однако сложно подтвердить, является ли конкуренция единственным или основным механизмом для подавления патогенов [96]. Конкурируя за питательные вещества и пространство на цитрусовых культурах, антагонисты должны быстро расти и адаптироваться к окружающей среде лучше, чем патогены, даже при использовании низких концентраций питательных веществ [155]. Поэтому антагонист истощает доступные питательные вещества, тем самым не давая патогену использовать их для роста [154]. Патогенные и непатогенные микроорганизмы должны конкурировать за эффективную колонизацию поверхности растения. Колонизация считается основным фактором, определяющим успешное лечение болезней растений [185]. При поранениях цитрусовых источники питательных веществ ограничены, что неизбежно приводит к конкуренции между патогенами и антагонистами [191]. Поэтому в предыдущих исследованиях систем биоконтроля конкуренция за питательные вещества и пространство рассматривалась как возможный механизм действия агентов биоконтроля [221].

1.7.5. Индуцированная устойчивость

Индуцированная устойчивость представляет собой природную генотипически обусловленную способность растений к сопротивлению, которая активируется под воздействием различных биотических и абиотических факторов, отражая определенный адаптивный потенциал организма. Это временная фенотипическая устойчивость, основанная на активации множества защитных генов, и поэтому является неспецифической [242]. Защитный путь включает в себя множество химических и биохимических реакций, а также производство патогенообусловленных протеинов (pathogenesis-related proteins - PRs), и структурных изменений тканей [207]. PRs служат для защиты растений от атаки патогенов и синтезируются на начальном этапе ответа растения на инфекцию. Исследование показало, что сам *B. subtilis* ABS-S14, его сырой экстракт и хитозан могут индуцировать активность пероксидазы и фенилаланин-аммиак-лиазы в зараженных мандаринах и тем самым совместно подавлять болезнь зеленой плесени [215]. Дополнительно, в исследовании было отмечено, что индуцированная системная устойчивость является одним из антагонистических механизмов *B. amyloliquefaciens* в борьбе с бактериальным увяданием томата [192].

1.8. Потенциал *Bacillus pumilus* в биоконтроле грибных фитопатогенов

1.8.1. Формирование биопленки *Bacillus pumilus*

Zhu *et al.* (2020) исследовали образование биопленки *B. pumilus* HR10 и отметили значительное облегчение формирования стабильной биопленочной структуры на поверхности среды [230]. Кроме того, их исследование показало, что биопленка проявляла низкую чувствительность как к кислой, так и к щелочной среде. Еще одно исследование, посвященное формированию биопленки у *B. pumilus* HR10, было проведено Zhu *et al.* (2020), где они обнаружили, что у мутантов штамма значительно снижено содержание ЭПС и белка по сравнению со штаммом дикого типа, что положительно коррелирует с производством биопленки [231]. Кроме того, Ansari and Ahmad (2019) продемонстрировали, что

другой штамм *B. pumilus* FAB10, может образовывать обильную биопленку, продуцировать АСС-деаминазу и солюбилизовать фосфор «in vitro» [7]. Они также продемонстрировали развитие биопленки штамма FAB10 при различных концентрациях NaCl «in vitro». Более того, последние исследования показывают, что синтез липопептидных антибиотиков, таких как сурфактин и фенгицин, вероятно, играет роль в формировании биопленки не только у *B. subtilis*, но и у *B. pumilus* [164, 231].

1.8.2. *Bacillus pumilus* и индуцированная системная устойчивость (ИСУ)

Штаммы *Bacillus pumilus* способны вызывать индуцированную системную устойчивость (ИСУ) против грибных фитопатогенов. Так, Енебак и Carey (2000) наблюдали за активацией ИСУ у *Pinus taeda* несколькими штаммами *B. pumilus*, включая INR7, SE52, SE34 и SE49, против грибного фитопатогена *Cronartium quercuum*, который вызывает ржавчинное заболевание [63]. Кроме того, было продемонстрировано, что активация ИСУ штаммом *B. pumilus* снижает тяжесть антракноза, вызываемого *Colletotrichum orbiculare*, в полевых испытаниях огурцов [219]. Кроме того, Jeong *et al.* (2014) исследовали коммерческий штамм *B. pumilus* INR7, известный своей способностью вызывать ИСУ, который используется в биологическом контроле против *Colletotrichum orbiculare*, *Rhizoctonia solani* и *Fusarium spp.* [98]. Используя Illumina Genome Analyzer IIx, исследователи выявили три кластера генов в *B. pumilus* INR7, кодирующих липопептидные синтетазы, включая сурфактин, бациллибактин и бацилизин, которые, предположительно, участвуют в индукции ИСУ. Более того, было показано, что штаммы *B. pumilus* вызывают ИСУ против бактериальных фитопатогенов, таких как *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, *Xanthomonas axonopodis* и *Erwinia tracheiphila* [98, 121].

1.8.3. Липопептиды, синтезируемые *Bacillus pumilus*

Недавние исследования выявили потенциальную роль сурфактина, продуцируемого штаммами *Bacillus pumilus* HR10 и PTB180, в подавлении роста *Rhizoctonia solani* на саженцах *Pinus massoniana* и препятствовании росту мицелия

Botrytis cinerea [21, 232]. Кроме того, Labiadh *et al.* (2021) выяснили наличие разнообразного набора молекул в *B. pumilus*, включая сурфактины, пумилацидин и курстакин, которые проявляют противогрибную активность против *Arthrobotrys conoides* и *Fusarium solani* [116].

Некоторые гептапептиды из семейства итуринов и декапептиды из семейства фенгицинов были идентифицированы в штаммах *B. pumilus*, демонстрируя ингибирующее действие против широкого спектра грибов и некоторых бактерий [142]. Сурфактин и фенгидин В, выделенные из штамма *B. pumilus* W-7, ингибируют рост *Phytophthora infestans* на картофеле. В двухлетнем полевом эксперименте штамм *B. pumilus* YSPMK11 значительно снизил тяжесть заболевания, вызванного *Sclerotinia sclerotiorum*, у цветной капусты на 93 % [109].

Bacillus pumilus также обладает способностью подавлять бактериальные фитопатогены. Например, исследование «in vitro», проведенное Nikolić *et al.* (2019), показало, что комбинация *Bacillus pumilus* SS-10.7, штаммов *B. amyloliquefaciens* SS-12.6 и SS-38.4 синтезировала липопептиды, такие как сурфактин, фенгидин А и итурин А, эффективно подавляющие рост *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* на сахарной свекле [153].

Кроме того, имеются сообщения о том, что штаммы *B. pumilus* продуцируют различные другие антибиотические вещества, включая бацилизин, тетаин, бацирцин, бактериоцин, феназин, амикумадин А, паениламицин и субтилин, которые проявляют антибактериальные и антигрибные свойства [92, 111, 178].

1.8.4. Гидролитические ферменты, продуцируемые *Bacillus pumilus*

Другой механизм действия агентов биоконтроля подразумевает наличие гидролитических ферментов, таких как хитиназа, целлюлаза, глюканаза и протеаза, которые разрушают компоненты клеточной стенки грибов [22, 141]. *B. pumilus* и родственные виды демонстрируют способность вырабатывать эти гидролитические ферменты в различных условиях окружающей среды, что указывает на их потенциал в качестве агентов биоконтроля [47, 50, 131]. Хитинолитические ферменты, среди них, имеют особое значение для борьбы с грибными фитопатогенами. Многочисленные исследования подчеркивают

эффективность хитиназ, синтезируемых *B. pumilus*, против грибов. Например, Rishad *et al.* (2017) зафиксировали хитиназную активность *B. pumilus* MCB-7 даже при температуре до 60°C и высоких концентрациях соли [174]. Как сырые, так и очищенные хитиназы проявляли фунгистатическую активность против ключевых фитопатогенов сельскохозяйственных растений, таких как *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* и *Ceratorhiza hydrophila* [174]. Аналогично, *B. pumilus* JUBCH08 проявил антагонистическую активность против *F. oxysporum*, причем максимальная хитиназная активность наблюдалась при 35°C после 72 часов погруженной ферментации [18].

Что касается других литических ферментов, то *B. pumilus* JK-SX001 продуцирует протеазу и целлюлазу. Метаболиты, полученные из штамма JK-SX001, значительно подавляли рост трех фитопатогенов, включая *Phomopsis macrospora*, *Cytospora chrysosperma* и *Fusicoccum aesculi* [172].

1.8.5. Летучие органические соединения, продуцируемые *Bacillus pumilus*

Бактерии, принадлежащие к роду *Bacillus*, продемонстрировали способность продуцировать соединения, препятствующие росту грибов [75, 119, 225]. Однако исследования по производству *Bacillus pumilus* микробных летучих органических соединений (ЛОС), особенно против грибковых фитопатогенов, остаются ограниченными. В исследовании Liu *et al.* (2008), *B. pumilus* штаммы BSH-4 и ZB13, выделенные из ризосферы огурца, проявляли ингибирующее действие на различные грибы, включая *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicae*, *Alternaria solani*, *Ascochyta citrullina*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Cercospora kikuchii*, *Rhizoctonia solani*, *Phoma arachidicola* и *Verticillium dahliae* [123]. Кроме того, Morita *et al.* (2019) исследовали противогрибковые свойства летучих органических соединений, продуцируемых *B. pumilus* TM-R, культивируемым на четырех различных средах, которые продемонстрировали активность против нескольких видов грибов, таких как *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* и *Penicillium italicum* [148]. Кроме того, исследование Zheng *et al.* (2019) показало, что *B. pumilus* в сочетании

с *B. amyloliquefaciens* и *Exiguobacterium acetylicum* подавляли рост *Peronophythora litchii* как «in vitro», так и «in vivo» » на плодах личи. Это ингибирование было связано с выделением (ЛОС), таких как α -фарнезен, 1-(2-аминофенил) этанон и бензотиазол [229].

1.8.6. Потенциал *Bacillus pumilus* для стимулирования роста растений

Bacillus pumilus - один из наиболее изученных штаммов бактерий, известных своей способностью стимулировать рост растений в роде *Bacillus*. Обширные исследования показали, что *B. pumilus* обладает целым спектром свойств, стимулирующих рост растений, включая выработку различных фитогормонов. Например, Gutiérrez-Mañero *et al.* (2001) идентифицировали несколько гиббереллинов (GA1, GA3, GA4 и GA20) в культурах *B. pumilus* [78]. Более того, Joо *et al.* (2005) расширили этот спектр, обнаружив дополнительные гиббереллины, полученные из *B. pumilus* CJ-69, включая такие новые варианты, как GA5, GA8, GA34, GA44 и GA5 [100].

Помимо производства фитогормонов, *B. pumilus* демонстрирует и другие стимулирующие рост свойства, жизненно важные для развития растений. Такие изоляты, как *B. pumilus* TRS-3, полученные из ризосферы чая, демонстрируют синтез индол-3-уксусной кислоты (ИУК), сидерофоров и солюбилизацию фосфатов [29]. Аналогично, *B. pumilus* JPVS11 демонстрирует способность продуцировать АЦК -деаминазу, фермент, играющий ключевую роль в снижении уровня этилена в растениях путем деградации АЦК [121]. Кроме того, *B. pumilus* вносит вклад в круговорот азота, продуцируя нитрогеназу - фермент, способствующий фиксации атмосферного N₂ в аммиак [133].

Эти выводы подчеркивают многогранную роль *B. pumilus* в стимулировании роста растений, а также подтверждают исследования, проведенные Hafeez *et al.* (2006), Murugappan *et al.* (2013) и Upadhyay *et al.* (2019), которые дополнительно подтверждают его потенциал стимулирования роста растений [79, 150, 204].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Материалы исследований

Среда КПК (картофельный декстрозный агар): Картофельный настой 200 г, декстроза 20 г, агар 20 г, H₂O 1000 мл; Среда ЛБ (Лурия-Бертани): 10 г пептона / триптона, 5 г экстракта дрожжей, 5 г NaCl, 20 г агара, 1000 мл H₂O; Среда ЛБ (Лурия-Бертани) Борта: 10 г пептона / триптона, 5 г экстракта дрожжей, 5 г NaCl, 1000 мл H₂O; Среда ПА (Питательный агар): экстракт дрожжей 3 г, пептон 5 г, NaCl 5 г, агар 15 г, 1000 мл H₂O; Среда ПБ (Питательный бульон): пептон 5 г, экстракт дрожжей 3 г, NaCl 5 г, 1000 мл H₂O; Среда ТСБ (Триптический соевый бульон): 17 г триптона, 3 г соевого триптона, 2,5 декстрозы, 5 г NaCl, 2,5 г K₂HPO₄, 1000 мл H₂O; Среда ТСА (Триптический соевый агар): триптон 15 г, соевый триптон 5 г, хлорид натрия 5 г, агар 15 г, 1000 мл H₂O; Среда Кинг Б: 20 г пептона, 10 мл глицерина, 1,5 г K₂HPO₄, 15 г MgSO₄·7H₂O, 15 г агара, 1000 мл H₂O.

Пептоновая вода: 10 г пептона, 5 г NaCl, 1000 мл H₂O.

ВА 2% (Водный агар): 20 г агара, 1000 мл H₂O.

Раствор Несслера: 10 г HgCl₂, 7 г KI, 16 г NaCl, 100 мл H₂O.

Раствор Салковски: 2% FeCl₃ 0,5М в азотной кислоте 35%.

Раствор йода Люголя: KI 10 г, иод 5 г, H₂O 100 мл.

Среда для индукции фермента:

Enzyme целлюлоза [10]. Среда карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ-агар): КМЦ 0,2%, пептон 0,5%, экстракт говядины 0,5%, NaCl 0,5%, агар 2%, pH 7,0.

Enzyme хитиназа [93]. Подготовка коллоидного хитина : пять граммов порошка хитина из раковых раковин (C7170, Sigma-Aldrich Co., США) были медленно добавлены к 60 мл концентрированной HCl (Merck S.A.) и оставлены при комнатной температуре на ночь при интенсивном перемешивании. Смесь была добавлена в 200 мл ледяного 95% этанола и инкубирована на ночь при комнатной температуре при интенсивном перемешивании. Осадок был собран центрифугированием при 5000g в течение 20 мин при 4°C и перенесен в стеклянную воронку с фильтровальной бумагой (80 г/м). Коллоидный хитин

промывался стерильной дистиллированной водой до тех пор, пока коллоидный хитин не стал нейтральным (pH 7,0). Коллоидный хитин, удерживаемый на фильтровальной бумаге, удалялся, взвешивался и хранился в темноте при 4°C.

Коллоидальная среда хитина агар (pH 7.0 +/- 0.2), приготовленная, содержала следующие ингредиенты: K_2HPO_4 , 0.7 г/л; KH_2PO_4 , 0.3 г/л; $MgSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.5 г/л; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.01 г/л; $ZnSO_4$, 0.001 г/л; $MnCl_2$, 0.001 г/л с 1,2% влажного коллоидального хитина, агар 1.5%.

Фермент протеазы [173]: 3,0% NaCl, 1,0% желатин, 0,4% глюкозы, 0,5% пептона и pH = 9; Фермент β -1,3-глюканаза [128]: 6 мг анилинового синего, 400 мг β -1,3-глюкана, 0,05 г глюкозы, 0,67 г экстракта дрожжей, 1,2 г агара, 100 мл H_2O , pH 6,8; Фермент амилазы [58]: экстракт дрожжей 3 г, пептон 5 г, NaCl 5 г, агар 15 г, растворимый крахмал 10 г, 1000 мл H_2O ; Фермент липазы [107]: экстракт дрожжей 3 г, пептон 5 г, NaCl 5 г, агар 15 г, масло оливы 10 мл, 1000 мл H_2O ; Фермент уреазы (среда Кристенсена) [184]: Уреа 20 г, NaCl 5 г, KH_2PO_4 2 г, Пептон 1 г, Глюкоза 1 г, Фенол красный 0,012 г, Агар 15 г, 1000 мл H_2O .

Растворы теста XAS (Хром Азурол S) [183]:

Голубая краска: Раствор 1: Растворяли 0,06 г XAS (Fluka Chemicals) в 50 мл дистиллированной воды.

Раствор 2: Растворяли 0,0027 г $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ в 10 мл 10 мМ HCl.

Раствор 3: Растворяли 0,073 г HDTMA в 40 мл дистиллированной воды.

Смешивали Раствор 1 с 9 мл Раствора 2. Затем смешивали с Раствором 3. Раствор должен приобрести голубой цвет. Автоклавировали и хранили в пластиковом контейнере/бутылке.

Раствор смеси: Минимальная среда 9 (MC9) Стандарт раствор солей: Растворяли 15 г KH_2PO_4 , 25 г NaCl и 50 г NH_4Cl в 500 мл дистиллированной воды.

Стандартный раствор глюкозы 20%: Растворяли 20 г глюкозы в 100 мл дистиллированной воды.

Стандартный раствор NaOH: Растворяли 25 г NaOH в 150 мл дистиллированной воды; pH должен быть около 12.

Раствор казеина: Растворяли 3 г казеина в 27 мл дистиллированной воды. Извлекали 3% 8-гидроксихинолин в хлороформе, чтобы убрать любой след железа. Фильтровали.

Подготовка раствора CAS: Добавляли 100 мл стандартного раствора MCS9 в 750 мл дистиллированной воды. Растворяли 32,24 г пиперазина-N,N'-бис (2-этансульфоновой кислоты) PIPES. PIPES не растворяется при pH ниже 5. Поднимали pH до 6 и медленно добавляли PIPES, помешивая. pH будет падать по мере растворения PIPES. Во время перемешивания медленно поднимали pH до 6,8. Нельзя превышать pH более 6,8, так как это приведет к зеленому цвету раствора.

2.2. Методы проведения исследований

2.2.1. Исследование и сбор пораженных образцов с citrusовых деревьев

Частота исследования: Каждые 10 дней.

Обзор охватывал citrusовые сады разного возраста, в различных местоположениях, при различных условиях выращивания и с разными сортами. В каждом саду исследовалось 20-50 деревьев в 5 точках, выстроенных по диагонали. Метод отбора образцов: Собирались все признаки заболевания на всех частях дерева (листья, ствол, корни, цветы, плоды). Образцы болезни помещались в пластиковые пакеты и доставляются в лабораторию для анализа.

Детальная запись образцов:

Дата, место отбора образцов, имя владельца плантации

Детали растения (сорт, возраст дерева, история...)

Пораженные части растения

Тип почвы (равнина, долина, склон)

Агротехника (удобрения, пестициды, фитосанитарные мероприятия)

Оценка распространения болезни оценивалась по 4-х уровневой шкале:

+ : < 10% заболевших деревьев

++ : 11-25% заболевших деревьев

+++ : 26-50% заболевших деревьев

++++ : > 50% заболевших деревьев

2.2.2 Выделение *Oomycetes*

Образцы для выделения оомицетов были собраны в период с 2021 по 2022 год в нескольких основных районах выращивания цитрусовых на севере Вьетнама, включая провинции Ха Гианг, Туен Куанг, Фу Тхо и Йен Бай. Ризосферная почва, больные корни и стебли с гуммозом были собраны с деревьев помело (*C. grandis*), апельсина (*C. sinensis*) и лайма (*C. aurantiifolia*) с симптомами пожелтения листьев, гуммоза стеблей и корневой гнили. Подробная информация об образцах приведена в таблице S1 приложения.

Изоляты оомицетов были получены из почвы ризосферы с использованием метода ловушки или из больных корней и стеблей в соответствии с методами, описанными в Van Tran *et al.* 2023 [209]. Приблизительно 20 граммов почвы на образец были размещены в 100 мл воды в пластиковом стакане, а затем на поверхность помещались 5 лепестков роз для привлечения зооспор из почвенного образца. Через 3 дня изоляты были получены путем помещения поверхностно стерилизованных симптоматических лепестков на среду агара V8 20%, дополненную пимарицином (10 мг л^{-1}), рифампицином (10 мг л^{-1}) и гимексазолом (50 мг л^{-1}). Патоген также выделяли непосредственно из пораженных стеблей цитрусовых, помещая поверхностно стерилизованные ткани на вышеуказанную селективную среду. Затем оомицеты субкультивировали, перенося кончики гиф на картофельно-декстрозный агар (КПК) или агаровую среду V8 в чашки Петри диаметром 90 мм.

2.2.3. Морфологические исследования

Всего было получено 83 изолята *Oomycetes*, обозначенных как VN-Oo01 - VN-Oo83, которые перечислены в таблице S1 приложения. Морфологические характеристики, включая скорость роста мицелия, морфологию колоний и спорангии, оценивали по методам, описанным Van Tran *et al.* (2023) [60]. Скорость роста этих изолятов *Phytophthora* оценивали на картофельно-декстрозном агаре (КПК) и агаре V8. После инкубации при 25°C рост гиф отслеживался каждые 24 часа в течение 3 дней. Морфология спорангиев, включая форму, размер, наличие

или отсутствие сосочков, документировалась и фотографировалась. Для оценки развития спорангиев использовали агаровые диски, вырезанные с периферии активно растущих колоний на V8-агаре, которые затем плавали в стерильной дистиллированной воде в течение 24 часов при комнатной температуре в отсутствие света. Морфологическая идентификация изолятов р. *Phytophthora* проводилась с помощью таксономических таблиц Люси и табличных ключей, доступных на сайте <https://idtools.org/id/phytophthora/index.php>.

2.2.4. Молекулярная идентификация видов *Oomycetes*

Экстракцию ДНК проводили по методу NaOH, первоначально разработанному для растительных тканей Wang, Qi and Cutler [216]. Мицелий из семидневной культуры КПК переносили в пробирку Эппендорфа объемом 0,5 мл, содержащую 5 мкл 0,5 М NaOH, и гомогенизировали с помощью наконечника пипетки. Гомогенизат разбавляли в 20 раз 100 mM Tris pH 8,0 и либо использовали сразу, либо хранили при -20°C до дальнейшего использования.

Для молекулярной идентификации были выбраны два общепринятых ДНК-штрихкода для оомицетов - ITS и *cox1* [175]. Участок ITS амплифицировали с помощью праймеров ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') и ITS5 (5'-GGAAGAAAAGTCGTAACAAGG-3') [220], а для амплификации *cox1* использовали праймеры OomCoxILevup (5'-TCAYWCWMGATGGCTTTT TCAAC-3') и Fm85mod (5'-RRHWACKTGACTDATRATACCAAA-3') [175]. ПЦР-реакции проводили в конечном объеме 25 мкл с использованием MyTaq HS Mix (Meridian Bioscience) и амплифицировали по следующей программе: начальная денатурация при 94°C в течение 5 мин, затем 35 циклов денатурации при 94°C в течение 15 с, отжиг при 55°C в течение 15 с, удлинение при 72°C в течение 1 мин и заключительный этап удлинения при 72°C в течение 5 мин.

Продукты ПЦР очищали в агарозном геле с помощью набора Expin™ Gel SV Kit (GeneAll Biotechnology), а концентрацию ДНК определяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Очищенные ампликоны были подвергнуты прямому секвенированию с использованием праймеров ПЦР в Институте биотехнологии в Ханое, Вьетнам. Последовательности первоначально сравнивали

с последовательностями «GenBank» ITS и *cox1* с помощью программы BLAST, доступной в Национальном центре биотехнологической информации (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Все последовательности видов Oomycetes, использованные для филогенетического анализа, были получены из Scanu *et al.* (2014) Scanu, Hunter, Linaldeddu, Franceschini, Maddau, Jung and Denman [182. Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 11 [115].

2.2.5. Тестирование патогенности

Все анализы патогенности проводились на зрелых плодах и стеблях помело (*Citrus grandis*), апельсина (*Citrus sinensis*) и лайма (*Citrus aurantiifolia*). Для инокуляции использовали зооспоры или пробки мицелия из пятидневных культур на среде V8 репрезентативных изолятов в соответствии с протоколом, описанным Van Tran *et al.* (2023) [208].

Для инокуляции плодов зрелые плоды помело (сорт Doan Hung и Soi Ha) на 3 день после сбора урожая и апельсинов (сорт Vinh), приобретенных в супермаркете, были поверхностно продезинфицированы 70% этанолом и высушены на воздухе в ламинарном потоке.

Затем плоды ранили, сделав неглубокое отверстие (5 мм в диаметре и 0,5 мм в глубину) на плодоножке. Раненые и нераненые плоды инокулировали, помещая 5-миллиметровую часть мицелия или капая 200 мкл суспензии 1×10^6 зооспор мл⁻¹ на плодоножку. Места инокуляции обматывали липкой лентой, а плоды инкубировали в пищевых пакетах для сохранения влажности.

Для инокуляции стеблей использовали привитые молодые растения помело (сорт Soi Ha) и апельсина (сорт Vinh) с базальным стеблем около 1,5-2 см. Участок коры шириной 1 см × 2 см длиной в середине стебля удаляли, в центр раны помещали 3-миллиметровую часть мицелия или часть агара V8 в качестве контроля, чтобы мицелий был обращен внутрь. Рану закрывали удаленным куском коры и оборачивали пластиковой мембраной.

Для инокуляции корневой системы семена помело (сорт Doan Hung, Soi Ha и Duong), апельсина (сорт Vinh, Sanh и Duong Canh) и лайма (сорт Tu Qui)

высеивали на стерильный песок в пластиковые горшки (7 × 9 см). Питательный раствор подавался еженедельно. Через 3 месяца саженцы апельсина и помело имели 3-4 и 5-6 настоящих листьев, соответственно. Перед инокуляцией горшки несколько раз заливали водой, чтобы удалить избыток питательных солей. Мицелиальные участки погружали в воду для получения зооспор. Пять мицелиальных участков и 100 мл суспензии зооспор (10^4 зооспор мл⁻¹) или агаровые кусочки и 100 мл воды в качестве контроля наносили на основание проростков. Для стимуляции дальнейшего образования зооспор влажность песка поддерживалась в течение 2 дней после инокуляции. Инфекцию оценивали по образованию поражений на корнях до 1 месяца после инокуляции.

Патоген повторно изолировали, помещая поверхностно стерилизованные инфицированные корни на пластины КПК [208] для подтверждения постулатов Коха. Каждая инокуляция повторялась на трех плодах или растениях. Все инокулированные и контрольные плоды или растения хранили при комнатной температуре. Заражение определяли по появлению бурой гнили на плодах и гуммоза на стеблях. Постулаты Коха выполняли путем повторного выделения *Phytophthora spp.* (или *Pythium spp.*) из очагов поражения. Эти опыты независимо друг от друга повторяли трижды. Площадь поражения плодов болезнями рассчитывали по формуле: $A = \pi r^2$ (см²), где r - радиус поражения, рассчитанный как среднее значение трех измерений на один плод.

2.2.6. Чувствительность фитофторы к фунгицидам *in vitro*

Шесть фунгицидов для контроля фитофторы (подробные химические составы приведены в табл. 8) были оценены на предмет их ингибирующей активности против роста репрезентативных изолятов *Phytophthora spp.* с помощью диффузионного метода на чашке Петри с КПК, как описано ранее Van Tran *et al.* 2023 [209]. Три мицелиальные части *Phytophthora spp.* диаметром 5 мм размещали в трех местах на равном расстоянии друг от друга по периметру каждой чашки. В центре каждой чашки Петри была сделана одна лунка диаметром 5 мм, и в каждую лунку было помещено по 50 мкл испытуемого раствора. Через 7 дней при 22°C процентное ингибирование роста радиусов (анг. *the percentage inhibition of radius*

growth, PIRG) было рассчитано по формуле $PIRG = 100 \times (C - T)/(C)$ (%), где C представляет собой радиус мицелия по отношению к дистиллированной воде, а T - радиус мицелия по отношению к фунгицидам (мм).

2.2.7. Изоляты бактерий и условия культивирования

Ризосферные почвы с помело и апельсиновых деревьев были собраны в Ан Кханге (21°47'20.1"N 105°15'04.6"E), расположенном в провинции Туен Куанг, в 2023 году. Примечательно, что цитрусовые деревья в этом районе на протяжении последних лет не проявляли признаков пожелтения листьев, гуммоза стеблей, бурой плодовой гнили и корневой гнили. Это резко контрастирует со значительным распространением болезней, наблюдаемым в соседних регионах в тот же период. Выделение почвенных бактерий проводилось с использованием метода разбавления, описанного Nan *et al.* (2022) [81]. Вкратце, один грамм образца почвы асептически смешивали с 10 мл стерильной воды в пробирке объемом 50 мл. Затем эту смесь разбавляли 1:10 дистиллированной водой и 100 микролитров разведения равномерно наносили на среду с питательным агаром (ПА), дополненную дрожжевым экстрактом (3 г), пептоном (5 г), NaCl (5 г), агаром (15 г) и 1000 мл H₂O. Инокулированные пластины инкубировали при 27°C в течение 1-3 дней, после чего отбирали отдельные колонии бактерий и переносили их на свежую среду ПА для дальнейшей инкубации при той же температуре. После нескольких пересевов получали чистые бактериальные культуры, которые сохраняли на ПА-планшетах при 4°C для будущего использования.

Бактериальный раствор готовили следующим образом: 24-часовую культуру *B. pumilus* помещали в жидкую питательную бульонную среду (ПВ), состоящую из пептона (5 г/л), дрожжевого экстракта (3 г/л), NaCl (5 г/л) и 1000 мл воды. Колбы помещали на шейкер и инкубировали в течение 48 часов при 28°C в темноте при встряхивании со скоростью 200 об/мин. Затем суспензию доводили до 1×10^6 колониеобразующих единиц (CFU)/мл для использования в исследовании. Филтрат бесклеточной культуры бактерий готовили по методу, описанному Nan *et al.* (2022) [81]. Колонии выращивали в стеклянных пробирках, содержащих жидкую питательную бульонную среду (ПВ), состоящую из пептона

(5 г/л), дрожжевого экстракта (3 г/л), NaCl (5 г/л) и 1000 мл воды. Пробирки помещали на шейкер и инкубировали в течение 48 часов при 28°C в темноте при встряхивании со скоростью 200 об/мин. После инкубации культуральную среду центрифугировали при 10 000g в течение 10 минут при 4°C. Полученный супернатант пропускали через фильтр 0,22 мкм, чтобы получить бесклеточный фильтрат.

2.2.8. Определение антагонистической активности с помощью пластинчатой конфронтационной культуры

Все бактериальные изоляты были подвергнуты анализу в двойной культуре для проверки их антагонизма против видов р. *Phytophthora* на КПК, как описано в работе Nan *et al.* (2022) [81]. 5-миллиметровую пластину культуры *Phytophthora* spp., выращенной на картофельно-декстрозном агаре (КПК) в течение 5 дней, помещали на расстоянии 2 см от края новой пластины КПК диаметром 90 мм. Бактериальную суспензию, полученную из 24-часовой культуры, наносили широкой линией на расстоянии 2 см от края пластины с противоположной стороны от грибной пластины.

Контрольный планшет был подготовлен с использованием дистиллированной воды. После инкубации пластин при 25°C измеряли радиус роста колоний каждого гриба по направлению к стороне, пропитанной бактериями, когда контрольная пластина была полностью покрыта мицелием. Затем рассчитывали PIRG (анг. *The percentage inhibition of radius growth*) по формуле: $PIRG = 100 \times (C - T)/(C)$ (%), где C представляет собой радиус роста мицелия на контрольной пластине, а T - радиус роста мицелия в сторону бактериальных колоний (мм).

2.2.9. Определение антагонистической активности диско - диффузионным методом

Для оценки антагонистической активности бактерий аликвоту 0,1 мл бактериальной культуры с концентрацией 1×10^8 КОЕ/мл наносили на поверхность пластины КПК диаметром 9 см. В качестве контроля на отдельный

планшет КПК нанесли 0,1 мл стерилизованной дистиллированной воды. Затем в центр каждой пластины поместили пластину агара диаметром 5 мм, содержащую колонии *Phytophthora spp.*. Затем пластины инкубировали при 28°C в темноте в течение 7 дней. Измеряли размер колонии патогена и рассчитывали PIRG, как описано выше. Для обеспечения точности и надежности все варианты были воспроизведены в трех повторностях.

2.2.10. Антимикробный тест бактериальных ЛОС

Для изучения влияния бактериальных летучих органических соединений (ЛОС) на патогены использовали чашки Петри по методу, описанному в работе Nan *et al.* (2022) [81], с небольшими изменениями. Первоначально на одну крышку чашки Петри добавляли среду Лурия-Бертани (ЛБ) и равномерно распределяли 0,1 мл бактерий-антагонистов (1×10^8 КОЕ/мл) по поверхности этой чашки Петри. Через день 5-дневная пластина с *Phytophthora spp.* была помещена в центр оставшейся крышки, содержащей картофельно-декстрозный агар (КПК). Контрольные пластины состояли только из грибных патогенов. Для герметизации инокулированных пластин использовали парафильм. Инкубация пластин с патогенными грибами и бактериями-антагонистами проводилась при 25°C. Рост грибов оценивался путем измерения диаметра мицелия, а затем рассчитывался процент ингибирования роста грибов для оценки эффективности антагонистических бактерий против тестируемого патогена.

2.2.11. Производство ферментов

Активность внеклеточных гидролитических ферментов анализировали качественно, используя метод колодезной диффузии. В планшетах Петри, содержащих среду для индукции ферментов, создавали лунки для оценки продукции целлюлазы, хитиназы, амилазы и протеазы. Затем в каждую лунку добавляли по 40 мкл концентратов 48-часового фильтрата культуры (анг. *cell-free culture filtrate*, CF CF), приготовленных, как описано ранее, или 40 мкл питательного бульона (NB) в качестве отрицательного контроля. После 72 часов

инкубации при 28°C в каждую лунку добавляли йод Люголя. Образование четких зон вокруг колоний подтверждало выработку фермента.

Для теста на фермент каталазу небольшое количество выросших колоний переносили на поверхность чистого, сухого предметного стекла с помощью стерильной деревянной палочки. Затем на предметное стекло помещали каплю 3%-ной H_2O_2 и наблюдали за образованием пузырьков кислорода. Чтобы проверить наличие фермента уреазы, на поверхность образца мочевиного агара наносили часть хорошо изолированной колонии. Пробирку плотно закрывали крышкой и инкубировали при температуре 35-37°C. Развитие розовой окраски наблюдалось в течение 7 дней [124].

2.2.12. Производство вторичных метаболитов

Оценку продукции индол-3-уксусной кислоты (ИУК) проводили по методу, описанному Сальковски, с небольшими изменениями [59]. Чистые изоляты помещали в 250 мл конические колбы, содержащие 50 мл бульонной среды ЛБ, и инкубировали в шейкерном инкубаторе при 180 об/мин в течение 2 дней при 28°C $\pm$ 10°C. После инкубации культуры центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 10 минут и 500 мкл супернатанта переносили в пробирку объемом 1,5 мл. Затем добавляли 1 мл реагента Салковского (приготовленного путем растворения 2% 0,5 М $FeCl_3$ в 35%-ной перхлорной кислоте) и инкубировали пробирки в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. Появление розового цвета указывало на выработку ИУК.

Производство сидерофоров определяли согласно методу, описанному [8]. Чистые изоляты инокулировали в 10 мл питательной среды ЛБ и инкубировали на инкубаторе-шейкере при 180 об/мин в течение 24 ч при температуре 28°C $\pm$ 10°C. После инкубации культуры центрифугировали при 12 000 об/мин в течение 10 мин, и 1 мл наднатанта переносили в пробирку объемом 2,5 мл. Затем добавляли 1 мл реактива CAS, и пробирки инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре. Образование желтого цвета указывало на производство сидерофоров.

Выделение аммиака определяли по методу, описанному (Dey *et al.*, 2004) [45]. Изоляты выращивали в пробирках с пептонной водой (10 г пептона, 5 г NaCl и 1000 мл дистиллированной воды, отрегулированной до pH 7,0) и инкубировали при 30°C в течение 4 дней. Накопление аммиака определяли добавлением реагента Несслера (0,5 мл пробирка⁻¹). Слабый желтый цвет указывал на небольшое количество аммиака, а насыщенный желтый или коричневатый цвет - на максимальное производство аммиака.

Выделение фосфатов определяли по методу, описанному (Nautiyal, 1999) [152]. Активность солюбилизации фосфатов определяли по развитию четких ореолов вокруг колоний на агаровых пластинах NBRIP (глюкоза, 10 г; Ca₃(PO₄)₂, 5 г; MgCl₂·6H₂O, 5 г; MgSO₄·7H₂O, 0,25 г; KCl, 0,2 г; (NH₄)₂SO₄, 0,1 г; агар, 15 г и 1 л дистиллированной воды), после инкубации в течение 14 дней при 28°C.

2.2.13. Экстракция, очистка ДНК, ПЦР и филогенетический анализ бактерий

На основе скрининга антагонистических бактерий против *Phytophthora spp.* были выбраны четыре изолята, обозначенные как VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13, с сильной антагонистической активностью для идентификации. Экстракция бактериальной ДНК проводилась в соответствии с процедурой, описанной [201], с незначительными изменениями. ДНК, изолированная из бактериальных колоний, растворялась в объеме 50 мкл буфера TE (трис + ЭДТА) при pH 8,0 в пробирках Еррendorf объемом 1,5 мл. Затем бактериальный аликвот нагревали при 100°C в течение 10 минут и использовали в качестве шаблона для ПЦР. Гены 16S рРНК, подединицы В субъединицы гиразы (*gyrB*) и фермента оротатафосфорибозилтрансферазы (*pyrE*) этих бактерий подвергались ПЦР-амплификации с использованием универсальных праймеров 27F и 1525R [169], *gyrBF* и *gyrBR*, *pyrBF* и *pyrBR*, соответственно [124].

Реакция ПЦР проводилась с общим объемом 25 мкл, включая 12,5 мкл 2x MytagMM, 0,4 мкл каждого праймера, 0,5 мкл ДНК и 11,2 мкл H₂O. Процедура ПЦР выполнялась в термоциклере в следующих условиях: один цикл денатурации при 95°C в течение 2 минут, за которым следовали 35 циклов денатурации при 95°C в течение 20 секунд, отжига при 55°C в течение 15 секунд, элонгации при 72°C в

течение 1 минуты и завершающий этап элонгации при 72°C в течение 5 минут. Затем реакцию останавливали и давали остыть до комнатной температуры. Продукты ПЦР визуализировали электрофорезом в агарозном геле, и целевая полоса вырезалась и очищалась с использованием коммерческого набора для быстрой экстракции ДНК PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Очищенный продукт ПЦР затем направляли в Институт биотехнологии (IBT, Ханой, Вьетнам) для секвенирования ДНК. Сборка и уточнение последовательностей ДНК осуществлялись с помощью программного обеспечения Mega 11. Дополнительно для выявления наличия биосинтетических генов, ответственных за производство биоактивных соединений у известного антагонистического бактериального рода *Bacillus*, были амплифицированы шесть генов с использованием специфических праймеров, описанных в таблице 1 [147].

Таблица 1. Характеристика праймеров

Ген	Наименование продукта	Наименование праймера	Sequence (5' to 3')	Размер (bp)
<i>16S rRNA</i>	rRNA	27F 1525R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG ACGGCTACCTTGTACGACT	1473
<i>gyrB</i>	Gyrase B subunit	gyrBF gyrBR	TTATCTACGACCTTAGACG TAAATTGAAGTCTTCTCCG	1045
<i>pyrE</i>	Orotate phosphoribosyltransferase	pyrBF pyrBR	AGACCGTTTCTTCCATCCA CACCTATTACAAATCAAAGC	577
<i>spaS</i>	Subtilin	SPASF SPASR	GGTTTGTGGATGGAGCTGT GCAAGGAGTCAGAGCAAGGT	375
<i>fenD</i>	Fengycin	FENDF FENDR	GGCCCGTTCTCTAAATCCAT GTCATGCTGACGAGAGCAAA	269
<i>bmyB</i>	Bacyllomycin	BMYBF BMYBR	GAATCCCGTTGTTCTCCAAA GCGGGTATTGAATGCTTGTT	370
<i>bacA</i>	Bacylisin	BACF BACR	CAGCTCATGGGAATGCTTTT CTCGGTCCTGAAGGGACAAG	498
<i>ituC</i>	Iturin	ITUCF ITUCR	GGCTGCTGCAGATGCTTTAT TCGCAGATAATCGCAGTGAG	423
<i>srfAA</i>	Surfactin	SRFAF SRFAR	TCGGGACAGGAAGACATCAT CCTCTCAAACGGATAATCCTGA	201

2.2.14. Влияние бактериального раствора *B.pumilus* на зооспоры

Phytophthora spp.

Семена помело (*C. grandis* сорт Doan Hung, сорт Soi Ha и сорт Duong), апельсина (*C. sinensis* сорт Vinh, сорт Sanh, сорт Duong и сорт Duong Canh) и лайма (*C. aurantifolia* сорт Tu Quy) высевали на стерильный песок в пластиковые горшки (7 x 9 см) в течение двух месяцев. Питательный раствор подавался каждую неделю. В это время сеянцы имели 2-3 настоящих листа. Затем сеянцы аккуратно извлекали из песка, а корни промывали водой. Проростки подвешивали на 300 мл воды в пластиковом стаканчике с помощью зажима. Затем в пластиковый стаканчик поместили пять пробок и 100 мл суспензии зооспор (10^4 зооспор мл⁻¹) *Phytophthora parvispora* (VN-Oo10). Через два дня после инокуляции добавляли 3 мл аликвоты надосадочного раствора, полученного из *Bacillus pumilus* (VN-K13), в концентрации 1×10^6 КОЕ/мл. Для проверки активности зооспор в воду каждой чашки помещали по три лепестка роз. Инфекцию оценивали по образованию поражений на корнях в течение месяца после инокуляции. Были включены положительные (инокулированные *P. parvispora*) и отрицательные (необработанные) контроли.

2.2.15. Биологический контроль на цитрусовых растениях

Подготовка растительного сырья

Семена апельсина (*Citrus sinensis* сорт Sanh) подвергали поверхностной стерилизации путем ополаскивания 95%-ным этанолом в течение 30 секунд с последующим погружением в 2,5%-ный раствор гипохлорита натрия (NaClO) на 10 минут при постоянном осторожном встряхивании. Затем семена тщательно промывали стерильной дистиллированной водой десять раз, чтобы удалить остатки гипохлорита натрия. Затем семена обрабатывали гиббереллиновой кислотой (GA3) в концентрации 80 ppm и инкубировали при 25°C в течение 12 часов. Затем обработанные семена высаживали в пластиковые горшки (7x9 см), наполненные стерильным песком. Горшки были помещены в условия с колебаниями температуры в пределах 15-30°C и относительной влажностью 60-80%. Саженьцы поливали три раза в день, а питательный раствор подавали еженедельно. Через 3 месяца были успешно выращены оранжевые сеянцы с 3-4 настоящими листьями. Перед инокуляцией горшки несколько раз заливали водой,

чтобы удалить избыток питательных солей, которые могли бы повлиять на зооспоры.

Приготовление агентов биоконтроля

Штаммы *Bacillus pumilus* VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13 культивировали на питательной агаровой среде (ПА), дополненной дрожжевым экстрактом (3 г), пептоном (5 г), NaCl (5 г), агаром (15 г) и 1000 мл H₂O. Петлю с 24-часовой культурой отдельных штаммов помещали в жидкую питательную бульонную среду (NB), состоящую из пептона (5 г/л), дрожжевого экстракта (3 г/л), NaCl (5 г/л) и 1000 мл воды. Колбы помещали на шейкер и инкубировали в течение 48 часов при 28°C в темноте при встряхивании со скоростью 200 об/мин. Затем эту суспензию доводили до 1x10⁶ колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл и 1x10⁸ КОЕ/мл, соответственно, для использования в исследовании.

Биологический контроль «in vivo» фитофторы на цитрусовых

Пять мицелиальных пластин из репрезентативного изолята *P. parvispora* (VN-Oo10) были нанесены на основание саженцев. Через два дня после инокуляции на каждый саженец наносили по 3 мл надосадочного раствора, полученного из четырех штаммов бактерий *Bacillus*, в двух различных концентрациях (1x10⁶ и 1x10⁸). Эксперимент проводился по схеме полностью рандомизированного блока, каждая группа состояла из 12 саженцев. Кроме того, были включены положительные (инокулированные *P. parvispora*) и отрицательные (необработанные) контрольные группы.

Через четыре месяца после пересадки саженцы были аккуратно извлечены из горшков, а их корни подверглись тщательной процедуре промывки, чтобы удалить все оставшиеся частицы песка. Затем корни и побеги проростков отделяли и подвергали сушке при 80°C в течение 72 часов перед последующим взвешиванием.

2.2.16. Статистический анализ

Все эксперименты проводились в трехкратной повторности. Значимые различия между обработками анализировались в программном обеспечении SPSS Statistics версии 26 с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), за которым следовал тест честных различий Тьюки (Tukey's honestly significant difference test) ($P < 0,05$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Анализ производства цитрусовых деревьев в горных провинциях северного Вьетнама

3.1.1. Состояние современного производства

Выращивание цитрусовых в горных провинциях северного Вьетнама является важной частью сельскохозяйственной деятельности благодаря благоприятному климату и гористой местности, которые обеспечивают благоприятные условия для производства цитрусовых. Мандарины, апельсины и померанцы являются самыми распространенными цитрусовыми фруктами в регионе, где они обычно выращиваются на семейных фермах малого масштаба, которые часто используют методы междурядного посева с другими культурами, такими как кукуруза и бобы. Во Вьетнаме цитрусовые деревья, особенно померанцы, считаются одними из основных фруктовых деревьев.

Таблица 2. Текущий возраст цитрусовых деревьев в четырех горных провинциях северного Вьетнама

Возраст деревьев (годы)	Площадь (гектары)	Проценты (%)
1-7	2.170	35.76
7-15	3.750	61.80
> 15	180	2.44
Всего	6.260	100

Цитрусовые деревья в первую очередь выращиваются в горных провинциях Северного Вьетнама, особенно вдоль главных рек и их притоков, таких как Красная река, река Ло, река Гам и река Чай. Основные регионы производства цитрусовых включают Йен Баи, Ха Зянг, Туен Куанг и Фу Тхо, которые вместе составляют 47,5% производства цитрусовых в стране и 29,09% общей площади выращивания плодовых деревьев в Северном регионе, с общей площадью выращивания 121,97 тысяч гектаров. Было проведено исследование для оценки текущего возрастного распределения цитрусовых деревьев в четырех вышеупомянутых провинциях, и результаты представлены в таблице 2.

Полученные результаты из обширного обзора 815 цитрусовых садов показывают, что преобладающая часть обрабатываемой площади занята цитрусовыми деревьями в возрасте от 7 до 15 лет, составляя (61,80%) от общей площади, в то время как деревья старше 15 лет представляют собой всего лишь 2,40%. Причины этой тенденции могут быть объяснены широким распространением заболеваний на многих цитрусовых деревьях, что приводит к вырубке зрелых деревьев без своевременной замены.

Очевидно, что основной проблемой в современном выращивании цитрусовых является борьба с разрушительным воздействием вредителей и заболеваний, особенно гуммозом, гнилью корней и пожелтением. Кроме того, недостаток подходящих сортов, обладающих устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды, а также к поражению вредителями и болезнями, остается значительной проблемой в регионе выращивания. Текущий статус использования цитрусовых деревьев представлен в таблице 3.

Таблица 3. Посадки цитрусовых в четырех северных горных провинциях
Вьетнама

Виды насаждений	Количество исследованных садов	Процент (%)
Привитые деревья	552	67.73
Деревья, размноженные черенками	238	29.20
Посаженные из семян	25	3.07
Всего	815	100

В обследованных фруктовых садах, в 552 использовали привитые саженцы, что составляет 67,73%. В 238 садах применяли метод размножения черенкованием, что составляет 29,20%, в то время как в 25 садах 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, их возраст составлял от 1 до 7 лет.

3.1.2. Состав заболеваний, влияющих на цитрусовые деревья

В ходе нашего исследования мы стремились выявить наиболее распространенные вредоносные компоненты и уровень их развития на цитрусовых деревьях в четырех северных горных провинциях Вьетнама с целью внести вклад в профилактику заболеваемости для обеспечения качества продукции и доходности фермеров, выращивающих цитрусовые культуры. Для достижения этой цели мы провели опросы и отслеживали вредоносные компоненты на цитрусовых деревьях в садах, расположенных в провинциях Ха Зянг, Туен Куанг, Фу Тхо и Йен Баи. Результаты наших опросов и мониторинга с июля 2020 года по июль 2022 года представлены в таблице 4.

В ходе нашего исследования было выявлено 11 вредоносных заболеваний, поражающих цитрусовые деревья, включая 8 грибных и 2 бактериальных и одно заболевание неинфекционной природы. Высокая частота грибных болезней была обнаружена среди обследованных цитрусовых садов в четырех провинциях северного Вьетнама. Особенно опасным является гуммоз и корневые гнили, вызываемые *Phytophthora spp.*, обнаруженные в обследованных районах. Учитывая потенциальную опасность данного заболевания, мы сосредоточили свои исследовательские усилия на исследовании фитофтороза цитрусовых.

Таблица 4. Основные болезни, выявленные на цитрусовых деревьях в четырех северных горных провинциях
Вьетнама в 2020 году

номер	Название болезни	Патоген	Часть растения, пораженная болезнью	Время повреждения	Частота
1	Хуанглонгбинг	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	вся дерево	В течение всего года	++
2	Болезнь бактериальной пятнистости	<i>Xanthomonas campestris pv. citri</i> <i>Dowson</i>	Ветви, листья, ствол, плоды	5 – 9	+
3	Болезни черной пятнистости (Scab Diseases)	<i>Elsinoe fawcettii</i> Bitan. et Jenk	Поражают листья, плоды и ветви.	2 – 6	+
4	Жирная пятнистость	<i>Mycosphaerella citri</i> Whit.	Листья, плоды	9 – 12	+
5	Синяя плесень	<i>Penicilium italicum</i> When.	Плоды	11, 12, 1	++
6	Грибковая пора плесени	<i>Capnodium citri</i> <i>Berkeley et Desmazieres</i>	Листья, ветви, плоды,	В течение всего года	+
7	Мучнистая роса	<i>Oidium tingitanium</i> Carter.	Ветви, листья, плоды	2 – 5	+
8	Антракнозная болезнь	<i>Collectotrichum</i> <i>gloeosporioides</i> Penz.	Ветви, плоды	4 – 7	+
9	Гуммоз, корневая гниль	<i>Phytophthora</i> spp.	Корни, ствол, ветви, ствол, плоды	3 – 11	+++
10	Гниль корней	<i>Fusarium, Rhizoctonia, Sclerotium</i>	Корни, корневой горшок	В течение всего года	+++
11	Физиология	физиология	плоды	7 – 1	+

Примечание:

+ Частота появления <20%

++ Частота появления от 20 до 40%

+++ Частота появления > 40%

3.1.3. Оценка распространенности *Phytophthora spp*, в основных регионах выращивания цитрусовых

Полевые обследования показывают, что *Phytophthora spp*, преимущественно проявляется в конце периода дождей. Оценка инцидента заболевания основывается на сочетании анализа симптомов на местности и быстрой обработки образцов с использованием метода ловушек из лепестков роз.

Распространенность инфекции *Phytophthora spp*, значительно варьирует в исследуемых регионах (рис. 3). 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 инцидентом заболевания в 19,5%. За ним следуют Ван Чан (Йен баи) 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%.

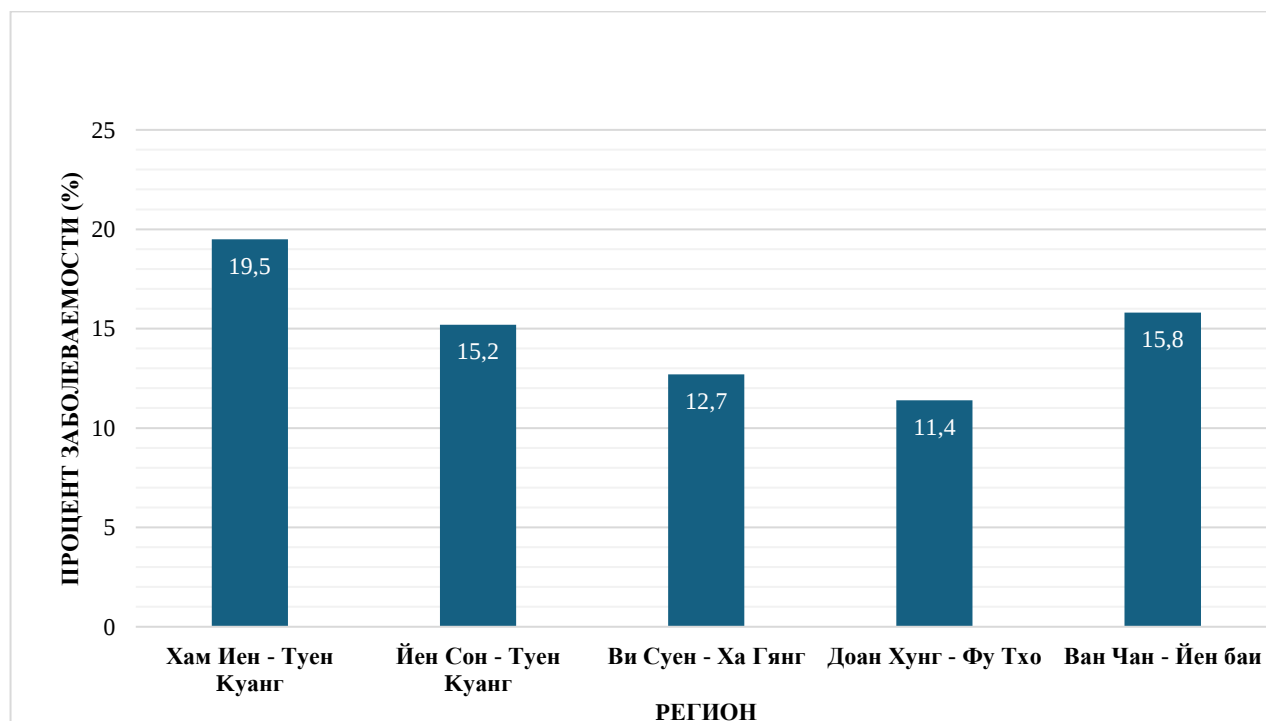


Рисунок 3. Уровень заболеваемости *Phytophthora spp*, в основных областях выращивания цитрусовых в северных горных районах Вьетнама

Phytophthora spp., вызывает хлороз листьев, гуммов, гниение корней на citrusовых деревьях, особенно проявляясь в условиях повышенной влажности и затопленности. Наши исследования распространения болезни охватывают разнообразные топографические зоны, включая вершины холмов, склоны, подножия холмов, равнинные участки и низинные местности. Результаты представлены на рисунке 4.

Эти результаты показывают, что распространение и тяжесть заболевания фитопфторозом значительно варьируются в зависимости от рельефа расположения citrusовых садов. Заболевание имеет наибольшее воздействие на низменных участках и подножиях, где отмечаются уровни заболеваемости в 17% и 13,6% соответственно. Напротив, на склонах уровень заболеваемости составляет 7,2%, а на равнинных участках 4,8%. Заметно, что на вершинах холмов заболевание проявляется наименее сильно, регистрируя уровень заболеваемости всего лишь 3%.

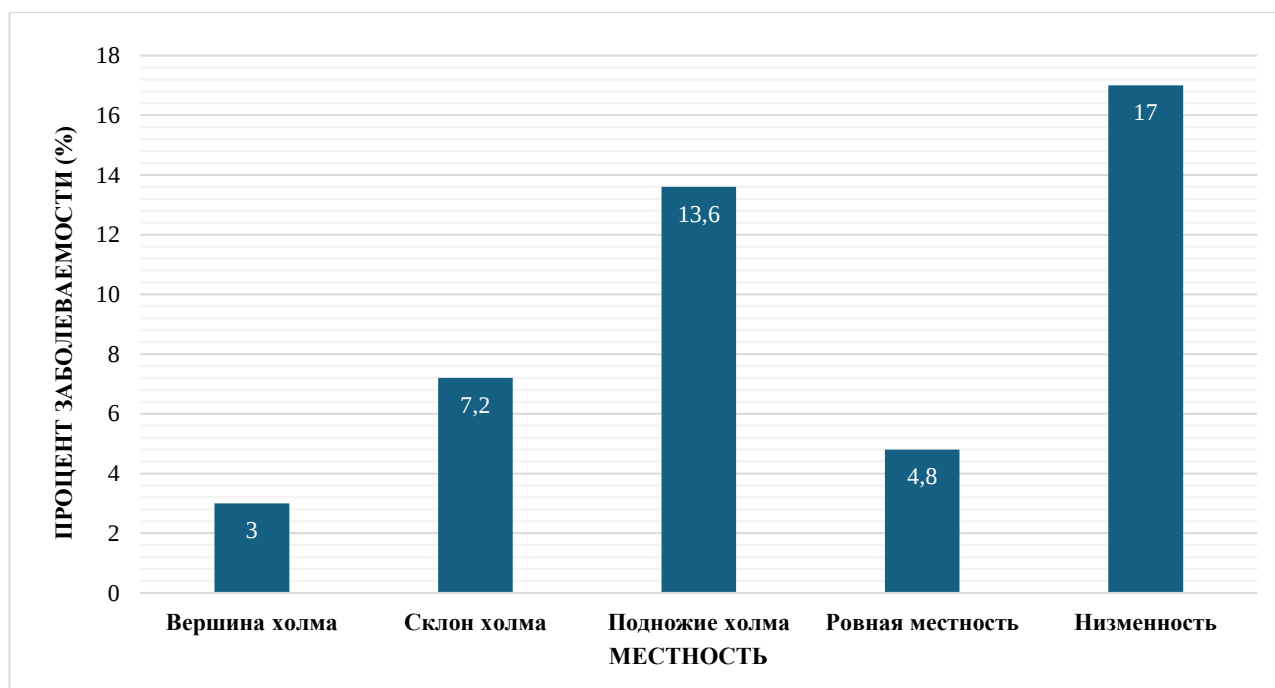


Рисунок 4. Влияние различного типа местностей на заболевание *Phytophthora spp.*

Различия в уровнях заболеваемости в разных местностях объясняются скоплением застойных вод в citrusовых садах, расположенных на низменных участках и подножиях холмов. Это явление обусловлено осадками и

недостаточной системой дренажа, что способствует высокой влажности, благоприятной среде для размножения и появления фитофторы и сопряженных заболеваний. Поэтому эффективный дренаж застойных вод в садах является важным мероприятием не только для выращивания цитрусовых культур, но и других плодовых деревьев.

3.2. Сбор образцов оомицетов

Всего было получено 83 изолята оомицетов из 80 плантаций, расположенных в четырех провинциях северного Вьетнама (таб. 5). Было идентифицировано пять видов р. *Phytophthora* (*P. citrophthora*, *P. nicotianae*, *P. mekongensis*, *P. parvispora*, *P. palmivora*) и четыре вида р. *Pythium* (*P. deliense*, *P. cucurbitacearum*, *P. inflatum*, *P. carolinianum*) на основе морфологических, физиологических и культуральных характеристик.

Несколько изолятов, полученных в ходе исследования, являлись новыми видами, вызывающими болезни на цитрусах деревьях. Изоляты были представлены в «Genbank». *Phytophthora mekongensis* была обнаружена в садах в двух регионах и была доминирующим видом в каждом регионе с наибольшим процентом изолятов, выделенных в Туен куане (30%), за которым следовали *Phytophthora palmivora* (22%), *Phytophthora parvispora* (19%), *Phytophthora nicotianae* (17%) и *Phytophthora citrophthora* (12%). Совместные инфекции *P. palmivora* и *P. mekongensis* были обнаружены в девяти садах.

Таблица 5. Оомицеты, выделенных из цитрусовых в Северном Вьетнаме

Вид Оомицета	Количество изолятов	Представительный изолят	Источник	Хозяин	Происхождение ^a	Номер доступа в “GenBank» .	
						ITS	COI
<i>P. citrophthora</i>	8	VN-Oo76	Пораженные корни	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт V2)	ЙБ	OQ253523	OQ408408
<i>P. nicotianae</i>	11	VN-Oo58	Стебель с гуммозом	Помело (<i>C. grandis</i> сорт Doan Hung)	ФТ	OQ253529	OQ408410
<i>P. palmivora</i>	15	VN-Oo33	Стебель с гуммозом	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	ХГ	OQ253531	OQ408409
<i>P. parvispora</i>	13	VN-Oo10	Стебель с гуммозом	Помело (<i>C. grandis</i> сорт SoiHa)	ТК	ON573334	ON563239
<i>P. mekongensis</i>	20	VN-Oo48	Стебель с гуммозом	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	ТК	OQ253527	OQ408412
<i>P. deliense</i>	8	VN-Oo29	Корни с почвой ризосферы и пораженные корни	Помело (<i>C. grandis</i> сорт SoiHa)	ТК	ON573331	ON563236
<i>P. cucurbitecearum</i>	3	VN-Oo22	Стебель с гуммозом	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	ТК		
<i>P. carolinianum</i>	3	VN-Oo18	Корни с почвой ризосферы и пораженные корни	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	ТК		
<i>P. inflatum</i>	2	VN-Oo23	Корни с почвой ризосферы и пораженные корни	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	ТК		

^a Изоляты были собраны в Северном Вьетнаме из регионов Ха Зянг (ХГ), Туен Куанг (ТК), Фу Тхо (ФТ), Йен баи (ЙБ).

3.3. Характеристика *Phytophthora* spp, связанной с гуммозом цитрусовых в Северном Вьетнаме.

3.3.1. Морфологический анализ

Всего было получено 67 изолятов *Phytophthora*, обозначенных как VN-Oo01 до VN-Oo83, из ризосферной почвы, больных корней и стволов цитрусовых деревьев, страдающих от желтизны листьев, гуммоза ствола и гнили корней (таб. S1 приложения). Эти изоляты были разделены на четыре подгруппы на основе морфологии колоний и скорости роста мицелия. Два изолята с одинаковой морфологией из каждой подгруппы были выбраны в качестве образцовых изолятов, а именно подгруппа 1 (VN-Oo33 и VN-Oo38), подгруппа 2 (VN-Oo68 и VN-Oo72), подгруппа 3 (VN-Oo76 и VN-Oo78), подгруппа 4 (VN-Oo58 и VN-Oo65) и подгруппа 5 (VN-Oo03 и VN-Oo10). Морфологические характеристики этих образцовых изолятов показаны в таблице 6 и на рисунке 5.

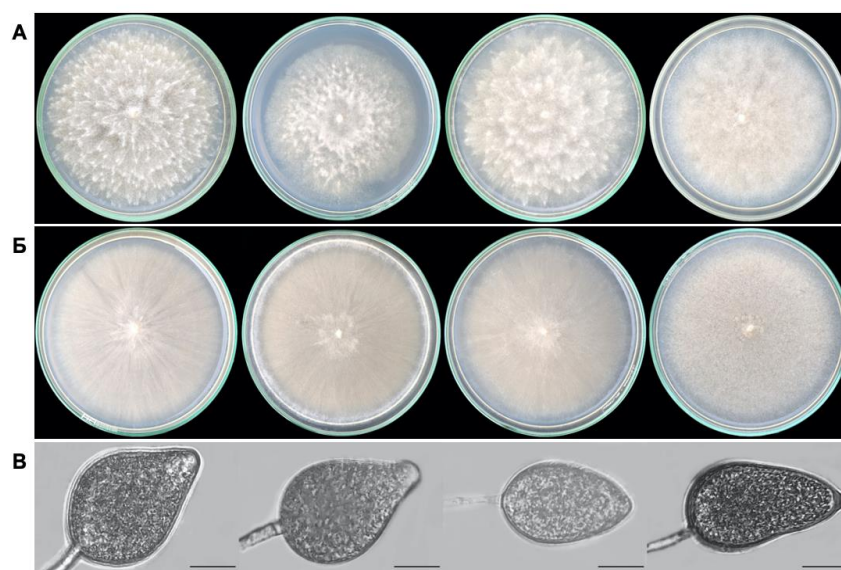


Рисунок 5. Морфология видов р. *Phytophthora*, связанных с гуммозом цитрусовых А-Б. Пятидневные культуры *P. mekongensis* - изолят VN-Oo68, *P. palmivora* - изолят VN-Oo38, *P. citrophthora* - изолят VN-Oo76 и *P. nicotianae* - изолят VN-Oo65 на КПК и V8 соответственно (слева направо). В. Спорангии *P. mekongensis*, *P. palmivora*, *P. citrophthora* и *P. nicotianae* (слева направо). Шкалы = 15 мкм

Таблица 6. Морфологические характеристики видов рода *Phytophthora*

Параметры		Подгруппа 1 (<i>P. palmivora</i>)	Подгруппа 2 (<i>P. mekongensis</i>)	Подгруппа 3 (<i>P. citrophthora</i>)	Подгруппа 4 (<i>P. nicotianae</i>)	Подгруппа 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
Спорангии 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 изолята	44.28 – 82.03 × 31.54 – 51.73	42.82 – 66.43 × 28.94 – 39.84	44.30 – 70.04 × 24.83 – 43.32	45.25 – 79.90 × 30.31 – 42.84	45.6-74.8 x 32.5 – 45.6
	Д/Ш соотношение	1.59	1.58	1.64	1.67	1.64
Морфология колонии на КПК ²		звездчатый узор	звездчатый узор с полосками	плотный хлопковый, розеточный узор	легкий розеточный узор	хлопковый, рисунок хризантемы
Морфология колонии на V8 ³		гладкий, слегка радиальный	гладкий, слегка радиальный	гладкий, слегка радиальный	слегка волокнистый	волокнистый, рыхлый, хризантемоподобный
Средняя скорость роста на КПК* (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.

Была исследована морфология колоний изолятов *Phytophthora spp.* на средах КПК и V8 (рис. 5). Колонии подгруппы 1 отличались своим белым цветом с звездчатым узором на КПК, в то время как на агаре V8 они имели белый до серый оттенок с гладким, слегка излучающимся краем.

Колонии подгруппы 2 были пушистыми и белыми с ровным краем на среде КПК, и круглыми с гладким или слегка волнистым краем и бархатистой текстурой на среде V8. Колонии подгруппы 3 были белыми с плотным пушистым, розеточным узором на КПК, тогда как на среде V8 у них была бархатистая текстура, гладкая, слегка излучающаяся.

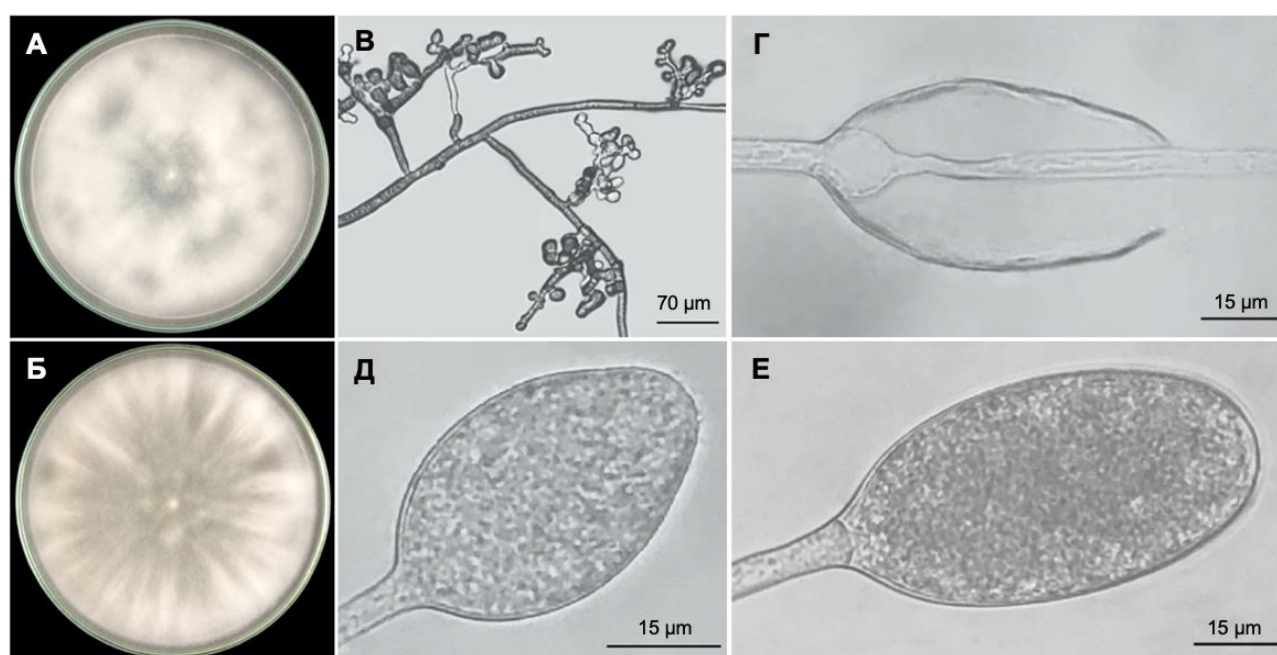


Рисунок 6. Морфология *Phytophthora parvispora* - изолята Oo10-VN. А-Б. Пятидневные культуры на питательных средах КПК и V8 соответственно; В. Типичные кораллоидные мицелии; Г-Е. Различные формы персистирующих спорангиев

Колонии подгруппы 4 проявляли пушистый рост с белым до светло-розового розеточного узора на КПК, в то время как на среде V8 они имели белый, слегка пушистый вид с пушистой текстурой. Колонии подгруппы 5 имели ватный вид воздушных мицелиев и образовывали хризантемообразный узор на КПК, в то время как воздушные мицелии ограничивались и имели свободный хризантемообразный или звездчатый узор на среде V8. На средах, затопленных

стерильной водой, они формировали обильные опухоли гиф, часто в основном в виде глобозных скоплений (рис. 6В).

Относительно скорости роста изоляты в подгруппе 4 проявили более быстрый темп роста на КПК, чем на V8. В частности, колонии *Phytophthoras spp.* в этой подгруппе достигали максимального диаметра 90 мм после 5–7 дней роста при 25°C на КПК, по сравнению с максимальным диаметром 70 мм за то же время на V8. В отличие от этого, подгруппа 2 показала более быстрый темп роста на V8, чем на КПК. Колонии подгруппы 2 достигали максимального диаметра 90 мм после 4–5 дней роста при 25°C на V8, в то время как на КПК для достижения такого же диаметра требовалось 5–7 дней. Подгруппа 1 проявила умеренный темп роста на обеих средах, с колониями, достигающими диаметра 70–80 мм после 5–7 дней при 25°C. Подгруппа 3 проявила более быстрый темп роста на V8, чем на КПК, с колониями, достигающими диаметра 80 мм после 5–7 дней роста при 25°C на V8, в то время как на КПК для достижения такого же диаметра требовалось 7–9 дней. Однако подгруппа 5 проявила более высокий темп роста на обеих средах, КПК и V8, по сравнению с представительными изолятами в четырех подгруппах (таб. 6)

Что касается морфологии спорангиев, то спорангии подгруппы 1 имели, как правило, сферическую или яйцевидную форму и варьировались в диаметре от $63,91 \pm 8,54 \times 40,43 \pm 4,53$ мкм. Они имели гладкую поверхность и выступающий сосочек на вершине, который мог иметь форму соска или купола. Напротив, спорангии подгруппы 4, как правило, были яйцевидными или сферическими и варьировали по размеру в зависимости от условий произрастания, со средним размером $59,82 \pm 10,74 \times 35,82 \pm 2,94$ мкм.

Спорангии подгруппы 2 были эллипсоидальными или яйцевидными, размерами приблизительно $54,23 \pm 5,84 \times 34,33 \pm 2,93$ мкм.

Спорангии подгруппы 3 имели сферическую или яйцевидную форму и варьировались в размерах от $52,92 \pm 6,34 \times 32,22 \pm 3,82$ мкм в диаметре. Эти спорангии появлялись на спорангиофорах, отходящих от мицелия, и обычно формировались в скопления на кончиках спорангиофоров.

В подгруппе 5 наблюдались обильные стойкие спорангии, которые в основном были яйцевидными, тупоконечными и эллипсоидными с уплощенной вершиной (рис. 6 Д, Е). Спорангии располагались терминально. После выхода зооспор часто происходило гнездовое и внутреннее разрастание спорангиев (рис. 6 Г). Часто наблюдалось размножение спорангиев вдоль одного и того же спорангиофора. Внешняя пролиферация спорангиев также наблюдалась, когда гифы зарождались близко к основанию спорангия. Полового размножения и образования хламидоспор не наблюдалось.

3.3.2. Идентификация изолятов *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 р. *Phytophthora*, ассоциированные с гуммозом стеблей цитрусовых. Мы секвенировали ген *cox1* вместе с областью ITS для идентификации современных видов р. *Phytophthora*, поскольку анализ последовательности гена *cox1*, как сообщалось, подтверждает результаты анализа последовательности области ITS в точной идентификации оомицетов, особенно рода *Phytophthora* [175].

Амплификация и секвенирование области ITS и гена *cox1* из 12 изолятов *Phytophthora* были успешно проведены, и полученные последовательности были депонированы в «GenBank» (таб. S2). BLAST-поиск по последовательностям ITS в соответствии с рекомендациями (Abad *et al.* 2023) показал, что изоляты VN-Oo58 и VN-Oo65 имеют наибольшую идентичность последовательностей (99,9%) с эталонным штаммом *P. nicotianae* (CPHST BL 44) [3]. Кроме того, изоляты VN-Oo03 и VN-Oo10 продемонстрировали 100% идентичность последовательностей с эталонным штаммом *P. parvispora* (CBS 132772).

Изоляты VN-Oo33 и VN-Oo38 имели 100% идентичность последовательностей с эталонным штаммом *P. palmivora* (CPHST BL 105). Кроме того, изоляты VN-Oo48, VN-Oo52, VN-Oo68 и VN-Oo72 показали наибольшую идентичность последовательностей (99,2%) с эталонным штаммом *P. meadii*

(CPHST BL 81). Наконец, изоляты VN-Oo76 и VN-Oo78 имели наибольшую идентичность последовательностей (99,4%) с эталонным штаммом *P. himalsilva* (CPHST BL 102). Более того, генетические последовательности *Cox1* изолятов VN-Oo58 и VN-Oo65 продемонстрировали полную идентичность (100%) с *P. nicotianae* (CPHST BL 162). Параллельно с этим, последовательности *Cox1* изолятов VN-Oo03 и VN-Oo10 проявили полную идентичность (100%) с *P. parvispora* (CPHST BL 98).

Для изолятов VN-Oo33 и VN-Oo38 их последовательности *Cox1* продемонстрировали наибольшую идентичность (99,55%) с эталонным штаммом *P. heterospora* (PH054). Аналогично, изоляты VN-Oo68 и VN-Oo72 имели наибольшую идентичность последовательностей (99,86%) с эталонным штаммом *P. citrophthora* (CPHST BL 60). Наконец, последовательности *Cox1* изолятов VN-Oo48, VN-Oo52, VN-Oo68 и VN-Oo72 продемонстрировали полную идентичность (100%) с эталонным штаммом *P. mekongensis* CBS 135136.

Идентичность 12 изолятов была дополнительно подтверждена путем выравнивания конкатенированных последовательностей ITS и *cox1* со всеми эталонными штаммами кладов 1, 1a, 1b, 1c, 2a, 4 и 7a [3] и проведения анализа максимального правдоподобия. Два изолята VN-Oo58 и VN-Oo65 образовали отдельный видовой кластер с *P. nicotianae*, получив 100 % правдоподобие. Аналогично, два изолята VN-Oo33 и VN-Oo38 образовали отдельный видовой кластер с *P. palmivora* со 100 % поддержкой. Кроме того, два изолята VN-Oo03 и VN-Oo10 образовали отдельный видовой кластер с *P. parvispora*, получив 100% поддержку. В случае четырех изолятов VN-Oo48, VN-Oo52, VN-Oo68 и VN-Oo72, они образовали отдельный видовой кластер с *P. mekongensis*, получив 98% поддержки.

Однако при определении видовой принадлежности двух изолятов VN-Oo76 и VN-Oo78 возникли трудности, поскольку они образовали хорошо поддерживаемый кластер (99%) с *P. citrophthora* и *P. occultans* (рис. 7). Филогенетический анализ с использованием метода Neighbor-Joining (данные не показаны) дал аналогичные результаты. Тем не менее, эти два вида можно было

легко отличить по морфологическим признакам, таким как характер колоний, образование хламидоспор, характеристики спорангиев и половое размножение. Изоляты VN-Oo76 и VN-Oo78 имели колонию с хризантемовым рисунком, продуцировали стойкие спорангии и многочисленные хламидоспоры, но при этом не имели полового размножения на средах. И наоборот, колонии *P. occultans* не имели уникального рисунка, а хламидоспоры отсутствовали [2]. Эти морфологические признаки указывают на принадлежность VN-Oo76 и VN-Oo78 к виду *P. citrophthora*. В заключение, было выявлено пять отдельных видов р. *Phytophthora*, включая *P. palmivora* (изоляты VN-Oo33 и VN-Oo38), *P. nicotianae* (изоляты VN-Oo58 и VN-Oo65), *P. mekongensis* (изоляты VN-Oo48, VN-Oo52, VN-Oo68 и VN-Oo72), *P. citrophthora* (изоляты VN-Oo76 и VN-Oo78) и *P. parvispora* (изоляты VN-Oo03 и VN-Oo10).

Ранее *P. parvispora* впервые была признана видом после переоценки *P. cinnamomi* var. *parvispora* в 2014 году [182]. *P. parvispora* и *P. cinnamomi* образуют группу внутри клады 7 *Phytophthora*. Эти два вида очень похожи морфологически, за исключением того, что у *P. parvispora* имеет значительно меньшие размеры спорангиев, хламидоспор, оогоний и ооспор, одноклеточные антеридии против двухклеточных антеридий у *P. cinnamomi*, а также они производят значительно меньше хламидоспор [182]. Кроме того, для *P. parvispora* характерны более высокие значения минимальных и максимальных температур для роста и более быстрый рост при оптимальных температурах [2, 182].

Хотя маркеры ITS и *cox1* могут точно определить идентичность наших изолятов *Phytophthora* spp. на уровне вида, возникает дилемма в определении подклада клады 7, к которому принадлежит вид *P. parvispora* (и *P. cinnamomi*). На основе анализа последовательностей трех генов, *cox1*, NADH дегидрогеназы субъединицы 1 (*ND1*) и фактора элонгации 1 альфа (*tef1*), вид. *Phytophthora* клады 7 изначально были разделены на три подклады, 7a, 7b и 7c, в которых *P. cinnamomi* была названа кладой 7c [114].

Позднее, на основе филогенетического анализа семи и девяти генов [223], клада 7 *Phytophthora* была разделена на 4 подклада, в которых виды *P. parvispora*

и *P. cinnamomi* были отнесены к подкладу 7с. Однако на основе филогенетического анализа ITS и *cox1*, виды *P. parvispora* и *P. cinnamomi* были отнесены к подкладу 7а [2]. Учитывая эти результаты, это первое сообщение, подтверждающее, что *Phytophthora parvispora* вызывает гуммоз и корневые гнили на цитрусовых деревьях во Вьетнаме.

Ряд авторов отмечали, что *P. parvispora* вызывает отмирание корней у *Arbutus unedo* L. в Италии [182] и неместного мексиканского апельсинового цветка (*Choisya ternata*) в Северной Америке [177]. Ранее было обнаружено, что первые известные изоляты *P. parvispora* были выделены из цитрусовых на Тайване в 1985 году [9, 182]. *P. sp. prodigiosa* и *P. sp. mekongensi* также были определены как два ранее неизвестных вида *Phytophthora*, ассоциированных с гуммозом и коричневой гнилью плодов померанца на юге Вьетнама [168].

До настоящего времени не было сообщений о *P. parvispora* как патогене цитрусовых деревьев в Юго-Восточной Азии, а также во Вьетнаме. По нашим данным, это первое сообщение о *P. parvispora* как причине гуммоза и корневой гнили цитрусовых деревьев в Юго-Восточной Азии, а также во Вьетнаме. Хотя в настоящем исследовании тесты на патогенность подтвердили, что *P. parvispora* способна вызывать бурую гниль на цитрусовых плодах, диапазон распространения *P. parvispora* по-прежнему неизвестен. Если предположить, что у *P. parvispora* может такой же круг хозяев (более 3000 видов), как у *P. cinnamomi* [84], то определение ареала распространения *P. parvispora*, выявленной в ходе данного исследования, имеет крайне важное значение.

Кроме того, поскольку *P. parvispora* и *P. cinnamomi* являются наиболее близкими родственниками и имеют общего предка, вероятно, что оба вида эволюционировали в одном регионе. Кроме того, предполагается, что Юго-Восточная Азия и ее окрестности являются центрами происхождения *P. cinnamomi* и *P. parvispora* [182]. Находки изолята *P. parvispora* VN548 (MN872758) из ризосферной почвы *Castanopsis chinensis* в национальном парке Ба-Ви на севере Вьетнама [105] и трех изолятов *P. parvispora*, связанных с цитрусовыми деревьями в этом исследовании, поддерживают эту гипотезу.

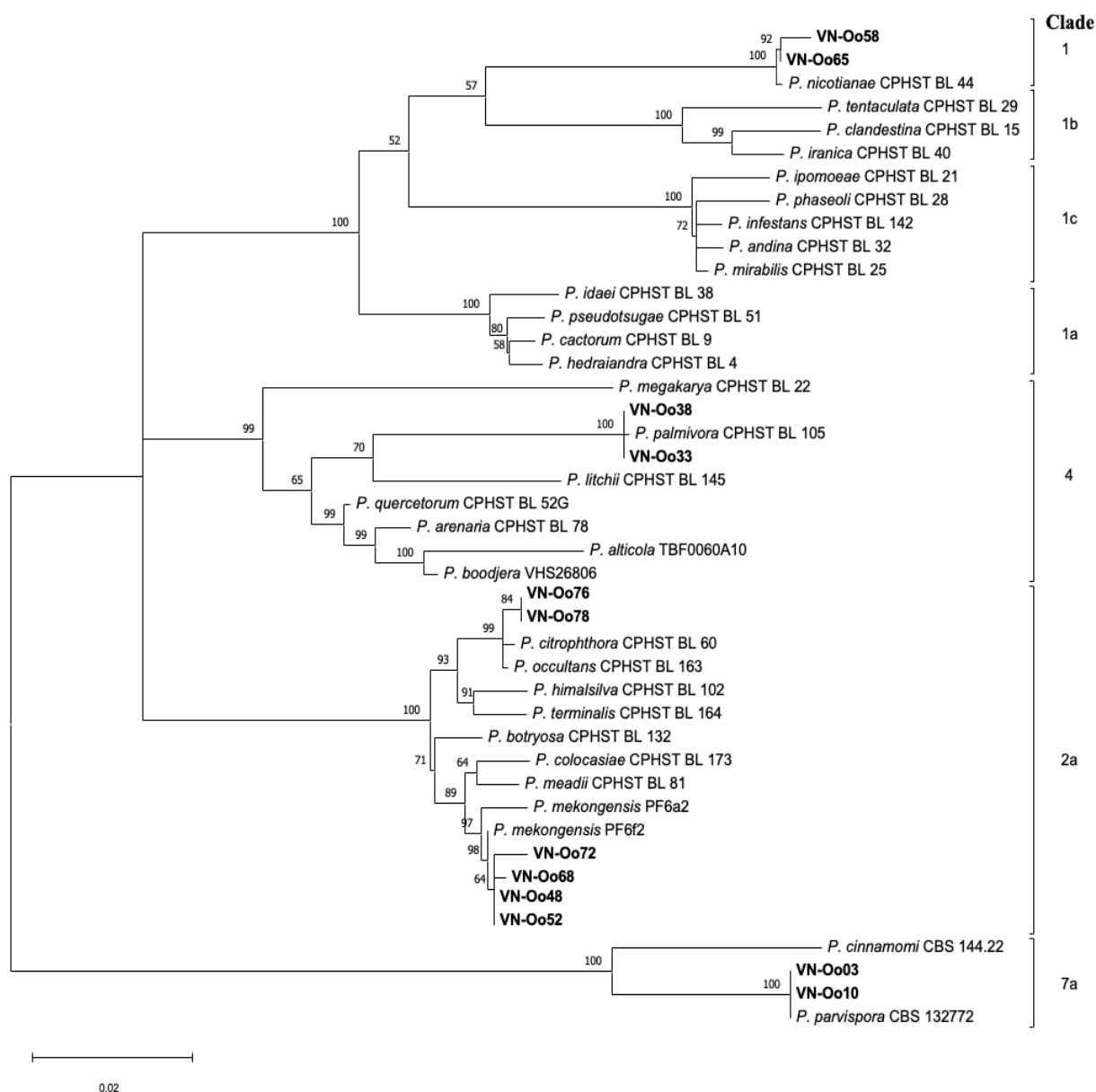


Рисунок 7. Деревья максимального правдоподобия изолятов *Phytophthora* spp., основанные на конкатенированных последовательностях ITS и *cox1*. Изоляты из Вьетнама выделены жирным шрифтом. Включены эталонные (экс-тип или хорошо аутентифицированные) штаммы клад 1, 1a, 1b, 1c, 2a, 4 и 7a *Phytophthora* spp. (идентичность штаммов приведена в таблице S2 приложения)

Хотя *P. parvispora* является новым патогеном, вызывающим гуммоз и гниль корней у цитрусовых деревьев в провинциях Туен Куанг и Фу Тхо на севере Вьетнама, в данном исследовании не было зафиксировано присутствие *P. parvispora* в ризосферной почве образцах из больных цитрусовых деревьев, собранных в других провинциях Северного Вьетнама, таких как Йен Баи и Ха

Зянг. Вероятно, это связано с менее широким распространением *P. parvispora*. Поэтому следует ввести карантинные меры для предотвращения распространения *P. parvispora* на другие территории Вьетнама, особенно на юг страны.

В настоящем исследовании *P. palmivora* была выделена из образцов, собранных в провинциях Туен Куанг и Ха Зянг, что свидетельствует о ее широком распространении на севере Вьетнама. Кроме того, [168] впервые выделили и определили *P. mekongensis* из пораженных плодов и некротических корней деревьев померанца в южном Вьетнаме (провинции Винь Лонг и Бен Тре). В данном исследовании *P. mekongensis* была выделена из больных стволов и корней апельсина, лайма и померанца, собранных в провинциях Туен Куанг и Йен Баи на севере Вьетнама.

По нашим данным, это первое сообщение о *P. mekongensis* как патогене, вызывающем гуммоз стволов и гниль плодов у цитрусовых на севере Вьетнама. Следовательно, возникает вопрос об источнике инфекции *P. mekongensis* во Вьетнаме: распространяется ли *P. mekongensis* с севера или с юга Вьетнама. 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 цитрусовых садах.

Различные виды р. *Phytophthora* были зафиксированы в одном и том же образце, что указывает на их способность к совместному заражению цитрусовых деревьев. Следовательно, возникает вопрос о том, будет ли какой-то вид р. *Phytophthora* доминировать над другими видами, что требует дополнительного долгосрочного исследования. Кроме того, интересно выяснить, является ли механизм заражения цитрусовых деревьев новым патогеном *P. parvispora* таким же, как у других распространенных видов р. *Phytophthora*.

3.3.3. Испытание патогенности изолятов *Phytophthora*

В экспериментах по инокуляции плодов помело и апельсина мицелиальной пластиной или суспензией зооспор симптомы проявлялись как у поврежденных, так и у неповрежденных плодов. Поражение появилось через 2 дня после

инокуляции и быстро увеличилось, проявив типичный симптом бурой гнили плодов, идентичные наблюдаемым в саду (рис. 8 А).

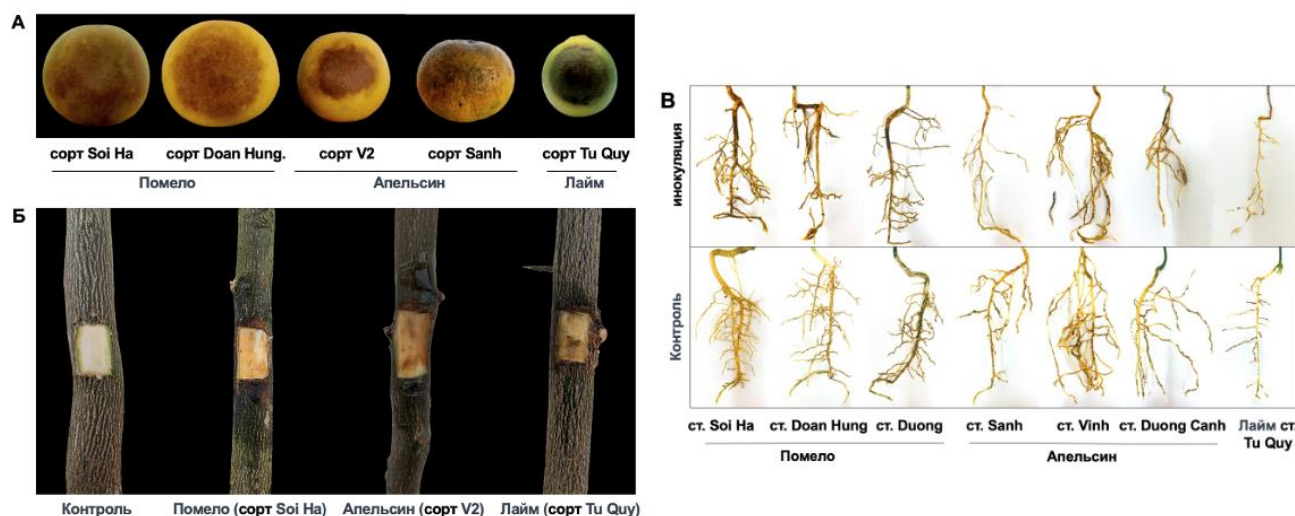


Рисунок 8. Симптомы болезни на различных частях цитрусовых деревьев, вызванные *P. mekongensis*—изолят VN-Oo68. (а) Плоды помело (сорт Soi Ha), помело (сорт Doan Hung), апельсина (сорт V2), апельсина (сорт Sanh) и лайма (сорт Tu Quy) с признаками коричневой гнили. (б) Стебли помело (сорт Soi Ha), апельсина (сорт Sanh) и лайма (сорт Tu Quy) поражены гуммозом, в то время как стебли в контроле остаются без симптомов. (в) Корни помело (сорт Soi Ha, сорт Doan Hung и сорт Duong), апельсина (сорт Sanh, сорт Vinh и сорт Duong Canh) и лайма (сорт Tu Quy) с черными и гнилыми пятнами (инокуляция), в то время как у контрольных образцов симптомы отсутствуют. Симптомы на плодах, стеблях и корнях были зафиксированы на 7, 14 и 28 дней после инокуляции, соответственно

Изоляты *Phytophthora spp.* с теми же морфологическими характеристиками, что и у изолятов *Phytophthora spp.*, использованных для инокуляции, успешно реизолировались из симптоматичных плодов, тем самым подтверждая постулаты Коха. Все виды р. *Phytophthora* могли вызывать поражения более крупного размера на плодах с симптомами поранения, а также при использовании метода инокуляции каплями суспензии зооспор. Когда плоды не имели ран, область поражения была меньше, но при этом различалась в размерах в зависимости от различных видов р. *Phytophthora*. Это указывает на то, что наличие ран на плодах цитрусовых перед инокуляцией делает их более подверженными инфекциям

Phytophthora spp. Среди различных сортов цитрусовых померанец оказался более подверженным поражению всеми видами р. *Phytophthora*. Лайм оказался наименее подверженным поражению, демонстрируя наименьшую область заболевания при всех методах инокуляции и всех видов р. *Phytophthora*. Также наши данные показывают, что помело и апельсин более подвержены инфекциям *Phytophthora spp.*, чем лайм.

При инокуляции стеблей инфекция проявлялась как на помело, так и на саженцах апельсина и лайма, наблюдалось образование гуммоза и коричневой некротической области на инокулированных участках как с поранениями, так и без них. При инокуляции корней надземные части инокулированных и неинокулированных саженцев семи сортов цитрусовых не отличались. Однако, когда растения были выкопаны для наблюдения, корневые системы инокулированных саженцев семи сортов цитрусовых показали некротические очаги от коричневого до черного цвета, которые не наблюдались у неинокулированных саженцев (рис. 8 В)

Среди различных видов р. *Phytophthora* *P. mekongensis* и *P. citrophthora* вызывали наибольшие площади поражения цитрусовых при всех методах инокуляции. *P. nicotianae*, *P. palmivora* и *P. parvispora* также вызывали значительные площади поражения, но в целом были менее агрессивны, чем *P. mekongensis* и *P. citrophthora* (рис. 8 А и таб. 7).

Эти данные свидетельствуют о том, что *P. mekongensis* и *P. citrophthora* являются наиболее агрессивными видами среди протестированных *Phytophthora spp.*, а цитрусовые, особенно помело, более восприимчивы к инфекции *Phytophthora spp.*, чем плоды апельсина и лайма. При инокуляции стебля инфекция развивалась на саженцах помело, апельсина и лайма, что привело к гуммозу и коричневой окраске некротических участков на инокулированных растениях через 7 дней (рис. 8 Б). В заключение следует отметить, что результаты данного исследования дают представление о патогенности различных видов р. *Phytophthora* на цитрусовых, подчеркивая важность метода инокуляции и сорта цитрусовых для определения тяжести заболевания.

Таблица 7. Площадь (см²) поражений, вызванных видами р. *Phytophthora* на плодах различных видов цитрусовых

Метод инокуляции	Фрукты	<i>P. palmivora</i>	<i>P. nicotianae</i>	<i>P. citrophthora</i>	<i>P. mekongensis</i>	<i>P. parvispora</i>
Кусочки агара на раненых плодах	Помело (сорт Soi Ha)	59.20 ⁱ	106.41 ^m	119.18 ^o	127.04 ^p	112.42 ⁿ
	Помело (сорт Doan Hung)	65.88 ^k	93.67 ^l	112.31 ⁿ	113.84 ⁿ	110.87 ^{mn}
	Апельсин (сорт Sanh)	29.83 ^{def}	31.44 ^{efg}	36.34 ^{gh}	35.95 ^{gh}	37.22 ^h
	Апельсин (сорт V2)	23.31 ^c	25.72 ^{cd}	33.20 ^{fgh}	27.62 ^{cde}	28.30 ^{cdef}
	Лайм (сорт Tu Quy)	9.10 ^b	9.53 ^b	12.83 ^b	14.41 ^b	13.37 ^b
	Контроль	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Кусочки агара на нераненых плодах	Помело (сорт Soi Ha)	24.63 ^{ef}	54.35 ^g	65.34 ⁱ	70.56 ^k	58.12 ^{hg}
	Помело (сорт Doan Hung)	27.90 ^f	54.92 ^g	67.11 ^{ik}	61.00 ^h	58.17 ^{hg}
	Апельсин (сорт Sanh)	12.33 ^c	21.92 ^{de}	22.99 ^{de}	22.82 ^{de}	24.39 ^{ef}
	Апельсин (сорт V2)	14.23 ^c	19.35 ^d	20.96 ^{de}	21.92 ^{de}	20.64 ^{de}
	Лайм (сорт Tu Quy)	4.39 ^{ab}	4.39 ^{ab}	4.69 ^b	4.55 ^b	3.84 ^{ab}
	Контроль	0 ^l	0 ^l	0 ^l	0 ^l	0 ^l
Капля (200 мкл) водной суспензии зооспор на нераненых плодах	Помело (сорт Soi Ha)	27.17 ^{ef}	73.59 ⁱ	77.89 ^{kl}	79.77 ^l	77.93 ^{kl}
	Помело (сорт Doan Hung)	33.47 ^g	64.77 ^h	74.85 ^{ik}	72.99 ⁱ	72.43 ⁱ
	Апельсин (сорт Sanh)	29.55 ^{fg}	29.88 ^{fg}	31.46 ^g	31.13 ^{fg}	32.27 ^g
	Апельсин (сорт V2)	15.53 ^c	22.26 ^d	23.25 ^{de}	23.93 ^{de}	25.01 ^{de}
	Лайм (сорт Tu Quy)	6.70 ^b	7.65 ^b	8.05 ^b	8.66 ^b	8.47 ^b
	Контроль	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Примечание: Средние значения в каждом методе инокуляции, как в строках, так и в столбцах, с одинаковыми буквами, не имеют статистически значимых различий ($P < 0,05$, Tukey's HSD test). Данные были записаны через 6 дней после инокуляции.

3.3.4. Чувствительность *Phytophthora spp* к фунгицидам

Пять видов р. *Phytophthora* были протестированы на чувствительность к шести фунгицидам «in vitro».

Результаты показали, что эффективность фунгицидов варьировалась в зависимости от действующего вещества и конкретного вида *Phytophthora spp*. (рис. 9 и таб. 8). Metalaxyl 500WP (металаксил) оказался наиболее эффективным препаратом, показавшим высокий процент ингибирования роста радиуса (PIRG) против всех пяти видов р. *Phytophthora* (от 74,7 до 98,4 %). Phytocide 50WP (диметоморф) и Daconil 75WP (хлороталонил) также показали высокий PIRG против большинства видов р. *Phytophthora* (от 44,1% до 68,25%). Однако Fovathane 80WP (манкозеп) и Aliette 800WG (фосэтил алюминия) показали относительно низкие значения PIRG против всех изолятов, а Agri-fos 400 (фосфонат калия) продемонстрировал умеренные значения PIRG против большинства изолятов (таб. 8).

Однако важно отметить, что результаты теста in vitro, проведенного в рамках данного исследования, могут неточно отражать фактическую эффективность фунгицидов в полевых условиях, что требует проведения дополнительных полевых испытаний по оценке эффективности данных фунгицидов в контроле *Phytophthora spp*.

Данное исследование является первым сообщением о восприимчивости *P. mekongensis* к фунгицидам с тех пор, как этот вид был впервые идентифицирован в 2017 году [168].

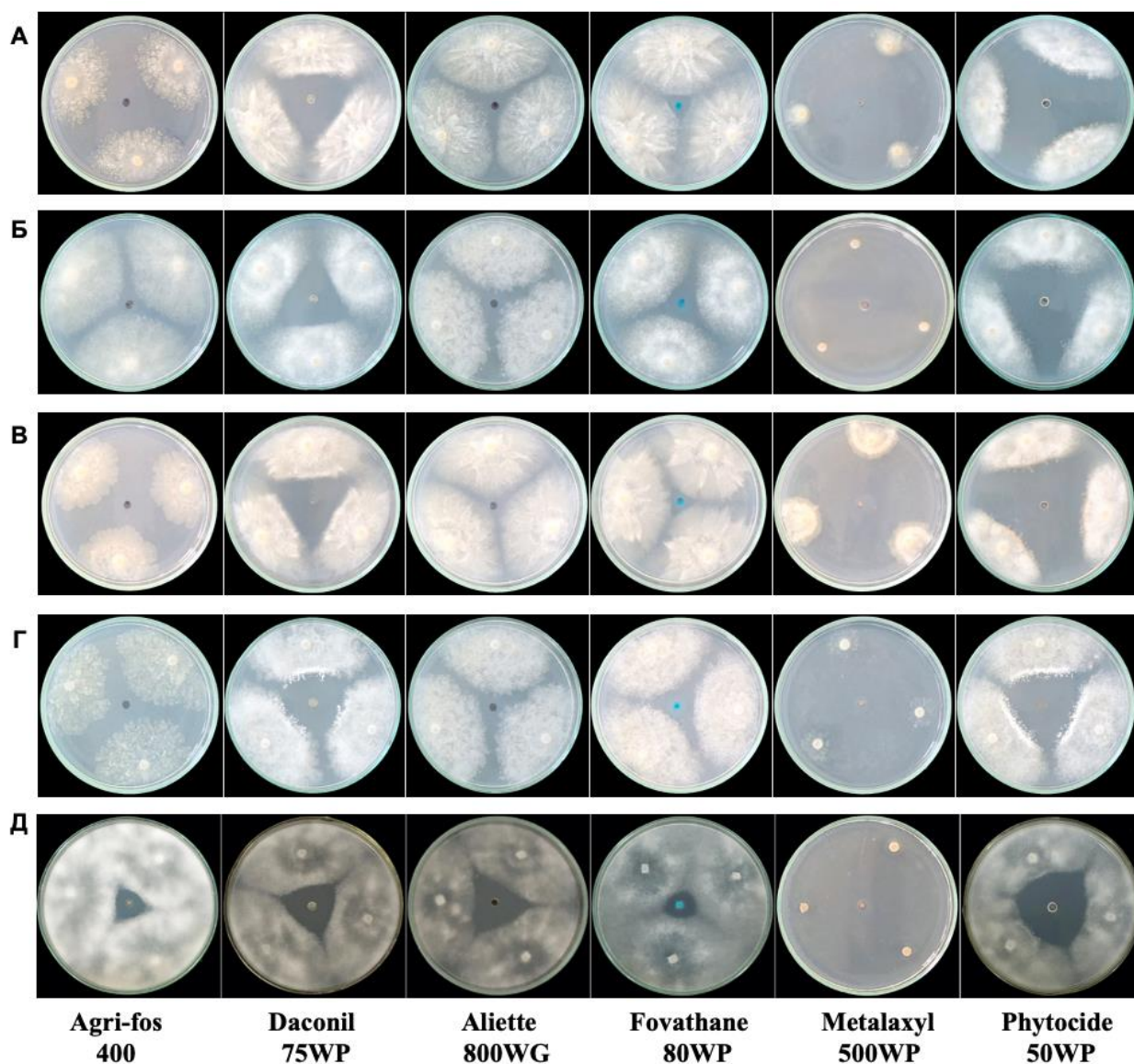


Рисунок 9. Ингибирующая активность различных фунгицидов на рост мицелия видов р. *Phytophthora*: (а) *P. mekongensis*. (б) *P. palmivora*, (в) *P. citrophthora*, (г) *P. nicotianae*, (д) *P. parvispora*

Пятьдесят микролитров испытательного раствора добавляли в каждое предварительно сделанное отверстие в центре пластины с картофельным глюкозным агаром. Затем три мицелиальных пластины помещали в три положения с равным расстоянием по окружности каждой чашки. Прозрачные зоны вокруг отверстия указывают на ингибирование роста мицелия.

Таблица 8. Чувствительность к фунгицидам видов р. *Phytophthora*, ассоциированных с гуммозом в цитрусовых

Активный ингредиент (а. и.)	Концентр ация 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>
Манкозеб 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
Фосэтил алюминия 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 К.К., Токио, Япония)

³ Aliette 800WG (Bayer, Берлин, Германия)

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

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

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

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

3.4. Первое сообщение о наличии *Pythium deliense*, ассоциированном с гуммозом во Вьетнаме

В настоящее время виды рода *Pythium* классифицируются в семействе *Pythiaceae*, порядке *Peronosporales*, отдела *Oomycota* царства *Stramenopila* (*Chromista*) [149]. Р. *Pythium* и р. *Phytophthora*, принадлежащие к одному семейству *Pythiaceae*, имеют много общих морфологических и репродуктивных характеристик. Отличие состоит в образовании и высвобождении зооспор. У р. *Pythium* дифференциация зооспор происходит внутри везикулы, которая соединяется со спорангием через короткую трубку, и зрелые зооспоры высвобождаются при разрыве везикулы. В отличие от этого, у р. *Phytophthora* зооспоры дифференцируются внутри спорангия и высвобождаются через спорангиальный апекс [86].

В 2022 году р. *Pythium* насчитывал 376 видов (www.mycobank.org). Однако многие из них либо синонимичны, либо недействительны. Исторически, в 1980-х гг было идентифицировано менее 90 видов р. *Pythium* на основе морфологических признаков, как описано в известной всеобъемлющей монографии [206], содержащей идентификационный ключ к 85 видам. После применения методов молекулярной диагностики идентификация и классификация видов *Pythium* стали более точными [120, 175, 212]. К настоящему времени подтверждено 157 видов р. *Pythium* [97]. Стоит отметить, что несколько видов р. *Pythium* [120], занимавшие ранее промежуточное положение между р. *Pythium* и р. *Phytophthora*, морфологически и филогенетически были отнесены к новому роду *Phytopythium* [16].

Виды *Pythium* являются обитателями почвы и воды и распространены по всему миру. Они могут жить сапрофитно, но в определенных условиях становятся крайне патогенными и вызывают гниль плодов, корней или стеблей, до- или послевсходовое поражение семян и проростков широкого круга растений [206]. Как и у других оомицетов, основным инокулятом р. *Pythium* являются зооспоры. Недавно многие аспекты взаимодействия между *Pythium spp.* и растениями были

прояснены на молекулярном уровне, что может объяснить некротрофный образ жизни данного патогена [120].

Цитрусовые, особенно апельсин (*Citrus sinensis*) и помело (*C. grandis*), являются одной из основных сельскохозяйственных культур во Вьетнаме. Однако одним из основных препятствий для производства цитрусовых является заболевание, проявляющееся в пожелтении листьев, гуммозе и корневой гнили, что приводит к гибели растений и значительной потере урожая [42]. Различные виды *Phytophthora* и *Pythium* ассоциируются с этим заболеванием во всем мире и во Вьетнаме также [42, 132, 168]. В ходе исследования по выявлению возбудителей болезни в цитрусовых садах на севере Вьетнама мы выделили несколько видов р. *Phytophthora* и *Pythium* из ризосферы почвы и корней цитрусовых деревьев, с симптомами поражения. Таким образом, целью данного исследования была идентификация видов р. *Pythium*, выделенных из ризосферы почвы, и выяснение его патогенности для различных видов цитрусовых культур.

3.4.1. Изоляция и идентификация изолятов *Pythium spp.*

Два изолята *Pythium spp.*, VN-Oo16 и VN-Oo29, были выделены из почвы ризосферы апельсиновых растений, проявляющих симптомы желтизны, гуммоза и корневой гнили. Эти два изолята имели идентичные морфологические характеристики. Они быстро росли и полностью колонизировали пластинки КПК или V8 через 4 дня. На КПК колонии образовывали пушистый воздушный мицелий и имели хризантемоподобный рисунок с радиальной расположением. На V8 агаре воздушный мицелий был толще и имел менее отчетливый хризантемоподобный рисунок по сравнению с теми, что культивировали на КПК (рис. 10 А, Б). Они не размножались на агаровой среде. На агарных пластинах, погруженных в воду, они образовывали множество спорангиев, которые были вздутыми и образовывали боковые ветви (рис. 10 В, Г, Д). Оба изолята имели гладкие оогонии, в основном сферические, с оогонияльными ножками, сгибающимися к моноκлинным антеридиям (рис. 10 Ж). Ооспоры имели толстую стенку (рис. 10 Е, Ё).

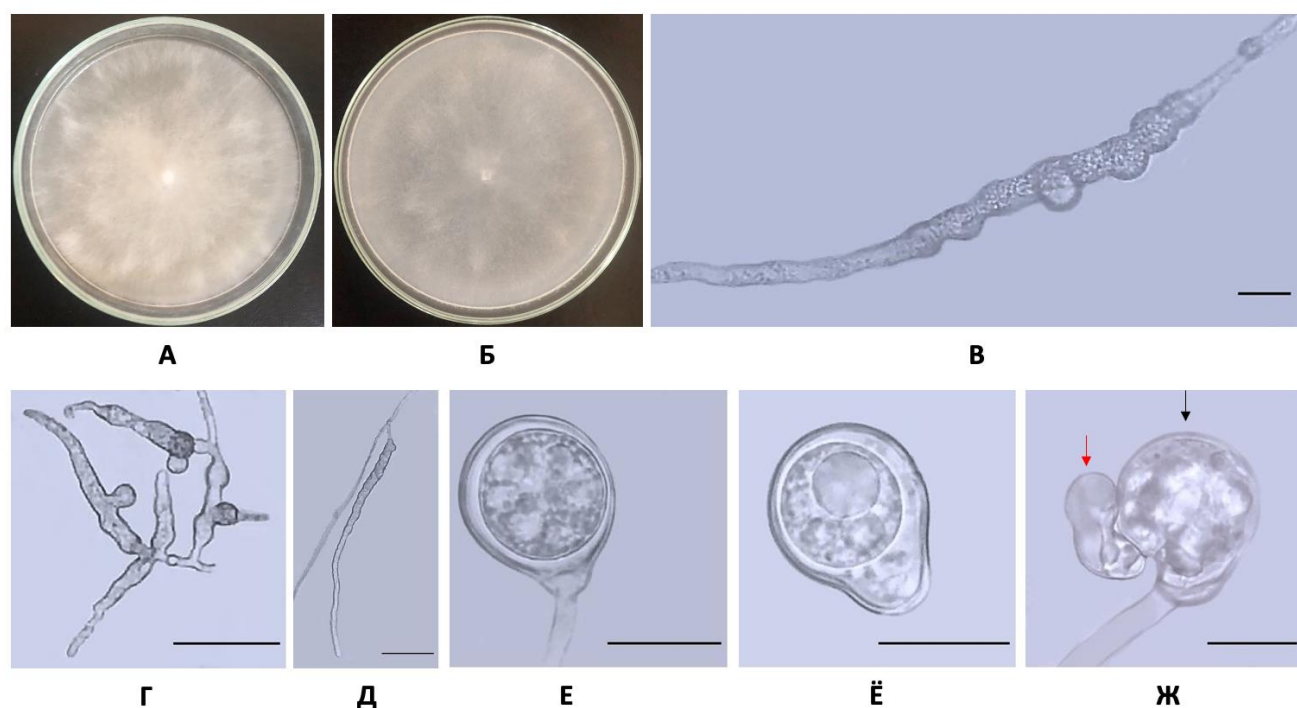


Рисунок 10. Морфология изолята Oo29-VN. а и б) Культуры возрастом 5 дней на средах КПК и V8 соответственно; в, г и д) спорангий; е и ё) ооспора; ж) антеридий (красная стрелка) вместе с оогонием (черная стрелка). Штрихи: г) 50 мкм; в, д, е, ё и ж) 15 мкм

Гены ITS и *cox1* двух изолятов *Pythium spp.* были успешно амплифицированы и секвенированы. Последовательности были депонированы в «GenBank» под номерами доступа ON573330 (ITS. VN-Ool6), ON573331 (ITS. VN-Oo29), ON563235 (*cox1*. VN-Ool6) и ON563236 (*cox1*. VN-Oo29). Последовательности ITS и *cox1* двух изолятов были первоначально проверены на наличие гомологичных последовательностей в GeneBank. Blast-поиск показал, что оба изолята *Pythium spp.* из Вьетнама наиболее тесно связаны с изолятами *P. deliense*. В ML-филогенетических деревьях ITS и *cox1* оба изолята *Pythium spp.* из Вьетнама и другие изоляты *P. deliense* из «GenBank» » образовали отдельный видовой кластер, который имел хорошее бутстреп-подтверждение (99 % для обоих маркеров). В двух деревьях правдоподобия этот видовой кластер *P. deliense* также хорошо и последовательно группировался с видовым кластером *P. aphanidermatum* в кладе A *Pythium* (рис. 11).

На основании морфологического и молекулярного анализов два изолята *Pythium spp.* были определены как вид *P. deliense*, и, следовательно, этот вид был

впервые обнаружен во Вьетнаме. *P. deliense* и другие 5 видов, *P. adhaerens*, *P. porphyrae*, *P. chondricola*, *P. monospermum* и *P. aphanidermatum*, являются членами клады А *Pythium* [120, 175]. В этой кладе *P. deliense* и *P. aphanidermatum* очень морфологически схожи [120]. *P. deliense* был впервые выделен и описан из растения табака в Индонезии в 1933 году, а затем был отмечен как вызывающий заболевания широкого круга растений в более теплых регионах мира [206].

В эксперименте по инокуляции плодов помело и апельсина симптомы проявлялись только у поврежденных плодов, зараженных либо мицелиальной пластиной, либо суспензией зооспор. Поражение появилось через 2 дня после инокуляции и быстро увеличивалось, образуя типичный симптом коричневой гнили плодов (рис. 12). Анализ плодов в этом исследовании показал, что *P. delicense*, по-видимому, опасен для плодов помело и апельсина, вызывая типичную плодовую бурую гниль; напротив, *P. irregulare*, *P. aphanidermatum*, *P. paroecandrum* и *P. ultimum* вызывал небольшие коричневые некротические поражения на поврежденной поверхности кожуры цитрусовых [132]. Наши испытания на фруктах цитрусовых растений также показали, что *P. delicense* не смог заразить напрямую через неповрежденную кожицу фрукта или не поврежденную плодоножку. Образование слоя кутикулы на кожуре и одревеснение клеток, прилегающих к зоне опадения плодоножки, во время созревания могут препятствовать прямому проникновению *Pythium spp.* в цитрусовые плоды [140, 217].

При инокуляции стебля инфекция развивалась как на саженцах помело, так и на саженцах апельсина, что приводило к гуммозу и образованию коричневых некротических участков на инокулированных участках (рис. 12). Анализ стебля в этом исследовании показал, что *P. delicense* патогенен для поврежденного стебля помело и апельсина, вызывая образование гуммоза и сосудистой гнили. И снова, заражение стебля *P. delicense* отличалось от заражения другими видами р. *Pythium*. Maseko и Coutinho (2002) при инокуляции видами *P. irregulare*, *P. aphanidermatum*, *P. paroecandrum*, *P. vexans*, *P. rostratum*, *P. ultimum* и *Pythium* группы G & F пришли к выводу, что только виды *P. irregulare*, *P. ultimum* и *P.*

paroeandrum были слабопатогенными, вызывая поверхностные поражения без гуммоза на стеблях цитрусовых с признаками поранения [132].

Недавние тесты на патогенность показали, что *P. deliense* может заражать подземные части многих растений, вызывая стручковую гниль арахиса [163], корневую гниль дынь [26], коронную и корневую гниль грецкого ореха [71] и майорана [91], а также мягкую гниль имбиря [205]. Однако, корневые тесты на семи культивах цитрусовых в данном исследовании показали, что *P. deliense* не способен заражать корень сеянцев цитрусовых культур.

Было доказано, что среди соединений, опосредующих реакции зооспор оомицетов, Ca^{2+} в окружающей среде играет важную роль [44]. В наших экспериментах по инокуляции корней отсутствие Ca^{2+} во время инокуляции могло быть фактором, влияющим на предварительное проникновение зооспор.

Кроме того, широко известно, что *Pythium spp.* относятся к некротрофным оомицетам, которые поглощают питательные вещества из лизированных клеток, а большинство представителей этой группы являются факультативными паразитами корней с широким ареалом обитания [101]. Таким образом, еще одной причиной отсутствия заражения корней цитрусовых *P. delicense* может быть несовместимое взаимодействие зооспор и корней цитрусовых в тестовых условиях. Необходимо провести дополнительные исследования для выяснения взаимодействия между *P. delicense* и корнями цитрусовых.

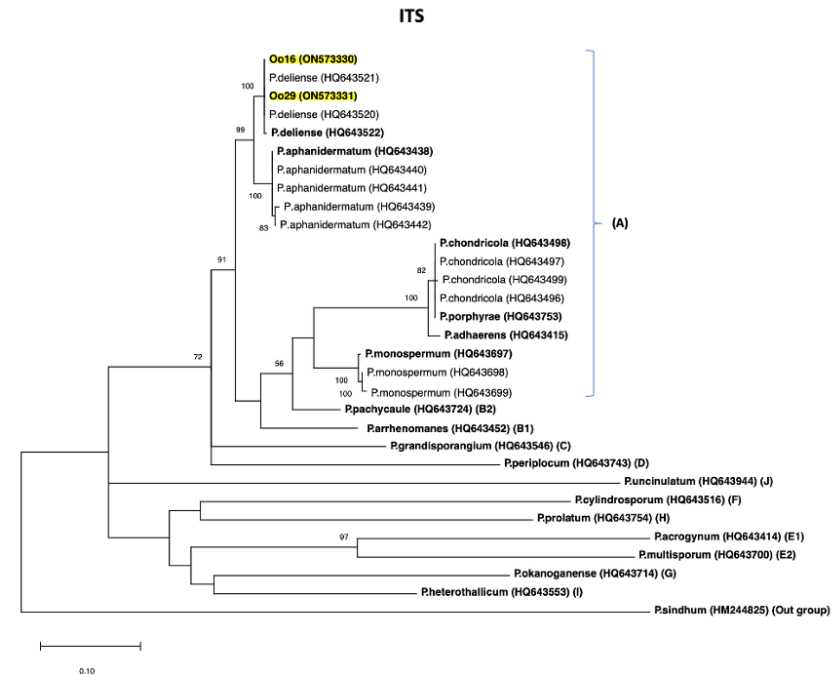
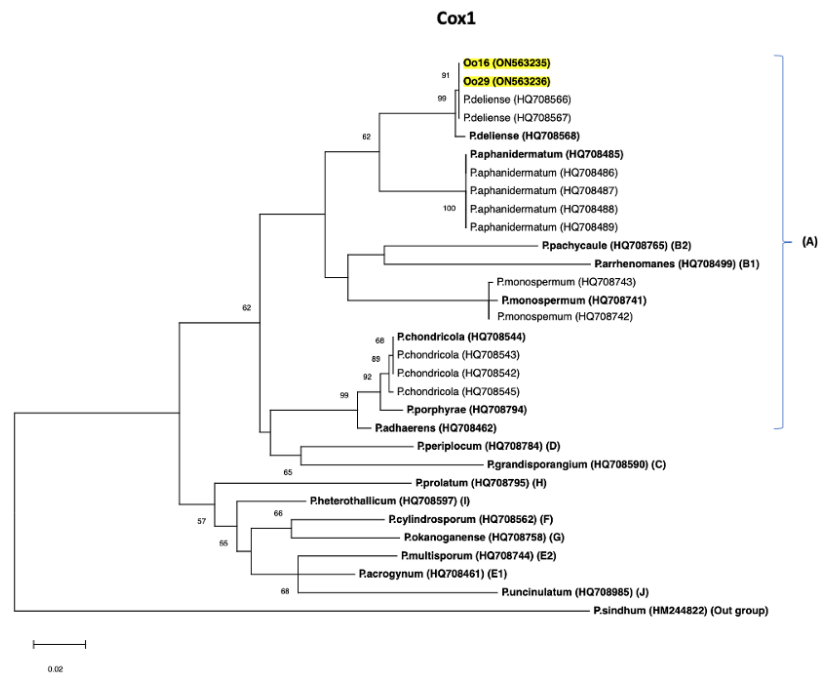


Рисунок 11. Деревья максимального правдоподобия изолятов *Pythium*, основанные на последовательностях ITS и *cox1*. Изоляты из Вьетнама выделены жирным шрифтом и заштрихованы. Экзотипические изоляты видов *Pythium*, представительных для клад A, B1, B2, C, D, E1, E2, G, H, I и J [120, 175] выделены жирным шрифтом и заключены в круглые скобки. Числа на узлах представляют значения поддержки bootstrap, рассчитанные из 1000 репликатов. Показаны только значения поддержки bootstrap, превышающие 50%



Рисунок 12. А) Стебель помело (сорт Soi Ha) и апельсина (сорт Vinh), инокулированный мицелиальной пластиной в месте ранения. Симптом был обнаружен на 14 день после инокуляции. Плоды помело (сорт Soi Ha) (Б), помело (сорт Doan Hung) (В) и апельсина (сорт Vinh) (Г), инокулированные мицелиальной пластиной на поврежденном цветоносе. Симптомы были отмечены через 7 дней после инокуляции

Это первое сообщение о нахождении *P. delicense*, выделенного из ризосферной почвы цитрусовых во Вьетнаме. *P. delicense* патогенен для стебля и плодов грейпфрута и апельсина только при инокуляции через рану. *P. delicense* не смог заразить корни саженцев грейпфрута, апельсина и лайма в тестовых условиях, что говорит о сложном взаимодействии между зооспорами этого вида и корнями цитрусовых деревьев.

3.5. Различные бактерии ризосферы с ингибирующей активностью против роста *Phytophthora spp.*

Фитофтора citrusовых - одно из самых серьезных заболеваний растений во всем мире, во Вьетнаме было выявлено 5 видов фитофторы, связанных с фитофторозом citrusовых, включая *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. parvispora*, *P. mekongensis* и *P. citrophthora*. Для контроля фитофтороза химический метод признан основным и эффективным [32]. Тем не менее, использование химических средств контроля может потенциально создавать риски для безопасности, здоровья и окружающей среды, а также способствовать появлению устойчивых к фунгицидам микроорганизмов [56]. Таким образом, разработка альтернативных стратегий контроля за этим заболеванием является необходимой.

Bacillus pumilus - это грамположительная, аэробная, палочковидная бактерия, обычно обитающая в почве [166]. Она является членом группы *Bacillus pumilus*, к которой также относятся *B. altitudinis*, *B. australimaris*, *B. safensis*, *B. xiamenensis* и *B. zhangzhouensis* [34]. Этот вид примечателен своей сильной устойчивостью к различным стрессовым факторам окружающей среды, таким как низкая доступность питательных веществ, засуха, облучение, УФ-излучение, химические дезинфицирующие средства и окислительные ферменты [49]. *Bacillus pumilus* рассматривается как потенциальная часть системы интегрированной защиты для контроля почвообитающих возбудителей болезней растений [21, 70]. Например, *B. pumilus* HR10, выделенный из ризосферы *Pinus thunbergii*, проявил замечательную ингибирующую активность против *Rhizoctonia solani*, вызывающей заболевание семян сосны [232]. *Bacillus pumilus* W-7 продемонстрировал способность ингибировать рост мицелия *Phytophthora infestans* [218].

Кроме того, сообщается о сильной антагонистической активности «in vitro» *B. pumilus* PTB180 против семи возбудителей болезней растений, включая *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum* и *Botrytis cinerea* [21]. Помимо своих способностей контролировать болезни, *Bacillus pumilus* оказывает прямое влияние на стимулирование роста растений. Например, *B. pumilus* TRS-3, выделенный из

ризосферы чайных кустов, был отмечен в производстве индола 3-уксусной кислоты (ИУК), сидерофоров и также участвует в растворении фосфатов [29]. Исследования, проведенные на жидкой среде Мурсиге Скуга, доказали, что штамм *B. pumilus* LZP02 способствует росту риса за счет увеличения таких параметров, как длина корней, площадь поверхности корней, количество узлов, корневых кончиков, ответвлений и содержание хлорофилла [122].

Кроме того, применение *B. pumilus* LZP02 привело к увеличению уровня азота, фосфора, кальция и магния в корнях риса [122]. Кроме того, Управление по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA) присвоило статус GRAS (аббревиатура от "generally recognized as safe") таким видам, как *B. subtilis*, *B. licheniformis* и *B. pumilus* [GRAS Notice Inventory|FDA].

В настоящее время во Вьетнаме нет задокументированных случаев применения агентов биологического контроля (АБК) для борьбы с *Phytophthora spp.* на цитрусовых растениях. В результате основной целью данного исследования является выделение АБК с антагонистическими свойствами против *Phytophthora spp.* из ризосферы здоровых цитрусовых растений.

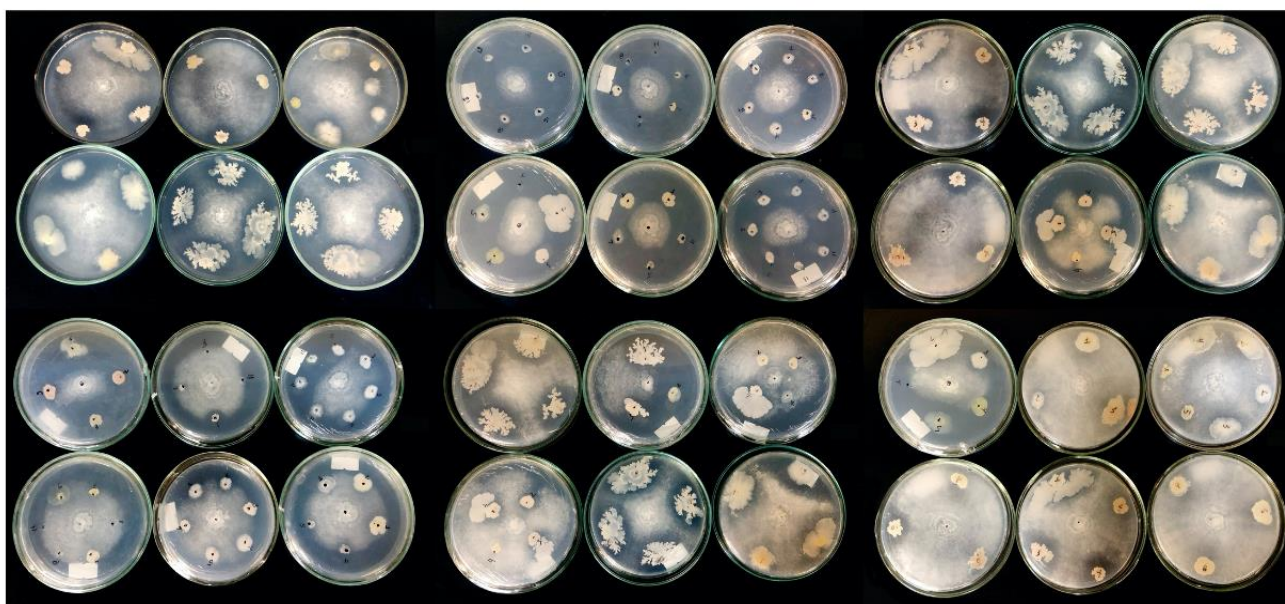


Рисунок 13. Бактериальные штаммы при подавлении колоний *Phytophthora spp.* на КПК

Из 143 полученных бактериальных штаммов (рис. 13) четыре, обозначенные как VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13, проявили значительную антагонистическую

активность. Эта оценка включала наблюдение за зонами ингибирования, когда они подвергались конфронтации с пятью патогенными изолятами *Phytophthora* spp., (таблица 9).

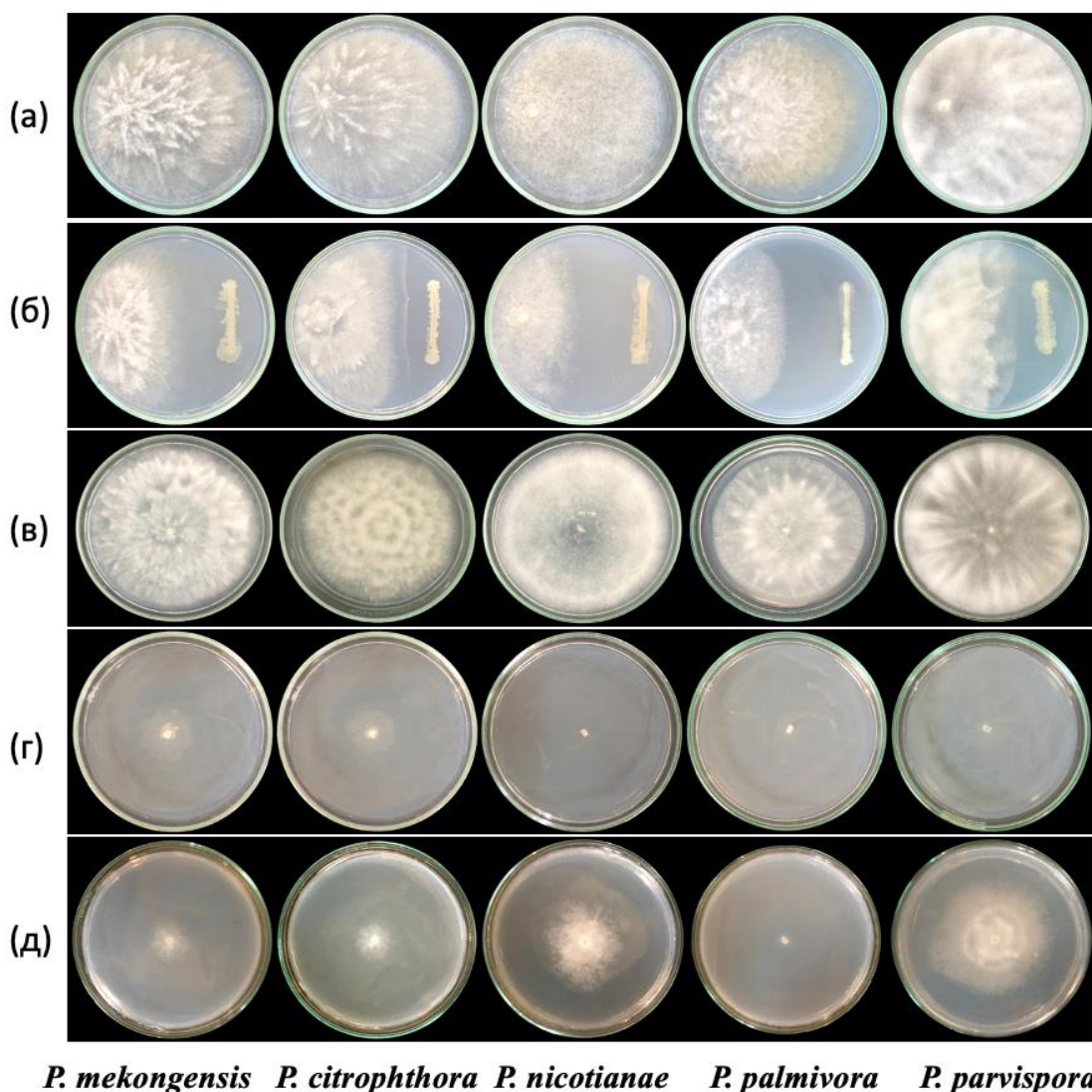


Рисунок 14. Оценка антагонистического потенциала бактериального изолята VN-K13 против пяти видов р. *Phytophthora*. (а, в) Контроль; (б) Оценка антагонистической активности с помощью пластинчатой конфронтационной культуры; (г) Оценка антагонистической активности диско-диффузионным методом; (д) Обнаружение летучих органических соединений. Данные были собраны после 10-дневного инкубационного периода при 28°C

Штамм VN-K13 выделялся как наиболее эффективный, проявляя значения процентного ингибирования радиального роста (PIRG) в диапазоне от 53,13% до 68,31%. Эти значения свидетельствуют о его исключительной способности

препятствовать радиальному распространению видов *Phytophthora*. Штаммы VN-F8 и VN-H8 также проявили значительную антагонистическую активность, хотя и немного менее мощную по сравнению с изолятом VN-K13. При этом VN-H5 продемонстрировал наименьший уровень антагонистической активности, со значениями PIRG от 43,54% до 66,07%. Тем не менее, в отдельных случаях он демонстрировал достаточно эффективное ингибирующее воздействие (рис. 14).

Таблица 9. Определение антагонистической активности

Антагонистическая активность	штаммы	PIRG (%)*				
		<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P.</i>	<i>P.</i>
		<i>palmivora</i>	<i>mekongensis</i>	<i>nicotianae</i>	<i>citrophthora</i>	<i>parvispora</i>
Пластиноч- контронтационн ая культура	VN-H5	43.70 ^a	57.55 ^{ab}	66.07 ^b	52.55 ^{ab}	43.54 ^a
	VN-H8	61.02 ^b	55.72 ^{ab}	65.94 ^b	55.30 ^{ab}	55.66 ^{ab}
	VN-F8	68.07 ^b	59.68 ^b	65.00 ^b	54.50 ^{ab}	54.39 ^{ab}
	VN-K13	68.31 ^b	59.06 ^{ab}	65.46 ^b	55.61 ^{ab}	53.13 ^{ab}
Диско- Диффузионный	VN-H5	90.43 ^g	79.29 ^d	99.59 ^{kl}	69.97 ^a	99.80 ^l
	VN-H8	95.83 ^h	80.52 ^e	98.56 ^{ik}	75.58 ^b	95.85 ^h
	VN-F8	99.98 ^l	82.44 ^f	97.59 ⁱ	77.58 ^c	90.96 ^g
	VN-K13	99.97 ^l	82.12 ^f	99.95 ^l	79.59 ^{de}	99.98 ^l
Органические летучие соединения	VN-H5	75.13 ^{def}	69.87 ^{cd}	53.11 ^b	80.23 ^{fg}	30.28 ^a
	VN-H8	64.03 ^c	72.82 ^{de}	57.01 ^b	83.36 ^g	31.21 ^a
	VN-F8	76.94 ^{efg}	78.38 ^{efg}	56.81 ^b	82.24 ^g	32.66 ^a
	VN-K13	90.72 ^h	81.62 ^{fg}	56.60 ^b	81.88 ^{fg}	31.27 ^a

Примечание: Средние значения в каждом методе в обеих колонках и рядах, за которыми следуют одни и те же буквы, не имеют статистически значимых различ (p < .05, Tukey's HSDtest). Данные были записаны через 7 дней.

В проведенных опытах штамм 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. В целом, эти результаты подчеркивают последовательную эффективность VN-K13 и VN-F8 в ограничении радиального роста различных видов р. *Phytophthora* с помощью различных методов оценки, что подчеркивает их потенциал для интеграции в стратегии биологического контроля.

3.5.1. Идентификация антагонистических бактерий

В нашем таксономическом исследовании для определения видов использовалась полимеразная цепная реакция (ПЦР) для амплификации генетических последовательностей 16S РНК и двух генов домашнего хозяйства, *gyrB* и *pyrE*. Впоследствии эти последовательности были конкатенированы в определенном порядке: 16S РНК - *GyrB* - *PyrE*. Этот генетический анализ был проведен на четырех различных бактериальных штаммах *Bacillus spp.*, обозначенных как VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13. Результаты анализа показали 100 % идентичность последовательностей, что позволило отнести все четыре штамма к одному филогенетическому кластеру с *Bacillus pumilus*, входящему в группу *pumilus*, которая включает в себя различные родственные виды, такие как *B. altitudinis*, *B. australimaris*, *B. safensis*, *B. xiamenensis*, *B. aerophilus* и *B. zhangzhouensis*. Стоит отметить, что различать бактерии внутри группы *B. pumilus* довольно сложно из-за их высокого сходства последовательностей [124].

Идентичность четырех штаммов 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% подтверждением (рис. 15). В совокупности эти результаты подтвердили идентичность VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13 как *B. pumilus*.

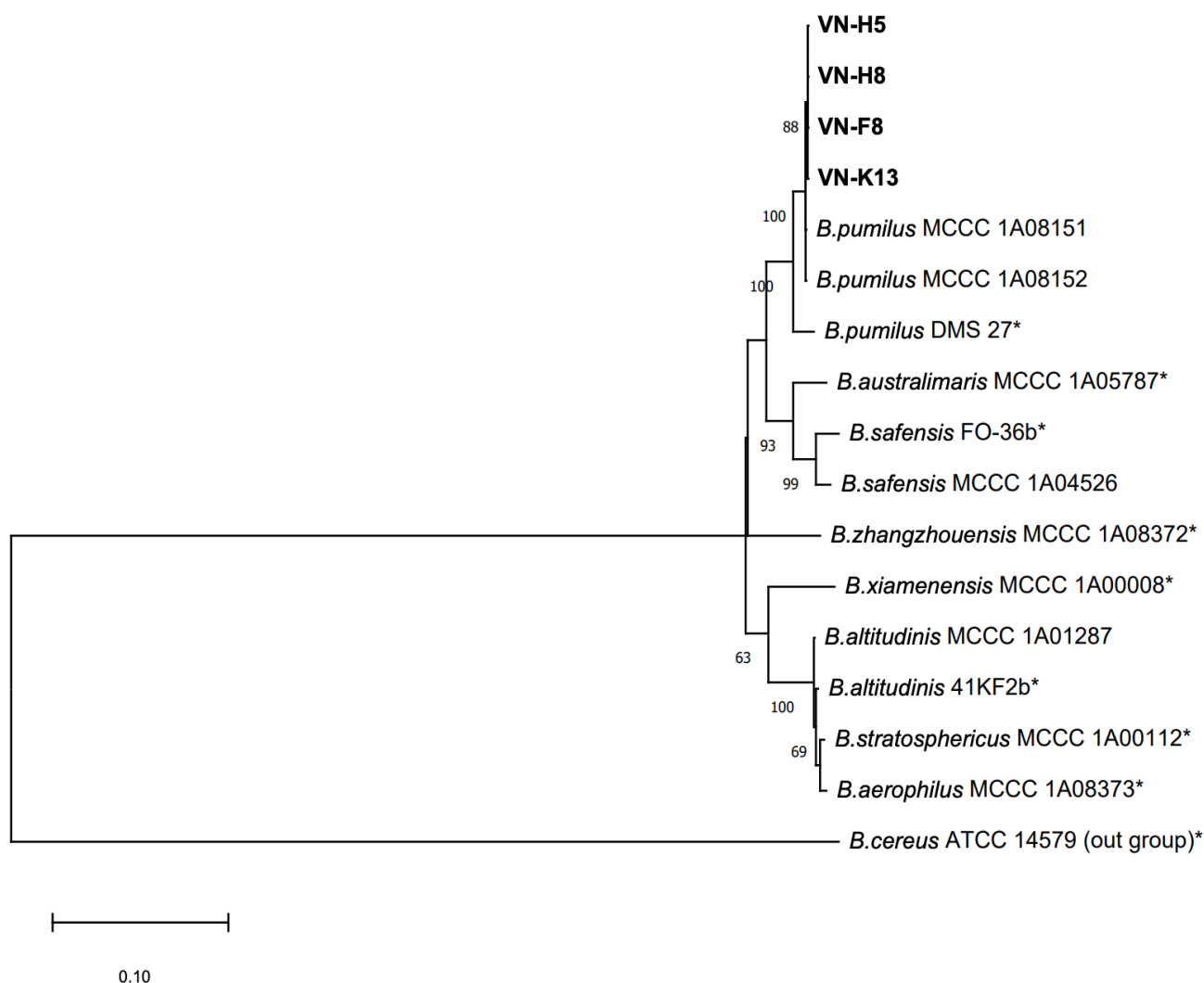


Рисунок 15. Филогенетическое дерево максимального правдоподобия для 16 штаммов группы *Bacillus pumilus* на основе модели TN 93 + G + I с использованием конкатенированных последовательностей 16S рРНК, *gyrB* и *pyrE*. На рисунке 15 изоляты из Вьетнама выделены жирным шрифтом. Включены референтные (экс-тип или хорошо аутентифицированные) штаммы группы *pumilus* (идентификация штаммов приведена в дополнительной таблице S2 приложения)

Как уже отмечалось, что *B. pumilus* является агентом биологического контроля против нескольких патогенов растений, включая *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora infestans* [21, 218]. Данное исследование подтверждает, что *B. pumilus* эффективно контролирует пять видов рода

Phytophthora, поражающих цитрусовые деревья. Кроме того, это первое применение *B. pumilus* в экспериментах по борьбе с фитофторой на цитрусовых деревьях во Вьетнаме и во всем мире. В условиях совместного культивирования очевидно, что ингибирование мицелия *Phytophthora spp.* происходит в присутствии *B. pumilus* даже без прямого физического контакта (рис. 14). Это убедительно свидетельствует о том, что *B. pumilus* способен продуцировать как диффузионные, так и летучие соединения, что приводит к подавлению *Phytophthora spp* (рис. 14). Эти результаты согласуются с литературными данными, демонстрирующими мощную противогрибную активность бацилл за счет продукции вторичных метаболитов [80, 123].

Хотя известно, что эти штаммы продуцируют противогрибные летучие органические соединения, в нашем исследовании их не удалось идентифицировать.

3.5.2. Ферменты, продуцируемые *Bacillus pumilus*

Результаты проведенного нами теста на обнаружение индол-3-уксусной кислоты (ИУК) показали, что после 24-часовой инкубации только штамм VN-K13 демонстрировал выработку ИУК. Это было обнаружено по появлению красного оттенка в реактиве Сальковского. Кроме того, оба штамма VN-H5 и VN-K13 продемонстрировали способность вырабатывать аммиак (NH_3), что проявилось в изменении цвета реактива Несслера. Важно отметить, что все четыре штамма оказались способны продуцировать сидерофоры, что проявлялось в преобразовании синего оттенка индикаторного раствора Chromium Azurol S (CAS) в желтый (рис. 16).

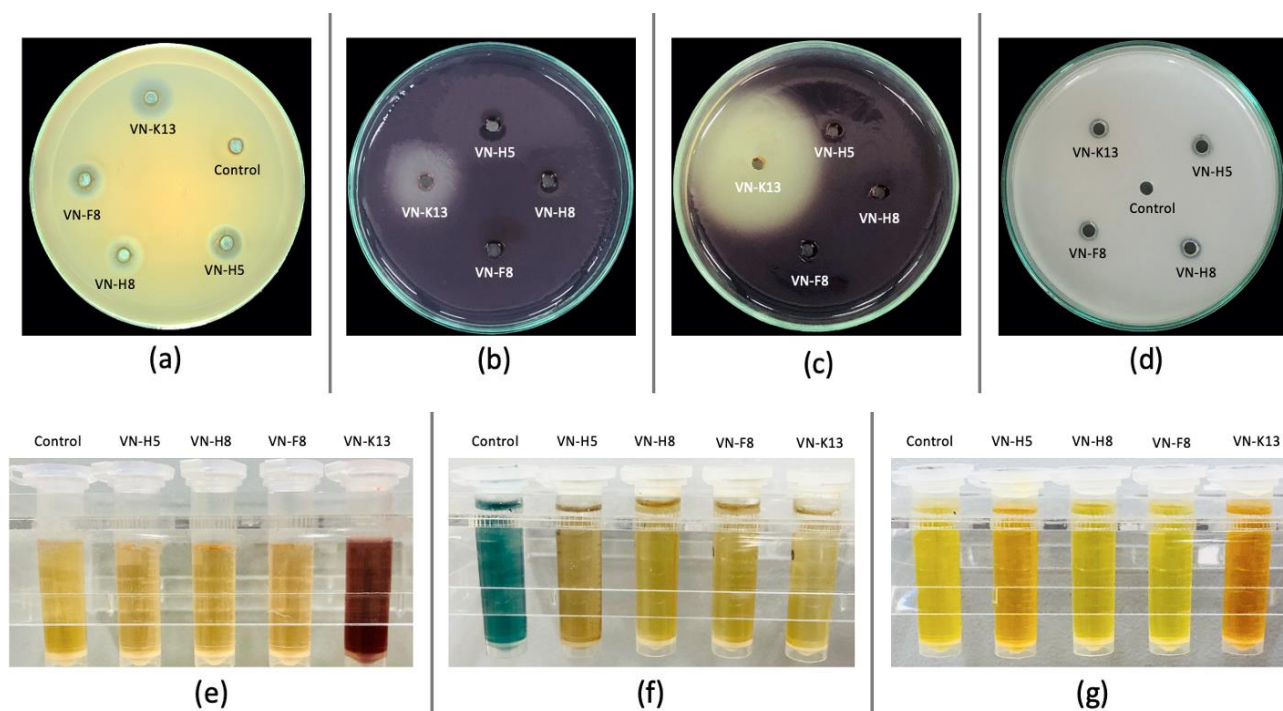


Рисунок 16. Биохимические характеристики штаммов *Bacillus pumilus*. Представленные характеристики включают: (а) фермент протеазы; (б) фермент хитиназы; (в) фермент целлюлазы; (г) фермент фосфатазы; (е) продукцию ауксина; (ж) продукцию сидерофоров; (з) продукцию аммиака. Каждый эксперимент проводился независимо и повторялся три раза

В экспериментах по индукции ферментов только бактериальный штамм VN-K13 демонстрировал продукцию ферментов целлюлазы и хитиназы, о чем свидетельствовало отчетливое образование ярких зон вокруг точки инокуляции в агаре, содержащем дрожжевой экстракт с добавлением 0,5% КМЦ (карбоксиметилцеллюлозы) и 1,2% коллоидного хитина. Все четыре бактериальных штамма VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13 демонстрировали выработку ферментов протеазы при культивировании в среде, содержащей 2% желатина. Кроме того, они продуцировали фермент амилазу в среде, содержащей 2% растворимого крахмала, и продемонстрировали способность солюбилизировать фосфаты после 72 часов инкубации в среде NBRIP. 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. Подробная информация представлена в таблице 10.

Таблица 10. Биохимические характеристики штаммов *Bacillus pumilus*

Биохимический тест	Изоляты бактерий			
	VN-H5	VN-H8	VN-F8	VN-K13
Протеаза	+	+	+	+
Хитиназа	-	-	-	+
Целлюлаза	-	-	-	+
β -1,3-глюканаза	-	-	-	-
Амилаза	+	+	+	+
Индолилуксусная кислота (ИУК)	-	-	-	+
Сидерофор	+	+	+	+
Аммиак	+	-	-	+
Фосфат	+	+	+	+
Каталаза	+	+	+	+
Цитрат	-	-	-	-
Липаза	-	-	-	-
Уреаза	-	-	-	-

Примечание: +: положительный; -: отрицательный

Все бактериальные штаммы в данном исследовании показали способность продуцировать сидерофоры. Синтез сидерофоров представляет собой фундаментальный защитный механизм против патогенов растений [65]. Железо является необходимым элементом для репликации ДНК и дыхания живых организмов. Однако доступность железа в природных экосистемах ограничена из-за плохой растворимости ионов Fe^{3+} в почве. Сидерофоры обладают замечательной способностью хелатировать железо из окружающей среды, переводя его в формы, доступные для роста микроорганизмов [179]. Микроорганизмы-антагонисты могут эффективно закрепиться на растениях-хозяевах, продуцируя сидерофоры, облегчая получение железа для своего питания и одновременно препятствуя распространению патогенов растений за

счет конкуренции за это жизненно важное питательное вещество [61]. Кроме того, следует отметить, что штамм VN-K13 секретирует целый ряд ферментов, некоторые из которых, как сообщалось, также участвуют в антагонистических взаимодействиях с фитопатогенными грибами, например протеазы [68], хитиназы [126, 136].

Изучение под световым микроскопом выявило аномальную морфологию гиф фитопатогенных оомицетов, обработанных *B. pumilus*, включая набухание и деформацию (неопубликованные данные). Клеточная стенка оомицетов в основном состоит из 80-90 % глюкана и 5-10 % белка, которые играют решающую роль в поддержании целостности клеточной стенки [85, 138]. Ферменты, разрушающие клеточную стенку, продуцируемые бактериями-антагонистами, могут оказывать прямое ингибирующее действие на клеточную стенку многих патогенов оомицетов. В частности, β -1,3-глюканаза и протеаза хорошо известны своей способностью разрушать и лизировать клеточные стенки оомицетов [60, 189]. Протеазная активность заключается в гидролизе одной или нескольких пептидных связей путем добавления воды для высвобождения пептидов или аминокислот [195]. Следовательно, эти ферменты могут разрушать гликозидные связи в полисахаридах клеточной стенки, тем самым снижая рост клеточной стенки, верхушки гиф и прорастающей трубки. Они также вызывают морфологические изменения, такие как разрушение гиф и образование единичных, аномальных вздутий вдоль поверхности гиф [60, 195]. В предыдущем исследовании (El-Sayed *et al.* 2018) было показано, что литические ферменты, продуцируемые *Pseudomonas species* EA6, могут гидролизовать клеточную стенку *Phytophthora parasitica* [60], что согласуется с результатами данного исследования.

Помимо роли ингибитора *Phytophthora spp.*, бактериальный штамм VN-K13 также продуцирует ИУК - растительный гормон, ранее обнаруженный у различных видов р. *Bacillus* и признанный веществом, стимулирующим рост растений [145]. Вырабатываемая бактериями ИУК стимулирует увеличение площади и длины корневой поверхности, тем самым повышая способность

растений получать доступ к питательным веществам почвы и облегчая поглощение воды [210]. Кроме того, ИУК продуцируемый бактериями, известна своей способностью размягчать клеточные стенки растений, что приводит к увеличению корневой экссудации, которая, в свою очередь, обеспечивает дополнительные питательные вещества, поддерживающие рост ризосферных бактерий [94]. Известно, что ауксин активирует протонные насосы H^+ -АТФазы плазматической мембраны, которые, в свою очередь, закачивают протоны (H^+) в матрикс клеточной стенки, что приводит к ее подкислению в диапазоне pH от 4,5 до 6 [129, 165, 193]. Подкисление клеточных стенок повышает активность таких структурных белков, как экспансины (exps), экстенсины (exts) и арабиногалактановые белки (agps) [129, 165, 193].

Экспансины, функционируя как неферментативные разрыхлители стенок, разрушают водородные связи между микрофибриллами целлюлозы и соединяющими их гемицеллюлозами [129, 165, 193]. Активация H^+ -АТФазы плазматической мембраны приводит к гиперполяризации мембранного потенциала и запуску вольтаж-зависимого внутреннего транспорта K^+ , способствующего притоку ионов калия (K^+) в цитозоль. Это, в свою очередь, способствует поглощению воды (H_2O) и поддерживает растягивающее напряжение [129]. Как следствие, клеточные стенки расширяются, вызывая укрупнение клеток и тем самым увеличивая длину корня [129]. Кроме того, ауксин играет важную роль в качестве сигнальной молекулы во время развития боковых корней. Он запускает начальное митотическое деление клеток-основателей боковых корней в ткани перицикла, тем самым инициируя образование боковых и придаточных корней [99, 159]. В связи с этим считается, что штамм VN-K13 также обладает потенциалом для стимулирования роста растений.

3.5.3. Гены биосинтеза *Bacillus pumilus*, кодирующие противогрибные соединения

Производство противогрибных соединений играет ключевую роль в защитных механизмах, используемых агентами биологического контроля (АБК),

полученными из видов *Bacillus*, против патогенов. Эти соединения могут напрямую бороться с патогенными микроорганизмами. Исследование антибактериальной резистентности включало проведение амплификации с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфических пар праймеров. Шесть пар праймеров были использованы для амплификации генов, кодирующих антибактериальные свойства четырех бактериальных изолятов. Положительные амплификации были выявлены с помощью пары праймеров *bacA*, связанной с производством бацитизина, 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. 17).

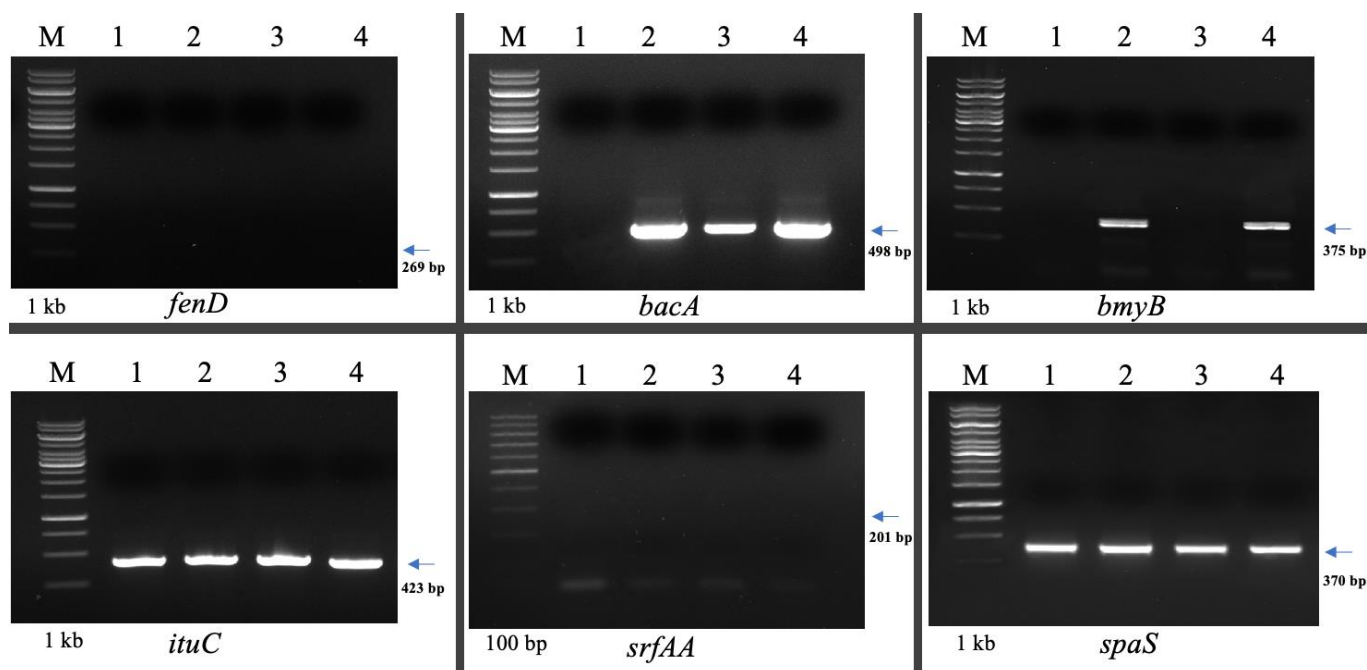


Рисунок 17. Наличие шести генов антимикробных пептидов было определено в соответствующих изолятах *Bacillus*. М: маркер 1 кб (*bmyB*, *fenD*, *ituC*, *bacA* и *spaS*). М: маркер 100 п.н. (*srfAA*); Линия 1: VN-H5. Линия 2: VN-H8. Линия 3: VN-F8. Линия 4: VN-K13

Чтобы определить какие противогрибные соединения могут синтезироваться штаммами *B. pumilus*, в исследовании было изучено наличие генов, ответственных за биосинтез специфических антимикробных антибиотиков, таких как бацилломицин, итурин, бацилизин, субтилин, фенгицин и сурфактин, с помощью ПЦР. Выявление бактерий, продуцирующих эти специфические антибиотики, с помощью ПЦР предпочтительнее методов скрининга и случайного выделения благодаря своей эффективности и меньшим затратам времени. В результате было обнаружено, что наш штамм VN-K13 содержит гены, включая *bmyB*, *ituC*, *bacA* и *spsA*, которые кодируют такие известные противогрибковые соединения, как бацилломицин, итурин, бацилизин и субтилин. Полученные данные свидетельствуют о том, что эти штаммы *B. pumilus* обладают потенциалом для производства целого ряда антибиотиков. Это открывает путь к исследованию того, играет ли совокупное действие этих антибиотиков роль в подавлении болезни, или это результат действия отдельных антибиотиков, и служит ли это конкурентной стратегией против других микроорганизмов. Существование биосинтетических генов, ответственных за производство антибиотиков, может служить правдоподобным обоснованием противогрибных свойств, наблюдаемых у этих штаммов *B. pumilus* [67].

Таким образом, наше исследование дает убедительные доказательства, подтверждающие ключевую роль генов, кодирующих липопептиды, в борьбе с *Phytophthora spp.* Способность бактерий синтезировать липопептиды имеет решающее значение для оценки их потенциала в качестве агента биологического контроля (АБК) против патогенов растений [48]. Ризобактерии, стимулирующие рост растений (PGPR), продуцируют различные антибиотические соединения, среди которых липопептиды вносят значительный вклад в противогрибную активность видов р. *Bacillus* [25]. Cao *et al.* (2018) показали, что итурин и фенгицин, секретируемые *B. velezensis*, отвечают за его антимикробные свойства, а сурфактин участвует в формировании биопленки и подвижности клеток, что крайне важно для успешной колонизации ризосферы [25]. *Bacillus velezensis* отличается универсальностью в производстве антибиотических соединений,

включая сурфактин, итурин, фенгицин, эрицин и другие [5]. Zalila-Kolsi *et al.* (2016) отметили антигрибную активность широкого спектра действия *B. amyloliquefaciens* и *B. subtilis*, продуцирующих итурин и сурфактин, а также сурфактин и фенгицин, соответственно, против различных фитопатогенных грибов [226]. Gong *et al.* (2015) сообщили, что и итурин А, и плипастатин (фенгицин А) проявляют фунгицидную активность, причем итурин А при более низких концентрациях более эффективен, чем плипастатин А [73].

Кроме того, обработка этими молекулами вызывает деформации и повреждения в морфологии гиф [73]. Toral *et al.* (2018) показали, что биоконтролю *Botrytis cinerea* с помощью *Bacillus* XT1 способствуют липопептиды, что позволяет предположить, что структура мицелия *B. cinerea*, вероятно, разрушается под действием этих соединений [200]. Важно отметить, что данное исследование является первым случаем идентификации штаммов VN-K13 и VN-F8 как положительных по наличию гена *Bacylomycin B*. Тем не менее, необходимо провести дополнительные исследования, поскольку это наблюдение может быть связано с нарушением переноса 4'-фосфопантетеина от коэнзима А к пептидилтранспортному белку, что может быть вызвано мутациями в гене *sfp* [146], в результате чего вышеупомянутые штаммы не способны продуцировать какой-либо липопептид.

В текущей работе мы исследовали биологический контрольный штамм, который может быть использован в качестве альтернативного агента для борьбы с болезнями *Phytophthora spp.* у цитрусовых деревьев. Наши экспериментальные результаты значительно расширили всестороннее понимание потенциальных антигрибковых механизмов действия *B. pumilus* VN-K13. Он обладает потенциалом для развития как биологического агента защиты и биоудобрения благодаря наличию генов, кодирующих антимикробные антибиотики, такие как бацилломицин, итурин, бацилисин, субтилиин, его способности производить ИУК, сидерофоры и различные ферменты. Это первое исследование, сосредоточенное на биологическом контроле цитрусовых с использованием антагонистической бактерии *B. pumilus*.

3.6. Влияние бактериального раствора *Bacillus pumilus* на зооспоры *Phytophthora*

Различий в корневых системах между инокулированными *Bacillus* и неинокулированными (отрицательный контроль) саженцами всех цитрусовых сортов не наблюдалось (рис. 18). Микроскопическое наблюдение не выявило появления ни мицелия, ни спор *Phytophthora spp.* на корнях и лепестках роз, служивших приманкой, что говорит о том, что *P. parvispora* не может заразить корни 7 цитрусовых растений в присутствии раствора *Bacillus pumillus*. При наблюдении за положительным контролем корневая система сеянца потемнела, а кора корней начала отслаиваться. Как на корнях, так и на лепестках роз появились мицелий и споры гриба *Phytophthora parvispora*. Изоляты *Phytophthora spp.* с такой же морфологией, как у изолята VN-Oo10, были успешно выделены из зараженных корней и лепестков роз.

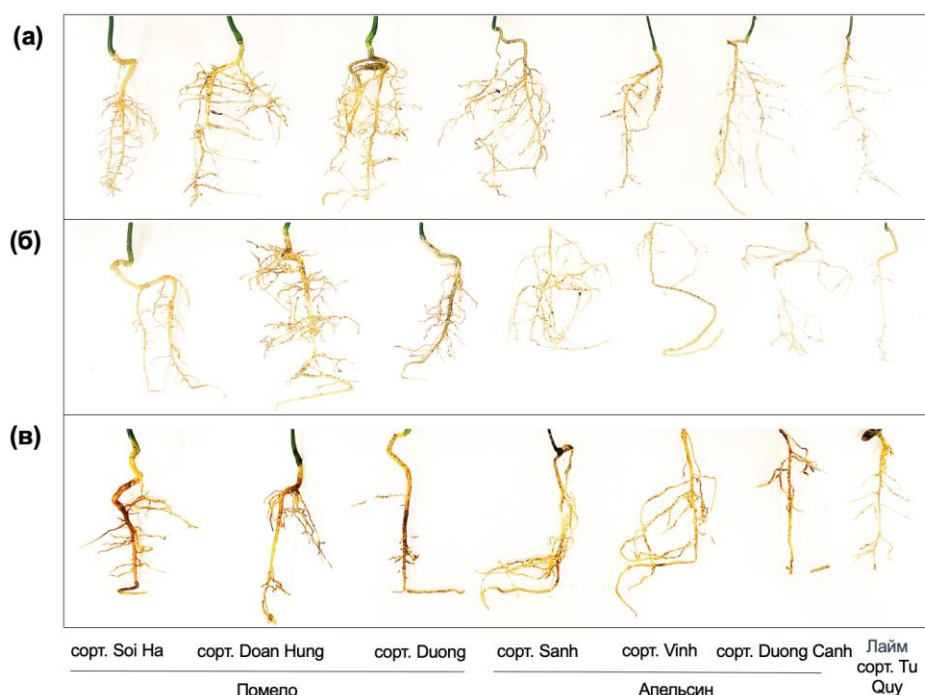


Рисунок 18. Ингибирующее действие раствора *B. pumilus* VN-K13 на зооспоры *P. parvispora* (VN-Oo10) на корнях цитрусовых деревьев. (а) отрицательный контроль (не инокулированные); (б) совместная инокуляция раствором *B. pumilus* (VN-K13) и зооспорами *P. parvispora* (VN-Oo10) и (в) положительный контроль (инокулированные *P. parvispora*). Симптомы на корнях были сфотографированы через 30 дней после инокуляции

Применение бактериального раствора *Bacillus pumilus* (VN-K13) эффективно смягчало заражение корней цитрусовых деревьев спорами *Phytophthora spp.* в тепличных условиях. Эти многообещающие результаты имеют важное значение и открывают путь к разработке стратегий биоконтроля для борьбы с болезнями и снижения потерь цитрусовых культур. Таким образом, *B. pumilus* (VN-K13) представляется перспективным кандидатом для контроля и предотвращения ущерба, наносимого болезнями, вызываемыми *Phytophthora spp.*. Однако для подтверждения биоконтрольного потенциала *B. pumilus* (VN-K13) необходимы дальнейшие исследования в естественных условиях, особенно при воздействии экологических стрессоров.

3.7. Биологическая борьба «in vivo» с *Phytophthora spp.* на апельсиновых деревьях (*C. sinensis*, сорт Sanh)

Мало что известно о взаимодействии между *Phytophthora spp.* и антагонистическими бактериями. После того, как четыре антагонистических бактериальных штамма (VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13) прошли испытания в теплице для оценки их антигрибной активности и способности подавлять фитофтороз корней, особенно у апельсиновых деревьев сорт Sanh. После 16-недельного периода инокуляции результаты показали значительное снижение тяжести заболевания для всех четырех бактериальных штаммов - VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13 (таб. 11, рис. 18 и 19). Однако при обеих дозировках (1×10^6 и 1×10^8 колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл) существенной разницы не наблюдалось. Предполагается, что такое снижение тяжести заболевания, приписываемое бактериям-антагонистам, связано с механизмами биологического контроля и их адаптацией к среде обитания растения-хозяина.

При анализе параметров высоты деревьев три бактериальных штамма VN-H8, VN-F8 и VN-13 продемонстрировали размеры, сопоставимые с неинокулированным контролем. Только штамм VN-H5 показал меньшую высоту, чем неинокулированный контроль, но большую, чем инокулированный контроль.

Если принять во внимание параметры диаметра дерева, то только штамм VN-K13 продемонстрировал диаметр, превышающий диаметр неинокулированного

контроля. Остальные бактериальные штаммы показали результаты, практически эквивалентные неинокулированному контролю и превосходящие инокулированный контроль.



Рисунок 19. Реакция листьев и корней проростков апельсина на обработку изолятом *Phytophthora parvispora* VN-Oo10 и штаммом *Bacillus pumillus* VN-K13. (А) Слева направо: Контроль без инокуляции, инокуляция *P. parvispora* и *B. pumilus* VN-K13, инокуляция *P. parvispora* и (Б) корень, соответственно. Симптомы были показаны через 4 месяца после инокуляции

Что касается параметров свежего веса побегов, то бактериальный штамм VN-H5 показал меньший вес, чем неинокулированный контроль. Напротив, три других бактериальных штамма показали вес выше, чем неинокулированный контроль, причем наилучший результат продемонстрировал VN-K13, за ним следуют VN-F8 и VN-H8. Эта тенденция сохранялась и при рассмотрении параметров сухой массы побегов.

При изучении параметров сырого веса корней только штамм бактерий VN-K13 имел меньший вес, чем неинокулированный контроль, в то время как штамм бактерий VN-F8 имел вес, превышающий эквивалент неинокулированного контроля. Напротив, штаммы VN-H5 и VN-H8 имели вес ниже, чем неинокулированный контроль.

Что касается параметров сухой массы корней, то только у штамма VN-K13 она была выше, чем у неинокулированного контроля. Напротив, остальные три штамма VN-H5, VN-H8 и VN-F8 показали вес ниже, чем неинокулированный контроль, но выше, чем инокулированный контроль. Выживаемость проростков, обработанных бактериальными штаммами *B. pumilus*, была выше, чем у инокулированного контроля, что указывает на потенциальную эффективность этих бактериальных штаммов в повышении устойчивости растений к фитопатогенам.

Таблица 11. Влияние бактериальных штаммов на биометрические показатели растений

Вариант	Высота растения (см)	Диаметр растения (см)	Свежий вес побегов (г)	Сухой вес побегов (г)	Свежий вес корня (г)	Сухая масса корня (г)	Процент выживаем ости (%)
Неинокули рованный	17.58 ^{c*}	4.55 ^{cd}	57.2 ^d	19.73 ^d	40.86 ^f	12.04 ^g	100
Инокулиро ванный	11.83 ^a	3.39 ^a	38.24 ^a	12.18 ^a	19.12 ^a	6.62 ^a	75
VN-K13 (a)	17.55 ^c	4.61 ^{cd}	64.71 ^f	21.21 ^f	49.78 ^g	14.23 ^h	100
VN-K13 (b)	17.61 ^c	4.66 ^d	66.67 ^g	22.22 ^g	51.28 ^h	14.66 ⁱ	100
VN-H5 (a)	16.19 ^b	4.11 ^b	44.64 ^b	14.88 ^b	27.90 ^b	7.65 ^b	91,67
VN-H5 (b)	16.18 ^b	4.18 ^b	48.51 ^c	16.17 ^c	30.32 ^c	8.30 ^c	83,33
VN-F8 (a)	17.48 ^c	4.47 ^c	61.71 ^e	20.57 ^{ef}	39.81 ^f	11.07 ^f	100
VN-F8 (b)	17.52 ^c	4.46 ^c	61.63 ^e	20.54 ^{ef}	39.76 ^f	11.03 ^f	100
VN-H8 (a)	17.46 ^c	4.48 ^c	58.84 ^d	19.61 ^d	36.78 ^d	10.21 ^d	100
VN-H8 (b)	17.53 ^c	4.51 ^{cd}	60.97 ^e	20.32 ^{de}	38.11 ^e	10.59 ^e	91,67

^a Изоляты бацилл (VN-K13 (a), VN-H5 (a), VN-F8 (a), VN-H8 (a) и VN-K13 (b), VN-H5 (b), VN-F8 (b), VN-H8 (b)) были высеяны в концентрации 1×10^6 или 1×10^8 КОЕ/мл соответственно.

* Средние значения (n=12) в столбцах и строках, сопровождаемых одинаковыми буквами, существенно не различаются ($p < 0.05$, тест Тьюки HSD).

В этом исследовании симптомы гнили корней были обнаружены у растений апельсина (*C. sinensis*, сорт Sanh) во всех обработанных группах, что привело к

снижению выживаемости сеянцев (таб. 11). Тем не менее, выживаемость апельсина (*C. sinensis*, сорт Sanh), обработанных *B. pumilus*, была выше, чем у контрольной группы (таб. 11).

Наши результаты подчеркивают увеличение роста растений сеянцев апельсина (*C. sinensis*, сорт Sanh), обработанных антагонистическими бактериями (бактеризацией) по сравнению с необработанными контрольными образцами.

Кроме биоконтрольной активности, ризобактерии, способствующие росту растений (PGPR), обеспечивают растения фитогормонами, такими как ауксин, который играет ключевую роль в регулировании роста и развития растений путем стимулирования удлинения клеток через их дифференциацию и расширение [72, 74]. В образце, обрабатываемом антагонистическими бактериями, длина корня и сухая масса корня сеянцев апельсина (*C. sinensis*, сорт Sanh) значительно превышали аналогичные показатели у инокулированной контрольной группы (таб. 11). Этот феномен можно объяснить болезнями корней от *Phytophthora spp.*, которые вызывают некроз во внутренней коре корней [83, 103].

Некроз уменьшает способность корневой системы к впитыванию и транспортировке воды и питательных веществ, что приводит к замедленному росту и мешает сеянцам достичь ожидаемого этапа роста побегов [104]. Однако сеянцы апельсина (*C. sinensis*, сорт Sanh), инокулированные *B. pumilus*, проявили существенный рост и увеличение биомассы по сравнению как с контрольной группой, так и с инокулированной контрольной группой (таб. 11). В результате *B. pumilus* эффективно контролировало гниль корней у сеянцев апельсина (*C. sinensis*, сорт Sanh), выделяя литические ферменты, такие как протеаза, производя липопептиды или летучие органические соединения (ЛОС). Это привело к развитию здоровых сеянцев с хорошо установленными корневыми системами, способными к эффективному поглощению воды и питательных веществ, тем самым способствуя росту сеянцев.

Кроме того, *B. pumilus* выделяет индол-3-уксусную кислоту (ИУК) в среду. Выделение ауксина, вероятно, способствовало удлинению побегов и корней (таб. 11) и инициировало образование боковых и придаточных корней, как это было отмечено (рис. 18). В результате клеточная стенка расширяется, что приводит к

увеличению размеров клеток и, следовательно, к увеличению длины корней (Majda & Robert 2018).

В конечном итоге развитие корней увеличивает поверхность корневой системы, находящейся в контакте с почвой, увеличивая способность растения к поглощению питательных веществ и воды, что в конечном итоге улучшает рост и урожайность. (Park *et al.* 2017) продемонстрировали, что ауксин, вырабатываемый *Bacillus licheniformis* МН48, увеличил сухую массу листьев и корней сеянцев *Camellia japonica* в 2,6 и 2,2 раза соответственно по сравнению с контролем [162]. Действительно, результаты этого исследования однозначно указывают на то, что обработка инокуляцией бактерий *B. pumilus* значительно увеличивает рост сеянцев и производство биомассы по сравнению с контрольной группой. Внесение бактерий особенно благоприятно для улучшения длины корней и их диаметра, что, в конечном итоге, увеличивает поверхность для поглощения питательных веществ, что приводит к улучшению роста и производства биомассы у сеянцев апельсина (*C. sinensis*, сорт Sanh).

Выводы данного исследования подчеркивают потенциал антагонистической бактерии *B. pumilus* VN-K13 в производстве литических ферментов, включая протеазу и целлюлазу. Эти ферменты эффективно разрушают клеточные стенки и контролируют рост фитопатогенных *Phytophthora spp.*, вызывающих корневые гнили у сеянцев апельсина (*C. sinensis*, сорт Sanh). В результате обработки *B. pumilus* VN-K13 наблюдалось снижение распространенности фитопторозных корневых гнилей и улучшение выживаемости сеянцев апельсина (*C. sinensis*, сорт Sanh) в условиях теплицы. Кроме того, выделение ауксина, такого как индол-3-уксусная кислота (ИУК) *B. pumilus* VN-K13, могло способствовать росту сеянцев апельсина (*C. sinensis*, сорт Sanh), стимулируя расширение и дифференцировку клеток, тем самым увеличивая рост и производство биомассы. Таким образом, данное исследование подчеркивает эффективность *B. pumilus* VN-K13 в качестве надежного биологического агента для борьбы с *Phytophthora spp.*, предлагая потенциальные применения в управлении корневыми гнилями и стимуляции роста сеянцев апельсина (*C. sinensis*, сорт Sanh).

Полученные многообещающие результаты данного исследования имеют важное значение для разработки стратегий биологического контроля с целью управления болезнями и снижению потерь в цитрусовых садах. *B. pumilus* VN-K13 предлагается в качестве кандидата для контроля и предотвращения ущерба, причиняемого фитофторозными болезнями. Тем не менее, дальнейшие эксперименты в естественных условиях, особенно во время экологического стресса, необходимы для подтверждения потенциала биологического контроля с помощью *B. pumilus* VN-K13 в более широком масштабе, включая инокуляции в цитрусовых садах, особенно в условиях стресса.

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 манкозеп, хлороталонил, фосэтил алюминия, фосфонат калия, металаксил и диметоморф, проявили ингибирующую активность против роста *Phytophthora* spp.. Металаксил и диметоморф проявили

наибольшую ингибирующую активность, за которой следовали хлороталонил и фосэтил алюминия. Фосфонат калия проявил наименьшую эффективность в ингибировании изолятов *Phytophthora*.

4. Четыре штамма 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. Штамм 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 штамма бактерий *B. pumilus*, VN-H5, VN-H8, VN-F8 и VN-K13, обладают способностью производить сидерофорные соединения. Кроме того, два из них, *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. Исследованные штаммы бактерий обладают способностью производить летучие органические соединения (ЛОС), которые эффективно подавляют рост *Phytophthora spp.*, 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 фитофторозной 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 фитофторозом и стимулирования роста апельсиновых деревьев.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБК	Агент биологического контроля
АЦК	Аминоциклопропан-1-карбоновой кислоты
ВА	Водный агар
ИСУ	Индукцированная системная устойчивость
ИУК	Индол-3-уксусную кислота
КМЦ	Карбоксиметилцеллюлозы
КПК	Картофельный декстрозный агар
ЛБ	Лурия-Бертани
ЛОС	Летучие органические соединения
ПА	Питательный агар
ПБ	Питательный бульон
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
РНК	Рибонуклеиновая кислота
Сох	Субъединицы цитохромоксидазы
ТЭ	Трис-ЭДТА
ЭДТА	Этилендиаминтетрауксусная кислота
GA3	Гиперболиновая кислота
ITS	Внутренний транскрибированный спейсер
NH ₃	Аммиак
PIPES	2-этансульфоновой кислоты
ТСА	Триптический соевый агар
ТСБ	Триптический соевый бульон
XAS	Хром Азурол S

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ab Rahman, S. F. S. et al. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens // Plant Science. – 2018. – Vol. 267. – P. 102-111.
2. Abad, Z. G. et al. IDphy: Molecular and morphological identification of *Phytophthora* based on the types. USDA APHIS PPQ S&T Beltsville Lab, USDA APHIS PPQ S&T ITP // Centre for *Phytophthora* Science and Management, and World *Phytophthora*. – 2019. Available online: <https://idtools.org/id/phytophthora/index.php>.
3. Abad, Z. G. et al. IDphy: An international online resource for molecular and morphological identification of *Phytophthora* // Plant disease. – 2023. – Vol. 107, № 4. – P. 987-998.
4. Abraham, A. O. et al. Isolation and in vivo screening of yeast and *Bacillus* antagonists for the control of *Penicillium digitatum* of citrus fruit // Biological control. – 2010. – Vol. 53, № 1. – P. 32-38.
5. Adeniji, A. A. et al. Selecting lipopeptide-producing, *Fusarium*-suppressing *Bacillus* spp.: Metabolomic and genomic probing of *Bacillus velezensis* NWUMFkBS10. 5 // MicrobiologyOpen. – 2019. – Vol. 8, № 6. – P. e00742.
6. Aguayo, J. et al. Genetic diversity and origins of the homoploid-type hybrid *Phytophthora* × *alni* // Applied and Environmental Microbiology. – 2016. – Vol. 82, № 24. – P. 7142-7153.
7. Ahmad, F. et al. Enhanced remediation of chlorpyrifos from soil using ryegrass (*Lolium multiflorum*) and chlorpyrifos-degrading bacterium *Bacillus pumilus* C2A1 // Journal of hazardous materials. – 2012. – Vol. 237. – P. 110-115.
8. Alexander, D. B., Zuberer, D. A. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria // Biology and Fertility of Soils. – 1991. – Vol. 12, № 1. – P. 39-45.
9. Ann, P., Ko, W. Variants of *Phytophthora cinnamomi* extend the known limits of the species // Mycologia. – 1985. – Vol. 77, № 6. – P. 946-950.

10. Apun, K. et al. Screening and isolation of a cellulolytic and amylolytic *Bacillus* from sago pith waste // The Journal of general and applied microbiology. – 2000. – Vol. 46. – P. 263-267.
11. Araújo, W. L. et al. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks // Canadian journal of microbiology. – 2001. – Vol. 47, № 3. – P. 229-236.
12. Arias, R. S. et al. Spatio-temporal distribution of naturally occurring *Bacillus spp.* and other bacteria on the phylloplane of soybean under field conditions // Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms. – 1999. – Vol. 39, № 5-6. – P. 283-292.
13. Arnison, P. G. et al. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature // Natural product reports. – 2013. – Vol. 30, № 1. – P. 108-160.
14. Arrebola, E. et al. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus // Biological control. – 2010. – Vol. 53, № 1. – P. 122-128.
15. Aryantha, I. et al. Suppression of *Phytophthora cinnamomi* in potting mixes amended with uncomposted and composted animal manures // Phytopathology. – 2000. – Vol. 90, № 7. – P. 775-782.
16. Bala, K. *Phytopythium* Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Levesque, *gen. nov.* and *Phytopythium sindhum* Lodhi, Shahzad & Levesque, *sp. nov.* // Persoonia. – 2010. – Vol. 24. – P. 136-137.
17. Bassani, I. et al. *Phytophthora* zoospores: From perception of environmental signals to inoculum formation on the host-root surface // Computational and Structural Biotechnology Journal. – 2020. – Vol. 18. – P. 3766-3773.
18. Bhattacharya, S. et al. Biosynthesis and characterization of a thermostable, alkali-tolerant chitinase from *Bacillus pumilus* JUBCH08 displaying antagonism against phytopathogenic *Fusarium oxysporum* // 3 Biotech. – 2016. – Vol. 6. – P. 1-8.

19. Bie, X. et al. Screening the main factors affecting extraction of the antimicrobial substance from *Bacillus sp.* fmbJ using the Plackett–Burman method // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2005. – Vol. 21. – P. 925-928.
20. Blair, J. E. et al. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences // Fungal Genetics and Biology. – 2008. – Vol. 45, № 3. – P. 266-277.
21. Bouchard-Rochette, M. et al. *Bacillus pumilus* PTB180 and *subtilis* PTB185: Production of lipopeptides, antifungal activity, and biocontrol ability against *Botrytis cinerea* // Biological Control. – 2022. – Vol. 170. – P. 104925.
22. Branda, S. S. et al. A major protein component of the *subtilis* biofilm matrix // Molecular microbiology. – 2006. – Vol. 59, № 4. – P. 1229-1238.
23. Brasier, C. et al. *Phytophthora*: An ancient, historic, biologically and structurally cohesive and evolutionarily successful generic concept in need of preservation // IMA fungus. – 2022. – Vol. 13, № 1. – P. 12.
24. Cañamás, T. P. et al. Control of postharvest diseases on citrus fruit by preharvest applications of biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2: Part II. Effectiveness of different cell formulations // Postharvest Biology and Technology. – 2008. – Vol. 49, № 1. – P. 96-106.
25. Cao, Y. et al. Antagonism of two plant-growth promoting *velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum* // Scientific reports. – 2018. – Vol. 8, № 1. – P. 4360.
26. Cara, M. d. et al. First report of *Pythium deliense* as a pathogen of melon in Honduras and Guatemala // Plant Pathology. – 2008. – Vol. 57, № 4.
27. Cardillo, E. et al. Topographic effects on dispersal patterns of *Phytophthora cinnamomi* at a stand scale in a Spanish heathland // Plos One. – 2018. – Vol. 13, № 3. – P. e0195060.
28. Cavaglieri, L. et al. Biocontrol of *subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level // Research in Microbiology. – 2005. – Vol. 156, № 5-6. – P. 748-754.

29. Chakraborty, U. et al. Plant growth promoting activity of *pumilus* in tea (*Camellia sinensis*) and its biocontrol potential against *Poria hypobrunnea* // Indian Phytopathology. – 2013. – Vol. 66, № 4. – P. 387-396.
30. Chaudhary, S. et al. Incidence, Severity, and Characterization of *Phytophthora* Foot Rot of Citrus in Texas and Implications for Disease Management // Plant Disease. – 2020. – Vol. 104, № 9. – P. 2455-2461.
31. Cheema, G. et al. Commercial fruits of India // Commercial fruits of India. – 1954.
32. Chen, K. et al. species as potential biocontrol agents against citrus diseases // Biological control. – 2020. – Vol. 151. – P. 104419.
33. Chen, K. et al. Antagonistic activity and the mechanism of *amyloliquefaciens* DH-4 against citrus green mold // Phytopathology. – 2018. – Vol. 108, № 11. – P. 1253-1262.
34. Chen, L. et al. Induced maize salt tolerance by rhizosphere inoculation of *amyloliquefaciens* SQR9 // Physiologia plantarum. – 2016. – Vol. 158, № 1. – P. 34-44.
35. Chen, X. et al. Isolation and characterization of *amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot // Postharvest Biology and Technology. – 2016. – Vol. 115. – P. 113-121.
36. Chenniappan, C. et al. Biocontrol efficiency of native plant growth promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of turmeric // Biological Control. – 2019. – Vol. 129. – P. 55-64.
37. Chi, N. et al. Fungal composition belonging *Pythiaceae* causing root rot disease on citrus in Quang Ninh Province // Vietnam Sci Tech J Agric Rural Dev. – 2019. – Vol. 3. – P. 97-103.
38. Chi, N. et al. Management of *Phytophthora palmivora* disease in *Citrus reticulata* with chemical fungicides // Journal of General Plant Pathology. – 2020. – Vol. 86. – P. 494-502.
39. Cimen, B., Yeşiloğlu, T. Rootstock breeding for abiotic stress tolerance in citrus // Abiotic and Biotic Stress in Plants-Recent Advances and Future Perspectives. – 2016.

40. Collins, D. P., Jacobsen, B. J. Optimizing a *subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot // Biological control. – 2003. – Vol. 26, № 2. – P. 153-161.
41. Cooke, D. et al. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes // Fungal genetics and biology. – 2000. – Vol. 30, № 1. – P. 17-32.
42. Dang, V. T. T. et al. Phytophthora diseases in Vietnam // Diversity and management of *phytophthora* in Southeast Asia / Drenth A., Guest D. I. -- Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra 2004. -- C. 83-89.
43. Daungfu, O. et al. Endophytic bacteria isolated from citrus plants for biological control of citrus canker in lime plants // Tropical life sciences research. – 2019. – Vol. 30, № 1. – P. 73.
44. Deacon, J., Donaldson, S. Molecular recognition in the homing responses of zoosporic fungi, with special reference to *Pythium* and *Phytophthora* // Mycological Research. – 1993. – Vol. 97, № 10. – P. 1153-1171.
45. Dey, R. et al. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria // Microbiological research. – 2004. – Vol. 159, № 4. – P. 371-394.
46. Dick, M. The peronosporomycetes // Systematics and Evolution: Part A. – 2001. – P. 39-72.
47. Dimkić, I. et al. Plant-associated and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms-A review // Physiological and Molecular Plant Pathology. – 2022. – Vol. 117. – P. 101754.
48. Dimkić, I. et al. The profile and antimicrobial activity of lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains // Frontiers in microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. 925.
49. Dobrzyński, J. et al. Potential of *pumilus* to directly promote plant growth // Frontiers in Microbiology. – 2022. – Vol. 13. – P. 1069053.

50. Dobrzyński, J. et al. The reaction of cellulolytic and potentially cellulolytic spore-forming bacteria to various types of crop management and farmyard manure fertilization in bulk soil // *Agronomy*. – 2021. – Vol. 11, № 4. – P. 772.
51. Drake, B., Jones, G. Public value at risk from *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora kernoviae* spread in England and Wales // *Journal of environmental management*. – 2017. – Vol. 191. – P. 136-144.
52. Drenth, A., Sendall, B. Economic impact of phytophthora diseases in Southeast Asia // *Diversity and management of Phytophthora in Southeast Asia*. – 2004. – P. 10-28.
53. Driks, A. The spore coat // *Phytopathology*. – 2004. – Vol. 94, № 11. – P. 1249-1251.
54. Droby, S., Chalutz, E. Successful biocontrol of postharvest pathogens of fruits and vegetables // *British Crop Protection Council*. – 1994. – Vol. 94, № 3. – P. 1265-1272.
55. Droby, S. et al. Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? // *Postharvest biology and technology*. – 2009. – Vol. 52, № 2. – P. 137-145.
56. Droby, S. et al. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products // *Postharvest Biology and Technology*. – 2016. – Vol. 122. – P. 22-29.
57. Duniway, J. Role of physical factors in the development of *Phytophthora* diseases // *International System for Agricultural Science and Technology*. – 1983.
58. Dutta, P. et al. Optimization of the medium for the production of extracellular amylase by the *Pseudomonas stutzeri* ISL B5 Isolated from municipal solid waste // *International Journal of Microbiology*. – 2016. – Vol. 2016.1. – P. 4950743.
59. Ehmann, A. The Van Urk-Salkowski reagent—a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives // *Journal of Chromatography A*. – 1977. – Vol. 132, № 2. – P. 267-276.

60. El-Sayed, A. S. et al. A glucanolytic *Pseudomonas* sp. associated with *Smilax bona-nox* L. displays strong activity against *Phytophthora parasitica* // Microbiological Research. – 2018. – Vol. 207. – P. 140-152.
61. Eljounaidi, K. et al. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases—review and future prospects // Biological control. – 2016. – Vol. 103. – P. 62-68.
62. Elshafie, H. S. et al. In vitro antifungal activity of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* against some phytopathogenic fungi // International Journal of Molecular Sciences. – 2012. – Vol. 13, № 12. – P. 16291-16302.
63. Enebak, S., Carey, W. Evidence for induced systemic protection to fusiform rust in loblolly pine by plant growth-promoting rhizobacteria // Plant Disease. – 2000. – Vol. 84, № 3. – P. 306-308.
64. Phytophthora diseases worldwide. / Erwin, D. C., Ribeiro, O. K.: American Phytopathological Society (APS Press), 1996.
65. Etesami, H., Maheshwari, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects // Ecotoxicology and environmental safety. – 2018. – Vol. 156. – P. 225-246.
66. FAO. FAOSTAT Statistical Database // Rome –2022.
67. Fira, D. et al. Biological control of plant pathogens by species // Journal of biotechnology. – 2018. – Vol. 285. – P. 44-55.
68. Flores, A. et al. Improved biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* by over-expression of the proteinase-encoding gene prb1 // Current genetics. – 1997. – Vol. 31. – P. 30-37.
69. Fritze, D. Taxonomy of the genus and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria // Phytopathology. – 2004. – Vol. 94, № 11. – P. 1245-1248.
70. Fu, H. et al. Screening and identification of antagonistic strain against *Phytophthora sojae* // Plant Diseases and Pests. – 2011. – Vol. 2, № 4. – P. 9-17.

71. Ghaderi, F., Banihashemi, Z. Identification and pathogenicity of *Pythium spp.* isolated from walnut seedlings in Fars province nurseries // Applied Entomology and Phytopathology. – 2011. – Vol. 78, № 2. – P. 237-256.
72. Glick, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications // Scientifica. – 2012. – Vol. 2012.1. – P. 963401.
73. Gong, A.-D. et al. Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum* // PloS one. – 2015. – Vol. 10, № 2. – P. e0116871.
74. Goswami, D. et al. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review // Cogent Food & Agriculture. – 2016. – Vol. 2, № 1. – P. 1127500.
75. Gotor-Vila, A. et al. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry // Food Microbiology. – 2017. – Vol. 64. – P. 219-225.
76. Govinda Rao, P. Citrus diseases and their control in Andhra State // Andhra agric. J. – 1954. – Vol. 1. – P. 187-192.
77. Graham, J., Timmer, L. Phytophthora diseases of citrus // Plant diseases of international importance. – 1992. – Vol. 3. – P. 250-269.
78. Gutierrez-Manero, F. et al. Development, growth and differentiation-The plant-growth-promoting rhizobacteria *pumilus* and *licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins // Physiologia Plantarum. – 2001. – Vol. 111, № 2. – P. 206-211.
79. Hafeez, F. Y. et al. Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer // Agronomy for sustainable development. – 2006. – Vol. 26, № 2. – P. 143-150.
80. Han, V.-C. et al. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*: modes of action of biocontrol agents, soil organic amendments, and soil microbiome manipulation // Biological Control. – 2023. – P. 105346.
81. Han, V.-C. et al. Identification, characterization, and efficacy evaluation of *velezensis* for shot-hole disease biocontrol in flowering cherry // The Plant Pathology Journal. – 2022. – Vol. 38, № 2. – P. 115.

82. Handelsman, J., Stabb, E. V. Biocontrol of soilborne plant pathogens // The plant cell. – 1996. – Vol. 8, № 10. – P. 1855.
83. Hansen, E. M. Phytophthora species emerging as pathogens of forest trees // Current Forestry Reports. – 2015. – Vol. 1. – P. 16-24.
84. Hardham, A. R. *Phytophthora cinnamomi* // Molecular plant pathology. – 2005. – Vol. 6, № 6. – P. 589-604.
85. Hardham, A. R. Cell biology of plant–oomycete interactions // Cellular microbiology. – 2007. – Vol. 9, № 1. – P. 31-39.
86. Ho, H. H. The taxonomy and biology of *Phytophthora* and *Pythium* // J. Bacteriol. Mycol. Open Access. – 2018. – Vol. 6. – P. 40-45.
87. Hong, P. et al. Combination of hot water, *amyloliquefaciens* HF-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit // Postharvest Biology and Technology. – 2014. – Vol. 88. – P. 96-102.
88. Huang, T.-P. et al. DNA polymorphisms and biocontrol of antagonistic to citrus bacterial canker with indication of the interference of phyllosphere biofilms // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 7, –P. e42124
89. Huang, Y. et al. Postharvest biological control of *Penicillium digitatum* decay on citrus fruit by *pumilus* // Annals of applied biology. – 1992. – Vol. 120, № 2. – P. 367-372.
90. Hutchison, D. Rootstock development screening and selection for disease tolerance and horticultural characteristics // Fruit Var. J. – 1985. – Vol. 39. – P. 21-25.
91. Intaparn, P. et al. First report of *Pythium deliense* causing root and crown rot on *Catharanthus roseus* in Thailand // Plant Pathology & Quarantine. – 2019. – Vol. 9, № 1. – P. 239-247.
92. Islam, T. et al. Biosynthesis, molecular regulation, and application of bacilysin produced by species // Metabolites. – 2022. – Vol. 12, № 5. – P. 397.
93. J J Skujins, H. J. P., M Alexander. Dissolution of fungal cell walls by a *streptomycte* chitinase and beta-(1-3) glucanase // ScienceDirect. – 1965. – Vol. 111, № 2. – P. 358-364.

94. James, E. K. et al. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67 // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2002. – Vol. 15, № 9. – P. 894-906.
95. Janisiewicz, W. Biocontrol of postharvest diseases of temperate fruits. Challenges and opportunities // *Plant-Microbe Interactions and Biological Control*. Marcel Dekker, Inc, New York. – 1998. – P. 171-198.
96. Janisiewicz, W. J., Korsten, L. Biological control of postharvest diseases of fruits // *Annual review of phytopathology*. – 2002. – Vol. 40, № 1. – P. 411-441.
97. Jayawardena, R. S. et al. One stop shop IV: taxonomic update with molecular phylogeny for important phytopathogenic genera // *Fungal Diversity*. – 2020. – Vol. 103. – P. 87-218.
98. Jeong, H. et al. Genome sequence of the plant endophyte *pumilus* INR7, triggering induced systemic resistance in field crops // *Genome announcements*. – 2014. – Vol. 2, № 5. – P. 01093-14.
99. Jing, H., Strader, L. C. Interplay of auxin and cytokinin in lateral root development // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, № 3. – P. 486.
100. Joo, G.-J. et al. Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers // *The Journal of Microbiology*. – 2005. – Vol. 43, № 6. – P. 510-515.
101. Judelson, H. S., Ah-Fong, A. M. Exchanges at the plant-oomycete interface that influence disease // *Plant Physiology*. – 2019. – Vol. 179, № 4. – P. 1198-1211.
102. Judelson, H. S., Blanco, F. A. The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer // *Nature Reviews Microbiology*. – 2005. – Vol. 3, № 1. – P. 47-58.
103. Jung, T. et al. Diversity of *Phytophthora* species in natural ecosystems of Taiwan and association with disease symptoms // *Plant Pathology*. – 2017. – Vol. 66, № 2. – P. 194-211.
104. Jung, T. et al. Canker and decline diseases caused by soil-and airborne *Phytophthora* species in forests and woodlands // *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. – 2018. – Vol. 40, № 1. – P. 182-220.

105. Jung, T. et al. A survey in natural forest ecosystems of Vietnam reveals high diversity of both new and described *Phytophthora* taxa including *P. ramorum* // Forests. – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 93.
106. Kalai-Grami, L. et al. Protective effect of *amyloliquefaciens* against infections of Citrus aurantium seedlings by *Phoma tracheiphila* // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2014. – Vol. 30. – P. 529-538.
107. Kamaladevi, B. et al. Screening and Medium Optimization of Lipase Producing Bacteria from Saltpan // Research Journal of Chemical and Environmental Sciences. – 2014. – Vol. 2. – P. 72-77.
108. Kaur, Y. et al. Survival of *Phytophthora nicotianae* in citrus rhizosphere // Journal of Plant Pathology. – 2021. – Vol. 103, № 4. – P. 1307-1313.
109. Kaushal, M. et al. *pumilus* strain YSPMK11 as plant growth promoter and biocontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum* // 3 Biotech. – 2017. – Vol. 7. – P. 1-9.
110. Ketabchi, S. et al. Identification of lime fruit surface colonizing bacteria antagonistic against the green mold (*Penicillium digitatum*) and comparison of biological control with heat treatment and chemical control // Asian Journal of Experimental Biological Sciences. – 2012. – Vol. 3, № 2. – P. 287-292.
111. Khatoon, Z. et al. Peptide antibiotics produced by *Bacillus* species: first line of attack in the biocontrol of plant diseases // Bacilli in Agrobiotechnology: Plant Stress Tolerance, Bioremediation, and Bioprospecting Springer, 2022. – P. 31-46.
112. Khulbe, D. Integrating soil solarization and seed biopriming to manage seedling damping-off in flower nurseries // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2019. – Vol. 8, № 02. – P. 1456-1469.
113. Kotan, R. et al. Biological control of post harvest disease caused by *Aspergillus flavus* on stored lemon fruits // African journal of biotechnology. – 2009. – Vol. 8, № 2.
114. Kroon, L. et al. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences // Fungal Genetics and Biology. – 2004. – Vol. 41, № 8. – P. 766-782.

115. Kumar, S. et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // *Molecular biology and evolution*. – 2018. – Vol. 35, № 6. – P. 1547.
116. Labiadh, M. et al. Antifungal lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from rhizosphere of Citrus trees // *Rhizosphere*. – 2021. – Vol. 19. – P. 100399.
117. Laville, E. Les maladies. *Phytophthora* des agrumes en Corse // *Fruits*. – 1974. – Vol. 29, № 4. – P. 297-301.
118. Lazarovits, G. et al. Understanding the mode of action of organic soil amendments provides the way for improved management of soilborne plant pathogens // *Acta Horticulturae*. – 2005. – Vol. 698. – P. 215.
119. Lee, H.-J. et al. Screening of antifungal *Bacillus* spp. against *Alternaria* blight pathogen (*Alternaria panax*) and anthracnose pathogen (*Colletotrichum gloeosporioides*) of ginseng // *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. – 2012. – Vol. 20, № 5. – P. 339-344.
120. Levesque, C. A., De Cock, A. W. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium* // *Mycological research*. – 2004. – Vol. 108, № 12. – P. 1363-1383.
121. Li, W. et al. Mediation of induced systemic resistance by the plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* S2-3-2 // *Molecular Biology Reports*. – 2020. – Vol. 47, № 11. – P. 8429-8438.
122. Liu, H. et al. *Bacillus pumilus* LZP02 promotes rice root growth by improving carbohydrate metabolism and phenylpropanoid biosynthesis // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. – 2020. – Vol. 33, № 10. – P. 1222-1231.
123. LIU, W.-w. et al. Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens // *Agricultural Sciences in China*. – 2008. – Vol. 7, № 9. – P. 1104-1114.
124. Liu, Y. et al. Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis // *PloS one*. – 2013. – Vol. 8, № 11. – P. e80097.
125. Logan, N. A., Halket, G. Developments in the taxonomy of aerobic, endospore-forming bacteria // *Endospore-forming Soil Bacteria*. – 2011. – P. 1-29.

126. Lorito, M. et al. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination // Microbiology. – 1994. – Vol. 140, № 3. – P. 623-629.
127. Lucon, C. et al. Postharvest harpin or *Bacillus thuringiensis* treatments suppress citrus black spot in 'Valencia' oranges // Crop Protection. – 2010. – Vol. 29, № 7. – P. 766-772.
128. Mahasneh, A. M., Stewart, D. J. A Medium for Detecting β -(1-3) Glucanase Activity in Bacteria // Journal of Applied Bacteriology. – 1980. – Vol. 48, № 3. – P. 457-458.
129. Majda, M., Robert, S. The role of auxin in cell wall expansion // International journal of molecular sciences. – 2018. – Vol. 19, № 4. – P. 951.
130. Malewski, T. et al. Role of avian vectors in the spread of *Phytophthora* species in Poland // European Journal of Plant Pathology. – 2019. – Vol. 155, № 4. – P. 1363-1366.
131. Martínez-Zavala, S. A. et al. Chitinases of *Bacillus thuringiensis*: Phylogeny, modular structure, and applied potentials // Frontiers in microbiology. – 2020. – Vol. 10. – P. 499289.
132. Maseko, B., Coutinho, T. Pathogenicity of *Phytophthora* and *Pythium* species associated with citrus root rot in South Africa // South African Journal of Botany. – 2002. – Vol. 68, № 3. – P. 327-332.
133. Masood, S. et al. *Bacillus pumilus* promotes the growth and nitrogen uptake of tomato plants under nitrogen fertilization // Scientia Horticulturae. – 2020. – Vol. 272. – P. 109581.
134. Matheron, M., Porchas, M. Colonization of citrus roots by *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica* in daily soil temperature fluctuations between favorable and inhibitory levels // Plant Disease. – 1996. – Vol. 80, № 10. – P. 1135-1140.
135. Matheron, M., Porchas, M. Comparative ability of six fungicides to inhibit development of *Phytophthora* gummosis on citrus // Plant disease. – 2002. – Vol. 86, № 6. – P. 687-690.

136. Mauch, F. et al. Antifungal hydrolases in pea tissue: II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1, 3-glucanase // *Plant physiology*. – 1988. – Vol. 88, № 3. – P. 936-942.
137. Meena, K. R., Kanwar, S. S. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics // *BioMed research international*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 473050.
138. Mérida, H. et al. Analyses of extracellular carbohydrates in oomycetes unveil the existence of three different cell wall types // *Eukaryotic cell*. – 2013. – Vol. 12, № 2. – P. 194-203.
139. Mendis, H. C. et al. Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13, № 2. – P. e0193119.
140. Merelo, P. et al. Cell wall remodeling in abscission zone cells during ethylene-promoted fruit abscission in citrus // *Frontiers in plant science*. – 2017. – Vol. 8. – P. 126.
141. Mielich-Süss, B., Lopez, D. Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation // *Environmental microbiology*. – 2015. – Vol. 17, № 3. – P. 555-565.
142. Miljaković, D. et al. The significance of *Bacillus spp.* in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8, № 7. – P. 1037.
143. MohaMMadi, P. et al. Potential of some bacteria for biological control of postharvest citrus green mould caused by *Penicillium digitatum* // *Plant Protection Science*. – 2017. – Vol. 53, № 3. – P. 134-143.
144. Mohammadipour, M. et al. Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin-producing *Bacillus subtilis* isolates and evaluation of their biocontrol potential against *Aspergillus flavus* and *Colletotrichum gloeosporioides* // *Canadian Journal of Microbiology*. – 2009. – Vol. 55, № 4. – P. 395-404.

145. Mohite, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth // Journal of soil science and plant nutrition. – 2013. – Vol. 13, № 3. – P. 638-649.
146. Mootz, H. D. et al. 4'-Phosphopantetheine transfer in primary and secondary metabolism of *Bacillus subtilis* // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – Vol. 276, № 40. – P. 37289-37298.
147. Mora, I. et al. Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments // Int. Microbiol. – 2011. – Vol. 14, № 4. – P. 213-223.
148. Morita, T. et al. Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds produced by *Bacillus pumilus* TM-R // Heliyon. – 2019. – Vol. 5, № 6. – P. e01817.
149. Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Salmaninezhad, F. Taxonomic challenges in the genus *Pythium* // *Pythium* CRC Press. – 2020. – P. 179-199.
150. Murugappan, R. et al. Symbiotic influence of endophytic *Bacillus pumilus* on growth promotion and probiotic potential of the medicinal plant *Ocimum sanctum* // Symbiosis. – 2013. – Vol. 60. – P. 91-99.
151. Naqvi, S. Major diseases of Citrus and their management // Citriculture, NRC for Citrus, Nagpur. – 1999. – P. 273-284.
152. Nautiyal, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms // FEMS microbiology Letters. – 1999. – Vol. 170, № 1. – P. 265-270.
153. Nikolić, I. et al. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* on sugar beet with *Bacillus pumilus* SS-10.7 and *Bacillus amyloliquefaciens* (SS-12.6 and SS-38.4) strains // Journal of applied microbiology. – 2019. – Vol. 126, № 1. – P. 165-176.
154. Nunes, C. et al. Nutritional enhancement of biocontrol activity of *Candida sake* (CPA-1) against *Penicillium expansum* on apples and pears // European Journal of Plant Pathology. – 2001. – Vol. 107. – P. 543-551.
155. Nunes, C. A. Biological control of postharvest diseases of fruit // European Journal of Plant Pathology. – 2012. – Vol. 133. – P. 181-196.

156. Ongena, M. et al. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2005. – Vol. 67. – P. 692-698.
157. Ongena, M., Jacques, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol // *Trends in microbiology*. – 2008. – Vol. 16, № 3. – P. 115-125.
158. Osman, M. S. et al. Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest diseases and maintenance of fruit quality // *Crop Protection*. – 2011. – Vol. 30, № 2. – P. 173-178.
159. Overvoorde, P. et al. Auxin control of root development // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2010. – Vol. 2, № 6. – P. a001537.
160. Panebianco, S. et al. Enhanced control of postharvest citrus fruit decay by means of the combined use of compatible biocontrol agents // *Biological Control*. – 2015. – Vol. 84. – P. 19-27.
161. Panth, M. et al. Methods for management of soilborne diseases in crop production // *Agriculture*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 16.
162. Park, H.-G. et al. Inoculation with *Bacillus licheniformis* MH48 to improve *Camellia japonica* seedling development in coastal lands // *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. – 2017. – Vol. 41, № 5. – P. 381-388.
163. Parkunan, V. et al. First report of *Pythium deliense* associated with peanut pod rot in Georgia // *Plant Disease*. – 2014. – Vol. 98, № 9. – P. 1269-1269.
164. Penha, R. O. et al. *Bacillus* lipopeptides as powerful pest control agents for a more sustainable and healthy agriculture: recent studies and innovations // *Planta*. – 2020. – Vol. 251. – P. 1-15.
165. Perrot-Rechenmann, C. Cellular responses to auxin: division versus expansion // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2010. – Vol. 2, № 5. – P. a001446.
166. Priest, F. G. Systematics and ecology of *Bacillus* // *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology, and molecular genetics. – 1993. – P. 1-16.

167. Production of crop. Situation and solutions for developing citrus in the northern province // Ministry of Agriculture & Rural Development, Vietnam. – 2020. Available online: <http://www.cuctrongtrot.gov.vn/>.
168. Puglisi, I. et al. Two previously unknown *Phytophthora* species associated with brown rot of Pomelo (*Citrus grandis*) fruits in Vietnam // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, № 2. – P. e0172085.
169. Rainey, F. A. et al. 16S rDNA analysis of *Spirochaeta thermophila*: its phylogenetic position and implications for the systematics of the order Spirochaetales // Systematic and applied microbiology. – 1992. – Vol. 15, № 2. – P. 197-202.
170. Ramallo, A. C. et al. Control of *Phytophthora* brown rot of lemons by pre-and postharvest applications of potassium phosphite // European Journal of Plant Pathology. – 2019. – Vol. 154. – P. 975-982.
171. Rashid, M. H. et al. Glucosaminidase of *Bacillus subtilis*: cloning, regulation, primary structure and biochemical characterization // Microbiology. – 1995. – Vol. 141, № 10. – P. 2391-2404.
172. Ren, J.-H. et al. Biocontrol potential of an endophytic *Bacillus pumilus* JK-SX001 against poplar canker // Biological Control. – 2013. – Vol. 67, № 3. – P. 421-430.
173. Renganathan, R. et al. Optimization of Culture Conditions for the Production of Protease from *Bacillus megaterium* // Journal of Ecobiotechnol. – 2010. – Vol. 2. – P. 40-46.
174. Rishad, K. et al. Biocontrol potential of halotolerant bacterial chitinase from high yielding novel *Bacillus pumilus* MCB-7 autochthonous to mangrove ecosystem // Pesticide biochemistry and physiology. – 2017. – Vol. 137. – P. 36-41.
175. Robideau, G. P. et al. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer // Molecular ecology resources. – 2011. – Vol. 11, № 6. – P. 1002-1011.
176. Rolando, C. et al. Chemical control of two *Phytophthora* species infecting the canopy of Monterey pine (*Pinus radiata*) // Forest Pathology. – 2017. – Vol. 47, № 3. – P. e12327.

177. Rooney-Latham, S. et al. *Phytophthora* species are common on nursery stock grown for restoration and revegetation purposes in California // Plant disease. – 2019. – Vol. 103, № 3. – P. 448-455.
178. Sansinenea, E., Ortiz, A. Secondary metabolites of soil *Bacillus spp* // Biotechnology letters. – 2011. – Vol. 33. – P. 1523-1538.
179. Sasirekha, B., Srividya, S. Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli // Agriculture and Natural Resources. – 2016. – Vol. 50, № 4. – P. 250-256.
180. Savita, G. S. V., Nagpal, A. Citrus diseases caused by *Phytophthora* species // GERF Bulletin of Biosciences. – 2012. – Vol. 3, № 1. – P. 18-27.
181. Sawake, M. M. et al. Management of *Phytophthora parasitica* causing gummosis in citrus using biogenic copper oxide nanoparticles // Journal of Applied Microbiology. – 2022. – Vol. 132, № 4. – P. 3142-3154.
182. Scanu, B. et al. A taxonomic re-evaluation reveals that *Phytophthora cinnamomi* and *P. cinnamomi* var. *parvispora* are separate species // Forest Pathology. – 2014. – Vol. 44, № 1. – P. 1-20.
183. Schwyn, B., Neilands, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores // Analytical biochemistry. – 1987. – Vol. 160. – P. 47-56.
184. Sgerri, H. Diagnostic Microbiology Bailey & Scott's // Laboratory Medicine. – 2013. – Vol. 44. – P. e138–e139.
185. Shafi, J. et al. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2017. – Vol. 31, № 3. – P. 446-459.
186. Sharma, R. et al. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review // Biological control. – 2009. – Vol. 50, № 3. – P. 205-221.

187. Singh, A. K. et al. Good Agronomic Practices (GAP)-An efficient and eco-friendly tool for sustainable management of plant diseases under changing climate scenario // Journal of Plant Disease Sciences. – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. 1-8.
188. Souto, G. et al. Genetic and functional characterization of a *Bacillus sp.* strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds // Journal of Applied Microbiology. – 2004. – Vol. 97, № 6. – P. 1247-1256.
189. Sowanpreecha, R., Rerngsamran, P. Biocontrol of orchid-pathogenic mold, *Phytophthora palmivora*, by antifungal proteins from *Pseudomonas aeruginosa* RS1 // Mycobiology. – 2018. – Vol. 46, № 2. – P. 129-137.
190. Stein, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions // Molecular microbiology. – 2005. – Vol. 56, № 4. – P. 845-857.
191. Talibi, I. et al. Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases // Journal of applied microbiology. – 2014. – Vol. 117, № 1. – P. 1-17.
192. Tan, S. et al. Antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* induces resistance and controls the bacterial wilt of tomato // Pest management science. – 2013. – Vol. 69, № 11. – P. 1245-1252.
193. Tanimoto, E. Regulation of root growth by plant hormones—roles for auxin and gibberellin // Critical reviews in plant sciences. – 2005. – Vol. 24, № 4. – P. 249-265.
194. Thoirain, B. et al. Risk Factors for the Phytophthora - Induced Decline of Alder in Northeastern France // Phytopathology®. – 2007. – Vol. 97, № 1. – P. 99-105.
195. Thomas, E. L., Van der Hoorn, R. A. Ten prominent host proteases in plant-pathogen interactions // International journal of molecular sciences. – 2018. – Vol. 19, № 2. – P. 639.
196. Thompson, S. E. et al. Rainfall and temperatures changes have confounding impacts on *Phytophthora cinnamomi* occurrence risk in the southwestern USA under climate change scenarios // Global Change Biology. – 2014. – Vol. 20, № 4. – P. 1299-1312.

197. Tian, Z. et al. Biocontrol and the mechanisms of *Bacillus* sp. w176 against postharvest green mold in citrus // *Postharvest Biology and Technology*. – 2020. – Vol. 159. – P. 111022.
198. Timmer, L. et al. Diseases of citrus // *Diseases of tropical fruit crops*. – 2003. – P. 163-195.
199. Timmer, L. et al. *Alternaria* diseases of citrus – Novel pathosystems // *Phytopathologia Mediterranea*. – 2003. . – Vol. 43. – P. 99-112.
200. Toral, L. et al. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea* // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1315.
201. Tsai, Y.-L., Olson, B. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1992. – Vol. 58, № 7. – P. 2292-2295.
202. Tsao, P. H., Ocana, G. Selective isolation of species of *Phytophthora* from natural soils on an improved antibiotic medium // *Nature*. – 1969. – Vol. 223, № 5206. – P. 636-638.
203. Udayashankar, A. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* // *Biological Control*. – 2011. – Vol. 59, № 2. – P. 114-122.
204. Upadhyay, S. K. et al. Impact of native ST-PGPR (*Bacillus pumilus*; EU927414) on PGP traits, antioxidants activities, wheat plant growth and yield under salinity // *Climate Change and Environmental Sustainability*. – 2019. – Vol. 7, № 2. – P. 157-168.
205. Vafa, A. et al. Virulence of *Pythium deliense* causing soft rot in Ginger, a new report from Kerala, India // *Studies in Fungi*. – 2021. – Vol. 6, № 1. – P. 488-494.
206. van der Plaats-Niterink, A. J. Monograph of the genus *Pythium* // *Stud Mycol*. – 1981. – Vol. 21. – P. 1-242.
207. Van Loon, L. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins // *European journal of plant pathology*. – 1997. – Vol. 103. – P. 753-765.

208. Van Tran, Q. et al. Current status and characterization of *Phytophthora* species associated with gummosis of citrus in Northern Vietnam // Journal of Phytopathology. – 2023. – Vol. 171, № 9. – P. 478-488.
209. Van Tran, Q. et al. Pathogenicity and fungicide sensitivity of *Phytophthora parvispora*, a new pathogen causing gummosis and root rot disease on citrus trees // Microbial Pathogenesis. – 2023. – Vol. 175. – P. 105986.
210. Vessey, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers // Plant and soil. – 2003. – Vol. 255. – P. 571-586.
211. Villa, F. et al. Fungal biofilms: Targets for the development of novel strategies in plant disease management // Frontiers in microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. 654.
212. Villa, N. O. et al. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences // Mycologia. – 2006. – Vol. 98, № 3. – P. 410-422.
213. Vu, T. et al. Potential of *Trichoderma asperellum* as a bio-control agent against citrus diseases caused by *Penicillium digitatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* // International Journal of Agricultural Technology. – 2021. Vol. 17, № 5. – P. 2005-2020.
214. Vu, T. X. et al. Efficient control of the fungal pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* infecting citrus fruits by native soilborne *Bacillus velezensis* strains // Heliyon. – 2023. – Vol. 9, № 2. – P. e13663.
215. Waewthongrak, W. et al. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicilium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit // Postharvest Biology and Technology. – 2015. – Vol. 99. – P. 44-49.
216. Wang, H. et al. A simple method of preparing plant samples for PCR // Nucleic acids research. – 1993. – Vol. 21, № 17. – P. 4153.
217. Wang, J. et al. Regulation of cuticle formation during fruit development and ripening in ‘Newhall’ navel orange (*Citrus sinensis* Osbeck) revealed by transcriptomic and metabolomic profiling // Plant Science. – 2016. – Vol. 243. – P. 131-144.

218. Wang, Y. et al. Surfactin and fengycin B extracted from *Bacillus pumilus* W-7 provide protection against potato late blight via distinct and synergistic mechanisms // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 104. – P. 7467-7481.
219. Wei, G. et al. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions // *Phytopathology*. – 1996. – Vol. 86, № 2. – P. 221-224.
220. White, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics // *PCR protocols: a guide to methods and applications*. – 1990. – Vol. 18, № 1. – P. 315-322.
221. Wilson, C. L., Wisniewski, M. E. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: an emerging technology // *Annual review of phytopathology*. – 1989. – Vol. 27, № 1. – P. 425-441.
222. Wu, Y. et al. Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* // *Microbiology Open*. – 2019. – Vol. 8, № 8. – P. e00813.
223. Yang, X., Hong, C. Differential usefulness of nine commonly used genetic markers for identifying *Phytophthora* species // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 2334.
224. Yang, X. et al. An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora* // *IMA fungus*. – 2017. – Vol. 8. – P. 355-384.
225. Yuan, J. et al. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* // *Applied and environmental microbiology*. – 2012. – Vol. 78, № 16. – P. 5942-5944.
226. Zalila-Kolsi, I. et al. Antagonist effects of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*) // *Microbiological research*. – 2016. – Vol. 192. – P. 148-158.
227. Zhang, J. et al. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum* // *Plant Disease*. – 2009. – Vol. 93, № 12. – P. 1317-1323.

228. Zhang, N. et al. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11 // Plant and soil. – 2011. – Vol. 344. – P. 87-97.
229. Zheng, L. et al. Identification of volatile organic compounds for the biocontrol of postharvest litchi fruit pathogen *Peronophythora litchii* // Postharvest biology and technology. – 2019. – Vol. 155. – P. 37-46.
230. Zhu, L. et al. Complete genome sequence of *Bacillus badius* NBPM-293, a plant growth-promoting strain isolated from rhizosphere soil // Microbiology Resource Announcements. – 2021. – Vol. 10, № 45. – P. e00977-21.
231. Zhu, M.-L. et al. Effects of different culture conditions on the biofilm formation of *Bacillus pumilus* HR10 // Current Microbiology. – 2020. – Vol. 77. – P. 1405-1411.
232. Zhu, M.-L. et al. Role of biofilm formation by *Bacillus pumilus* HR10 in biocontrol against pine seedling damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* // Forests. – 2020. – Vol. 11, № 6. – P. 652.
233. Дзедаев, Х. И др. Биологическая борьба с фитофторозом картофеля, вызываемым *Phytophthora infestans* // Bulletin of the Urals. – 2023. – Том. 23, № 09. – С. 2-10.
234. Дзедаев, Х. И др. Применение биопрепаратов в борьбе с *phytophthora infestans* картофеля // Актуальные проблемы развития научных исследований и инноваций в сельскохозяйственном производстве. – 2023. – С. 55-58.
235. Дьяков, Ю. Фитофтороз–Глобальные и внутрироссийские проблемы // Природа. – 2002. № 1. – С. 33-39.
236. Илларионов, А. И. И др. Методы и средства интегрированной защиты картофеля от вредных организмов // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2023. – Том. 16, № 3. – С. 78.
237. Клименко, В. Эффективность полифункциональных препаратов при стимулировании роста и защите от болезней картофеля, зерновых культур и садов // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. – 2023. № 1. – С. 196-202.

238. Мазницына, Л., Торговин, В. Влияние биопрепаратов на продуктивность томата в условиях защищенного грунта // Перспективные направления рационального землепользования и цифровизация земледелия. – 2023. – С. 164-168.
239. Максимов, В. Б., Щекутьева, Н. А. Применение фунгицидов для борьбы с фитофторозом картофеля в условиях вологодской области // м 75 молодые исследователи агропромышленного и лесного ком. – 2023. – С. 93.
240. Пакина, Е. Н. И др. Оценка эффективности биопрепаратов для контроля наиболее значимых микозов на посадках картофеля // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. – 2023. – Том. 18, № 4. – С. 501-507.
241. Перевалова, Д., Карпухин, М. Грибковые заболевания томатов в защищенном грунте // Агрофорум. – 2023. – Том. 5. – С. 88-91.
242. Поликсенова, В. Д. Индуцированная устойчивость растений к патогенам и абиотическим стрессовым факторам: на примере томата // Вестник Белорусского государственного университета. – 2009. – Том. 2, № 1. – С. 48-60.
243. Попов, Ф. И др. Эффективность фунгицидов в ограничении вредоносности фитофтороза томата открытого грунта // Земледелие и растениеводство. – 2023. № 6. – С. 28-32.
244. Синиченко, Н., Ванюшкина, И. Влияние биопрепаратов различной природы на развитие альтернариоза и урожайность растений томата в условиях Приморского края // известия федерального научного центра овощеводства. – 2023. № 1. – С. 25.
245. Чеботарь, В. И др. Урожайность и поражаемость картофеля ризоктониозом и фитофторозом под влиянием эндофитных бактерий *bacillus thuringiensis* w65 и *bacillus amyloliquefaciens* p20 // сельскохозяйственная биология. – 2023. – Том. 58, № 3. – С. 429-446.

ПРИЛОЖЕНИЕ

**Приложение А. Таблице S1. Полный список изолятов фитофторы, отобранных в нескольких основных районах
производства цитрусовых на Севере Вьетнама**

Изоляты	<i>Phytophthora</i> <i>spp.</i>	Источник	Хост	Происхождение	No. «GenBank»	
					ITS	COX1
VN-Oo1	<i>P. parvispora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Хам Ен - Туен Куанг		
VN-Oo2	<i>P. parvispora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Хам Ен - Туен Куанг		
VN-Oo3	<i>P. parvispora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Хам Ен - Туен Куанг	ON573332	ON563237
VN-Oo4	<i>P. parvispora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Doan Hung)	Доан Хунг - Фу Тхо	ON573333	ON563238
VN-Oo5	<i>P. parvispora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Doan Hung)	Доан Хунг - Фу Тхо		
VN-Oo6	<i>P. parvispora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Doan Hung)	Доан Хунг - Фу Тхо		
VN-Oo7	<i>P. parvispora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Doan Hung)	Доан Хунг - Фу Тхо		
VN-Oo8	<i>P. parvispora</i>	Стебель с гуммозом	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Doan Hung)	Доан Хунг - Фу Тхо		
VN-Oo9	<i>P. parvispora</i>	Стебель с гуммозом	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Doan Hung)	Доан Хунг - Фу Тхо		
VN-Oo10	<i>P. parvispora</i>	Стебель с гуммозом	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Хам Ен - Туен Куанг	ON573334	ON563239
VN-Oo11	<i>P. parvispora</i>	Стебель с гуммозом	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Хам Ен - Туен Куанг		

VN-Oo12	<i>P. parvispora</i>	Стебель с гуммозом	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Хам Ен - Туен Куанг		
VN-Oo13	<i>P. parvispora</i>	Стебель с гуммозом	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Хам Ен - Туен Куанг		
VN-Oo14	<i>Pythium Deliense</i>	Ризосферная почва	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Хам Ен - Туен Куанг		
VN-Oo15	<i>Pythium Deliense</i>	Ризосферная почва	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Хам Ен - Туен Куанг		
VN-Oo16	<i>Pythium Deliense</i>	Ризосферная почва	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Хам Ен - Туен Куанг	ON573330	ON563235
VN-Oo17	<i>Pythium Cucurbitacearum</i>	Ризосферная почва	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Хам Ен - Туен Куанг		
VN-Oo18	<i>Pythium Cucurbitacearum</i>	Ризосферная почва	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Хам Ен - Туен Куанг		
VN-Oo19	<i>Pythium Cucurbitacearum</i>	Ризосферная почва	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Хам Ен - Туен Куанг		
VN-Oo20	<i>Pythium Deliense</i>	Ризосферная почва	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Хам Ен - Туен Куанг		
VN-Oo21	<i>Pythium Deliense</i>	Ризосферная почва	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo22	<i>Pythium Deliense</i>	Ризосферная почва	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo23	<i>Pythium Carolinianum</i>	Ризосферная почва	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo24	<i>Pythium Carolinianum</i>	Ризосферная почва	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo25	<i>Pythium Inflatum</i>	Ризосферная почва	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo26	<i>Pythium Carolinianum</i>	Fruit with brow rot	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		

VN-Oo27	<i>Pythium Inflatum</i>	Ризосферная почва	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo28	<i>Pythium Deliense</i>	Ризосферная почва	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo29	<i>Pythium Deliense</i>	Ризосферная почва	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг	ON573331	ON563236
VN-Oo30	<i>P. palmivora</i>	Diseased roots	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Хам Ен - Туен Куанг	OQ651224	OQ656449
VN-Oo31	<i>P. palmivora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Хам Ен - Туен Куанг		
VN-Oo32	<i>P. palmivora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Хам Ен - Туен Куанг		
VN-Oo33	<i>P. palmivora</i>	Стебель с гуммозом	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Ви Суен - Ха Занг	OQ253531	OQ408409
VN-Oo34	<i>P. palmivora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Ви Суен - Ха Занг		
VN-Oo35	<i>P. palmivora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Ви Суен - Ха Занг		
VN-Oo36	<i>P. palmivora</i>	Стебель с гуммозом	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Ви Суен - Ха Занг		
VN-Oo37	<i>P. palmivora</i>	Стебель с гуммозом	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Ви Суен - Ха Занг		
VN-Oo38	<i>P. palmivora</i>	Стебель с гуммозом	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг	OQ253532	OQ656450
VN-Oo39	<i>P. palmivora</i>	Стебель с гуммозом	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo40	<i>P. palmivora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo41	<i>P. palmivora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		

VN-Oo42	<i>P. palmivora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo43	<i>P. palmivora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo44	<i>P. palmivora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo45	<i>P. mekongensis</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo46	<i>P. mekongensis</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo47	<i>P. mekongensis</i>	Стебель с гуммозом	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo48	<i>P. mekongensis</i>	Стебель с гуммозом	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Ен Сон - Туен Куанг	OQ253527	OQ408412
VN-Oo49	<i>P. mekongensis</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo50	<i>P. mekongensis</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт Sanh)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo51	<i>P. mekongensis</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Lime (<i>C. aurantiifolia</i> сорт Tu Quy)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo52	<i>P. mekongensis</i>	Diseased roots	Lime (<i>C. aurantiifolia</i> сорт Tu Quy)	Ен Сон - Туен Куанг	OQ253528	OQ656451
VN-Oo53	<i>P. mekongensis</i>	Diseased roots	Lime (<i>C. aurantiifolia</i> сорт Tu Quy)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo54	<i>P. mekongensis</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Lime (<i>C. aurantiifolia</i> сорт Tu Quy)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo55	<i>P. mekongensis</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Lime (<i>C. aurantiifolia</i> сорт Tu Quy)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo56	<i>P. mekongensis</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Lime (<i>C. aurantiifolia</i> сорт Tu Quy)	Ен Сон - Туен Куанг		

VN-Oo57	<i>P. nicotianae</i>	Стебель с гуммозом	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Doan Hung)	Доан Хунг - Фу Тхо		
VN-Oo58	<i>P. nicotianae</i>	Стебель с гуммозом	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Doan Hung)	Доан Хунг - Фу Тхо	OQ253529	OQ408410
VN-Oo59	<i>P. nicotianae</i>	Стебель с гуммозом	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Doan Hung)	Доан Хунг - Фу Тхо		
VN-Oo60	<i>P. nicotianae</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Doan Hung)	Доан Хунг - Фу Тхо		
VN-Oo61	<i>P. nicotianae</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Doan Hung)	Доан Хунг - Фу Тхо		
VN-Oo62	<i>P. nicotianae</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Doan Hung)	Доан Хунг - Фу Тхо		
VN-Oo63	<i>P. nicotianae</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Doan Hung)	Доан Хунг - Фу Тхо		
VN-Oo64	<i>P. nicotianae</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Doan Hung)	Доан Хунг - Фу Тхо		
VN-Oo65	<i>P. nicotianae</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг	OQ253530	OQ656452
VN-Oo66	<i>P. nicotianae</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo67	<i>P. nicotianae</i>	Стебель с гуммозом	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ен Сон - Туен Куанг		
VN-Oo68	<i>P. mekongensis</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ван Чан - Ен Баи	OQ253525	OQ408411
VN-Oo69	<i>P. mekongensis</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ван Чан - Ен Баи		
VN-Oo70	<i>P. mekongensis</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Помело (<i>C.grandis</i> сорт Soi Ha)	Ван Чан - Ен Баи		
VN-Oo71	<i>P. mekongensis</i>	Стебель с гуммозом	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт V2)	Ван Чан - Ен Баи		

VN-Oo72	<i>P. mekongensis</i>	Стебель с гуммозом	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт V2)	Ван Чан - Ен Баи	OQ253526	OQ656453
VN-Oo73	<i>P. mekongensis</i>	Стебель с гуммозом	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт V2)	Ван Чан - Ен Баи		
VN-Oo74	<i>P. mekongensis</i>	Стебель с гуммозом	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт V2)	Ван Чан - Ен Баи		
VN-Oo75	<i>P. mekongensis</i>	Diseased roots	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт V2)	Ван Чан - Ен Баи		
VN-Oo76	<i>P. citrophthora</i>	Diseased roots	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт V2)	Ван Чан - Ен Баи	OQ253523	OQ408408
VN-Oo77	<i>P. citrophthora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт V2)	Ван Чан - Ен Баи		
VN-Oo78	<i>P. citrophthora</i>	Стебель с гуммозом	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт V2)	Ван Чан - Ен Баи	OQ253524	OQ656454
VN-Oo79	<i>P. citrophthora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт V2)	Ван Чан - Ен Баи		
VN-Oo80	<i>P. citrophthora</i>	Стебель с гуммозом	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт V2)	Ван Чан - Ен Баи		
VN-Oo81	<i>P. citrophthora</i>	Стебель с гуммозом	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт V2)	Ван Чан - Ен Баи		
VN-Oo82	<i>P. citrophthora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт V2)	Ван Чан - Ен Баи		
VN-Oo83	<i>P. citrophthora</i>	Ризосфера почвы и больные корни	Апельсин (<i>C. sinensis</i> сорт V2)	Ван Чан - Ен Баи		

Приложение В. Таблица S2 Штаммы *Phytophthora*, использованные в филогенетических анализах, и их номера доступа к «GenBank» (Abad *et al.*, 2023)

Виды	Клад	Тип	Код изолята	ITS rDNA	cox1
<i>P. nicotianae</i>	1	SE1	CPHST BL 44 (P7661)	MG865550	MH136943
<i>P. cactorum</i>	1a	SE1	CPHST BL 9 (P0714)	MG783385	MH136858
<i>P. hedraiandra</i>	1a	ET	CPHST BL 4 (P19523)	MG865504	MH136898
<i>P. idaei</i>	1a	ET	CPHST BL 38 (P6767)	MG865509	MH136903
<i>P. pseudotsugae</i>	1a	ET	CPHST BL 51 (P10339)	MG865575	MH136967
<i>P. clandestina</i>	1b	ET	CPHST BL 15 (P3943)	MG865477	MH136873
<i>P. iranica</i>	1b	ET	CPHST BL 40 (P3882)	MG865519	MH136913
<i>P. tentaculata</i>	1b	ET	CPHST BL 29 (P8496)	MG865591	MH136983
<i>P. andina</i>	1c	ET	CPHST BL 32 (P13365)	MK496515	MH136846
<i>P. infestans</i>	1c	SE1	CPHST BL 142 (P1381)	MG865512	MH136906
<i>P. ipomoeae</i>	1c	ET	CPHST BL 21 (P10225)	MG865518	MH136912
<i>P. mirabilis</i>	1c	ET	CPHST BL 25 (P3008)	MG865541	MH136934
<i>P. phaseoli</i>	1c	SE1	CPHST BL 28 (P10150)	MG865564	MH136956
<i>P. alticola</i>	4	NT	TBF0060A10 (CBS141718)	KX247599	KX247585
<i>P. arenaria</i>	4	ET	CPHST BL 78 (P19599)	MG783377	MH136848
<i>P. boodjera</i>	4	ET	VHS26806, CPHST BL 181	KJ372244	MH477743
<i>P. litchii</i>	4	SE	CPHST BL 145 (P19950)	MG865524	MH136919
<i>P. megakarya</i>	4	SE1	CPHST BL 22 (P1664)	MG865533	MH136928
<i>P. palmivora</i>	4	SE1	CPHST BL 105 (P0633)	MG865559	MH136949
<i>P. quercetorum</i>	4	ET	CPHST BL 52G (P15555)	MG865577	MH136969

<i>P. botryosa</i>	2a	ET	CPHST BL 132 (P3425)	MK496516	MH136855
<i>P. citrophthora</i>	2a	ET	CPHST BL 60 (P0479)	MG865476	MH136872
<i>P. colocasiae</i>	2a	SE1	CPHST BL 173 (P6317)	MG865479	MH136875
<i>P. himalsilva</i>	2a	ET	CPHST BL 102 (P19820)	MG865507	MH136901
<i>P. meadii</i>	2a	SE1	CPHST BL 81 (P19007)	MG865529	MH136924
<i>P. mekongensis</i>	2a	ET	PF6a2 (CBS 135136)	KC875838	KT366920
<i>P. occultans</i>	2a	ET	CPHST BL 163 (P19955)	MG865555	MH477753
<i>P. terminalis</i>	2a	ET	CPHST BL 164 (P19956)	MG865592	MH136984
<i>P. parvispora</i>	7a	ET	CBS 132772	KC478667	KC609413
<i>P. cinnamomi</i>	7a	ET	CBS 144.22	KC478663	KC609419

ET: Ex-type; SE: Selected Specimen; NT: Non-type

**Приложение С. Последовательности представителей фитифторы,
выделенных в нескольких основных районах производства цитрусовых в
Северном Вьетнаме**

- Регион ITS (*Oomycetes*) :

>VN-Oo03 *Phytophthora parvispora*

CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACA
CCTAAAAATCTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCCCTTCGTTGGGGGCCTG
CTCTGGGCGGCGGCTGTCGATGTCAAAGTCGGCGGCTGCTGCTGCGTGCGG
GGCCCTATCACTGGCGAGCGTTTGGGTCCCTCTCGGGGGAACTGAGCTAGT
AGCCCCTATTTTAAACCCATTCTGTAATACTGAACATACTGTGGGGACGAA
AGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTC
GCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAG
GATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTAGT
CCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGGCTCTCTTCCT
TCCGTGTAGTCGGTGGATGGAGGCGCCAGACGTGAGGTGTCTTGCGGGCG
GCCTTCGGGCTGTCTGTGAGTCCCTTGAAATGTAAGTGAAGTGAAGTCTCTCT
TGCTCGAAAAGCGTGACGTTGCTGGTTGTGGAGGCTGCCTGTATGGCCAGT
CGGCGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAATGGAGGAGTGTTTCGATTTCG
GGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAGCGCTTATTGGATGTTCTTCCTGCT
GTGGCGGTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCAAGGCTTGGCGTTTGAA
CCGGCGGTGTTGTGGCGAAGTAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTGAGGGTTCG
ATCCATTTGGGAAGTCTGTGTCTTTTCTTGCGGCGCACGTTTGTGTGGTTGC
GGGGGATGGCATCTCAATTGGAC

>VN-Oo10 *Phytophthora parvispora*

CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACA
CCTAAAAATCTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCCCTTCGTTGGGGGCCTG
CTCTGGGCGGCGGCTGTCGATGTCAAAGTCGGCGGCTGCTGCTGCGTGCGG
GGCCCTATCACTGGCGAGCGTTTGGGTCCCTCTCGGGGGAACTGAGCTAGT
AGCCCCTATTTTAAACCCATTCTGTAATACTGAACATACTGTGGGGACGAA
AGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTC
GCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAG
GATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTAGT
CCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGGCTCTCTTCCT
TCCGTGTAGTCGGTGGATGGAGGCGCCAGACGTGAGGTGTCTTGCGGGCG
GCCTTCGGGCTGTCTGTGAGTCCCTTGAAATGTAAGTGAAGTGAAGTCTCTCT
TGCTCGAAAAGCGTGACGTTGCTGGTTGTGGAGGCTGCCTGTATGGCCAGT
CGGCGACCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAATGGAGGAGTGTTTCGATTTCG
GGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAAAGCGCTTATTGGATGTTCTTCCTGCT
GTGGCGGTACGGATCGGTGAACCGTAGCTGTGCAAGGCTTGGCGTTTGAA
CCGGCGGTGTTGTGGCGAAGTAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTGAGGGTTCG
ATCCATTTGGGAAGTCTGTGTCTTTTCTTGCGGCGCACGTTTGTGTGGTTGC
GGGGGATGGCATCTCAATTGGAC

>VN-Oo16 *Pythium deliense*

CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACA
 CCATAAACTTTCCACGTGAACCGTTGAAATCATGTTCTGTGCTCTCTCTCG
 GGAGGGCTGAACGAAGGTGGGCTGCTTAATTGTGGTCTGCCGATGTATTTT
 TCAAACCCATTTACCTAATACTGATCTATACTCCAAAAACGAAAGTTTCTG
 GTTTTAATCCATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGA
 TGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTG
 AGTCATCGAAATTTTGAACGCGACATTGCACTTTCGGGTTATGCCTGGAAGT
 ATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTCTGTGTAGT
 CAGGGAGAGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGTTGACTCCCTTTTCGGA
 GGAGAAGACGCGAGTCCCTTTAAATGTACGTTTCGCTCTTTCTTGTGTCTAA
 GATGAAGTGTGATTCTCGAATCGCAGTGATCTGTTTGGATCGCTTTGCGCA
 TTTGGGCGACTTCGGTTAGGACATTAAAGGAAGCAACCTCTATTGGCGGTA
 TGTTAGGCTTCGGCCCGACGTTGCAGCTGACGGAGTGTGGTTTTCTGTTCTT
 TCCTTGAGGTGTACCTGATTTGTGTGAGGCAATGGTCTGGGCAAATGGTTG
 CTGTGTAGTAGGGTTTTGCTGCTCTTGGGCGCCCTGTTTTCGGATAGGGTA
 AAGAAGGCAACACCAATTTGGGACTGTTTGCTTTTAGCAGACAATTTTCTA
 ATTGGACCTGATATCAG

>VN-Oo.17 *Pythium cucurbitacearum*

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACAC
 CTAAAAAACACCCTTCCACGTGAACCGTTTTGTTTTGCTTTCGAGTGCTTTG
 TTGCGCTCGGAGCATGTTTTGGGCTTCGCTGCTGGCGCTTGATTGTGCTGGC
 GGCTCGAGGCCATCAAGTGGCGTTTTTGAGTGTGCTTTGCGCAATTGAAACG
 TCGAAACCTTTTTTTAAACCCATTTGATTGAAAACCTGAAGTATACTGTGGG
 GACGAAAGTCCTCGCTTTGAAACTAGATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTC
 TAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGA
 ATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAACTTTTGAACGCATATTGCACTTTCG
 GGTTACGCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTACACTAACTTGCGT
 CTCTTCCGTCGTGTAGTCGTCGGTTGTTTTGATTGCAGATGTGAGGTTGTCT
 CGCGATGTACCATTTCTTTTGGATAGGTTGCGAGTCCCTTTAAAAGTCGGA
 CGCGTGTTTTTTCCGTTTTGTGCTTGATGGGGGTGCGGCTGCGGCCGTGTCT
 GCTGGCGGGTCCGGTGACCTTTGGCGATGGCATGAGAGTGGATTGCTCGAT
 TTGCGGTATGTTAGGCTTCGGCTTTGACAATGCAGCTTATTGGGTGTGTTTCG
 CTTGGCTGTTGCTGTATGGGGTGAGCTGGATGGTTCGGTGGATGCGTTTGTT
 GCGTGTCGTTTTTYCATGGAGTGCGTTGCGGTTGTCGTCGCCATTTGGGAA
 TTTCATGTTTTGAGTCTCGATTCAATACATCTCA

>VN-Oo.19 *Pythium cucurbitacearum*

TTTTTTTAAACCCATTTGATTGAAAACCTGAAGTATACTGTGGGGACGA
 AAGTCCTCGCTTTGAAACTAGATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGC
 TCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGC
 AGGATTCAGTGAGTCATCGAACTTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGGTTA
 CGCCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTACACTAACTTGCGTCTCTTC
 CGTCGTGTAGTCGTCGGTTGTTTTGATTGCAGATGTGAGGTTGTCTCGCAGT
 CGACCACTTCTTTTGGATGGATAGGTTGCGAGTCCCTTTAAAAGTCGGACG
 CGTGTTTTTTCCGTTTTGTGCTTGATGGGGGTGCGGCTGCGGCCGTGTCTGC

TGGCGGGTCCGGTGACCTTTGGCGATGGCATGAGAGTGGATTGCTCGATTT
GCGGTATGTTAGGCTTCGGCTTTGACAATGCAGCTTATTGGGTGTGTTTCGC
TTGGCTGTTGCTGTATGGGGTGAGCTGGATGGTCGGTGGATGCGTTTGTG
CGTGTCGTTTTTTTCATGGAGTGCGTTGCGGTTGTCGTCGCCATTTGGGAATT
TMATGTTTTGAGTCTCGATTCAATACATCTCA

>VN-Oo.23 *Pythium carolinianum*

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACAC
CAAAATCCTTTCCACGTGAACTGTCTTACGAGATTCGCGCCGTGACGTGTG
TTGTCACGTGTGTGTGCTGTACATATATATATGTATGGTGCGCATGGTGGCG
ACTGCGTGGGTCGGCTGATCGAAGGTTCGCATTGTGCTGTATTGCGCAGTGT
GGCTGACTTATTCTTTCAAACCCATTCCTTAATGACTGATTCACTGTGAG
GACGAAAGTCTTTGCTTTTACTAGATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTA
GGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAAT
TGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGG
TTATACCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTAAATCAAACCTTGCCCTCTC
TTTGTCGGTGTAGTCCGGCTTGGAGTGCGCAGATGTGAAGTGTCTCGCGCT
ACGTCAGTCTATTTCCGATAGGCTAGGCGCGCGAGTCCTTTTAAATGGACA
CGATCTTTCTATTGCTTTCTGCGGAGCGCATCATTTGAACGCGGCGGTCTTG
GGATCGCCTGCAGTCGATAGCGACTTTGGTAGAGACATATGGAATGACCCT
CATTTTCGCGGTACGTTAGGCTTCGGCTCGACAATGTTGCGTCGTGAGTGTG
TTGTTTCGTCTTTGCTTTGAGGTGTACTGTTCGGTTGTGGGCTTGAACCGAAG
TATTGTGTGTTAGTAGAGTGTGTTCGTTTTCTGTGGTTAGTGTCTGTGTGTGG
CCTTGTGTTCGCGCATAGGTAGAAGGGTATCATTTGGGAAACATTGTACTGC
GCGCTGGAAAGCGTGTGTGTATCTCATT

>VN-Oo.24 *Pythium carolinianum*

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACAC
CAAAATCCTTTCCACGTGAACTGTCTTACGAGATTCGCGCCGTGACGTGTG
TTGTCACGTGTGTGTGCTGTACATATATATATGTATGGTGCGCATGGTGGCG
ACTGCGTGGGTCGGCTGATCGAAGGTTCGCATTGTGCTGTATTGCGCAGTGT
GGCTGACTTATTCTTTCAAACCCATTCCTTAATGACTGATTCACTGTGAG
GACGAAAGTCTTTGCTTTTACTAGATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTA
GGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAAT
TGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGG
TTATACCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTAAATCAAACCTTGCCCTCTC
TTTGTCGGTGTAGTCCGGCTTGGAGTGCGCAGATGTGAAGTGTCTCGCGCT
ACGTCAGTCTATTTCCGATAGGCTAGGCGCGCGAGTCCTTTTAAATGGACA
CGATCTTTCTATTGCTTTCTGCGGAGCGCATCATTTGAACGCGGCGGTCTTG
GGATCGCCTGCAGTCGATAGCGACTTTGGTAGAGACATATGGAATGACCCT
CATTTTCGCGGTACGTTAGGCTTCGGCTCGACAATGTTGCGTCGTGAGTGTG
TTGTTTCGTCTTTGCTTTGAGGTGTACTGTTCGGTTGTGGGCTTGAACCGAAG
TATTGTGTGTTAGTAGAGTGTGTTCGTTTTCTGTGGTTAGTGTCTGTGTGTGG
CCTTGTGTTCGCGCATAGGTAGAAGGGTATCATTTGGGAAACATTGTACTGC
GCGCTGGAAAGCGTGTGTGTATCTCATT

>VN-Oo.25 *Pythium inflatum*

TCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACA
 CCATAAACTTTCCACGTGAACCGTTACAATTATGTTCTGTGCTCTCTCTCG
 GGAGGGCTGAACGAAGGTGGGCGCATGTATGTGTGTCTGCCGATGTACTTT
 TCAAACCCATTACTAAATACTGAACTATACTCCGAGAACGAAAGTTTTTGG
 TTTTAATCAATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGAT
 GAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGA
 GTCATCGAAATTTTGAACGCACATTGCACTTTCGGGATATTCTTGGAAGTA
 TGCTTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTTTGTGTAGTC
 AAGGAGAGAAATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGCTGGCTCCCTCTTCGGA
 GGAGAAGACGCGAGTCCCTTTAAATGYACGTTGCTCTTTCTTGTGTCTAA
 GTAGAAGTGTGACTATCGAACGCAGTGATCTGTTTGGATCGCTTTGCGCGA
 GTGGGCGACTTCGGTTAGGACATTAAAGGAAGCAACCTCTATTGGCGGTAT
 GTTAGGCTTCGGCCCGACTTTGCAGCTGACAGTGTGTTGTTTTCTGTTCTTT
 CCTTGAGGTGTACCTGTTTGTGTGAGGCAATGGTCTGGGCAAATGGTTATT
 GYGTAGTAGATGGKKGCTGCTCTTGGGCGCCCTACTCGTAGGGTAAA

>VN-Oo.26 *Pythium carolinianum*

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACAC
 CAAAATCCTTTCCACGTGAACTGTCTTACGAGATTCGCGCCGTGACGTGTG
 TTGTCACTGTGTGTGCTGTACATATATATATGTATGGTGCGCATGGTGGCG
 ACTGCGTGCGGTCGGCTGATCGAAGGTGCGATTGTGCTGTATTGCGCAGTGT
 GGCTGACTTATTCTTTCAAACCCATTCTTAATGACTGATTCTACTGTGAG
 GACGAAAGTCTTTGCTTTTACTAGATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTA
 GGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAAT
 TGCAGAATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTTCGGG
 TTATACCTGGAAGTATGTCTGTATCAGTGTCCGTAAATCAAACCTTGCCCTCTC
 TTTGTGCGGTGTAGTCCGGCTTGGAGTGCGCAGATGTGAAGTGTCTCGCGCT
 ACGTCAGTCTATTTCCGATAGGCTAGGCGCGCGAGTCCTTTTAAATGGACA
 CGATCTTTCTATTGCTTTCTGCGGAGCGCATCATTTGAACGCGGCGGTCTTG
 GGATCGCCTGCAGTCGATAGCGACTTTGGTAGAGACATATGGAATGACCCT
 CATTTTCGCGGTACGTTAGGCTTCGGCTCGACAATGTTGCGTCGTGAGTGTG
 TTGTTTCGTCTTTGCTTTGAGGTGTACTGTCGGTTGTGGGCTTGAACCGAAG
 TATTGTGTGTTAGTAGAGTGTGTCGTTTTCTGTGGTTAGTGTCTGTGTGTGG
 CCTTGTGTGCGCGCATAGGTAGAAGGGTATCATTTGGGAAACATTGTACTGC
 GCGCTGGAAAGCGTGTGTGTATCTCATT

>VN-Oo29 *Pythium deliense*

CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACA
 CCATAAACTTTCCACGTGAACCGTTGAAATCATGTTCTGTGCTCTCTCTCG
 GGAGGGCTGAACGAAGGTGGGCTGCTTAATTGTGGTCTGCCGATGTATTTT
 TCAAACCCATTTACCTAATACTGATCTATACTCCAAAAACGAAAGTTTCTG
 GTTTTAATCCATAACAACCTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGA
 TGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTG
 AGTCATCGAAATTTTGAACGCACATTGCACTTTCGGGTATGCCTGGAAGT
 ATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGCCTTTCTTTTTCTGTGTAGT
 CAGGGAGAGAGATGGCAGAATGTGAGGTGTCTCGTTGACTCCCTTTTCGGA

GGAGAAGACGCGAGTCCCTTTAAATGTACGTTTCGCTCTTTCTTGTGTCTAA
 GATGAAGTGTGATTCTCGAATCGCAGTGATCTGTTTGGATCGCTTTGCGCA
 TTTGGGCGACTTCGGTTAGGACATTAAAGGAAGCAACCTCTATTGGCGGTA
 TGTTAGGCTTCGGCCCCGACGTTGCAGCTGACGGAGTGTGGTTTTCTGTTCTT
 TCCTTGAGGTGTACCTGATTTGTGTGAGGCAATGGTCTGGGCAAATGGTTG
 CTGTGTAGTAGGGTTTTGCTGCTCTTGGGCGCCCTGTTTTTCGGATAGGGTA
 AAGAAGGCAACACCAATTTGGGACTGTTTGCTTTTAGCAGACAATTTTCTA
 ATTGGACCTGATATCAG

>VN-Oo30 *Phytophthora palmivora*

TTTCTTCTTCTTCCCCCCCCCTTTTATTATGTAAAGTTCAGCGGGTAATCT
 TGCCTGATATCAGGTCCAATTGAGATGCATGCCGAAGCATAACAAGTTCC
 CAAATGGATCGACCCTCGACAGCCGAAGCCGCCACTCTACTTCGCAACAG
 CAAAGCCAATTCAAAAGCCAAGCTCACATAGCTACGGTTCACCAATCATA
 CCACCACAGCTGAAGAAATATTCAATAAGCGTCTGTTCAGCCGAAGCCAA
 CCATACCGCGAATCGAACACTCCTCCATTAAACGCCACAGCAGACAAACTG
 GTCGCCAGACTGGCTACGCAAGCAGCCTCCACAATCAGCAACGCCACGCT
 TTTGGAGCAAAGAGAAGTACAGTTCAGTACATTTCAAAGGACTCACAGCC
 GATCCGAAGACCAGCCGCAAGACACTTCACATCTGGCACATCCACCACCG
 ACTACACGGAAGGAAGAAAACCAAGTTTGATGTACGGACACTGATACAGG
 CATACTCCCAGGACTAACCCGGAAGTGCAATATGCGTTCAAATTTTCGATG
 ACTCACTGAATCCTGCAATTCGCATTACGTATCGCAGTTCGCAGCGTTCTTC
 ATCGATGTGCGAGCCTAGACATCCACTGCTGAAAGTTGCTATCTAGTTAAA
 AGCAGAGACTTTCGTCCCTACAGTATAATCAGTTATAAAGAATGGGTTTAA
 AAAAGCTACTAGTTCAGACCGAAGCCCAAACGCTCGCCATGATAGAGCTC
 TCCCAACCGCAGCCGCCAGCAATGAAGCCAGCAGCCGCCGCCGAAAGAGA
 CCCCCAATAAGTTTTGATACGGTTCACGTGGAAAGTTTTTAGGTGTGGTA
 ATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAACTTAA

>VN-Oo33 *Phytophthora palmivora*

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACAC
 CTAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAAACTTAGTTGGGGGTCTCTTTC
 GGCGGCGGCTGCTGGCTTCATTGCTGGCGGCTGCTGTTGGGAGAGCTCTAT
 CATGGCGAGCGTTTGGGCTTCGGTCTGAACTAGTAGCTTTTTTAAACCCAT
 TCTTTATAACTGATTATACTGTAGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGAT
 AGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCT
 GCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAA
 TTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATC
 AGTGTCCGTACATCAAACTTGGTTTTCTTCCCTTCCGTGTAGTCGGTGGTGGA
 TGTGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGGTCTTCGGATCGGCTGTGAGTC
 CTTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCCAAAAGCGTGGCGTTGC
 TGATTGTGGAGGCTGCTTGCGTAGCCAGTCTGGCGACCAGTTTGTCTGCTG
 TGGCGTTAATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAA
 CAGACGCTTATTGAATATTTCTTCAGCTGTGGTGGTATGATTGGTGAACCG
 TAGCTATGTGAGCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGAGT

GGCGGCTTCGGCTGTCTGAGGGTCGATCCATTTGGGAACCTTGTGTATGCTTC
GGCATGCATCTCAAT

>VN-Oo38 *Phytophthora palmivora*

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACAC
CTAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAAAACTTAGTTGGGGGTCTCTTTC
GGCGGCGGCTGCTGGCTTCATTGCTGGCGGCTGCTGTTGGGAGAGCTCTAT
CATGGCGAGCGTTTGGGCTTCGGTCTGAACTAGTAGCTTTTTTAAACCCAT
TCTTTATAACTGATTATACTGTAGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGAT
AGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCT
GCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAA
TTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATC
AGTGTCCGTACATCAAACCTTGGTTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGTGA
TGTGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGCTGGTCTTCGGATCGGCTGTGAGTC
CTTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCCAAAAGCGTGGCGTTGC
TGATTGTGGAGGCTGCTTGCGTAGCCAGTCTGGCGACCAGTTTGTCTGCTG
TGGCGTTAATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAA
CAGACGCTTATTGAATATTTCTTCAGCTGTGGTGGTATGATTGGTGAACCG
TAGCTATGTGAGCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGAGT
GGCGGCTTCGGCTGTCTGAGGGTCGATCCATTTGGGAACCTTGTGTATGCTTC
GGCATGCATCTCAAT

>VN-Oo48 *Phytophthora mekongensis*

AACCTGGCGGGAAGGATCATTAACCACACCTAAAAAACTTTCCACGT
GAACCGTATCAACCTTTTAGTTGGGGGTGTTGCTTGGCATTTTGCTGAGC
CGCGCCCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTCGGTCTGGGCTAGTAGCTTTTT
TGTTTTAAACCATTTAACAATACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTTCTC
TGCTTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACAT
CGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCA
GTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTAGTCCTGGG
AGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGGCTTTCTTCCTTCCGTG
TAGTCGGTGGAGGATGTGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGTTTGTGTGCCT
TCGGGCCGAGGCTGCGAGTCCTTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTT
GCTCGAAAAGCGTGGTGTGCTGGTGTGGAGGCTGCCTGCGTGGCCAGTC
GGCGGCCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAAATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCG
GTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGGCGCTTATTGTATGCTTTTCCTGCTGTG
GCGTGATGGGCTGGTGAACCGTAGCTGTGTGTGGCTTGGCTTTTGAACCGG
CTTTGCTGTTGCGAAGTAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTCTGAGTGTCTGATCCA
TTTTGGGAACCTTTTGTGTGCGCTTCGAGTGTGCATCTCAA

>VN-Oo52 *Phytophthora mekongensis*

AACCTGGCGGGAAGGATCATTAACCACACCTAAAAAACTTTCCACGT
GAACCGTATCAACCTTTTAGTTGGGGGTGTTGCTTGGCATTTTGCTGAGC
CGCGCCCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTCGGTCTGGGCTAGTAGCTTTTT
TGTTTTAAACCATTTAACAATACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTTCTC
TGCTTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACAT
CGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCA

GTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGGG
 AGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGGCTTTCTTCCTTCCGTG
 TAGTCGGTGGAGGATGTGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGTTTGTGTGCCT
 TCGGGCCGAGGCTGCGAGTCCTTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTT
 GCTCGAAAAGCGTGGTGTGCTGGTTGTGGAGGCTGCCTGCGTGGCCAGTC
 GGCGGCCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAATGGAGGAGTGTTTCGATTTCGCG
 GTATGGTTGGCTTTCGGCTGAACAGGCGCTTATTGTATGCTTTTCCTGCTGTG
 GCGTGATGGGCTGGTGAACCGTAGCTGTGTGTGGCTTGGCTTTTGAACCGG
 CTTTGCTGTTGCGAAGTAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTGCGAGTGTGATCCA
 TTTTGGGAACTTTGTGTGCGCTTCGAGTGTGCATCTCAA

>VN-Oo58 *Phytophthora nicotianae*

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACAC
 CTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAGTTGGGGGTCTTAT
 TTGGCGGCGGCTGCTGGCTTAATTGTTGGCGGCTGCTGCTGAGTGAGCCCT
 ATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCGGCCTGATTTAGTAGTCTTTTTT
 TTCTTTTAAACCCATTCTTAATACTGAATATACTGTGGGGACGAAAGTCT
 CTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACA
 TCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTC
 AGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGG
 AAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATTAAACTTGACTTTCTTCCTTCCGT
 GTAGTCGGTGGAGGAGATGTCAGATGTGAAGTGTCTTGCGATTGGTCTTCG
 GACCGGCTGCGAGTCCTTTTAAATGTACTAAACTGAACTTCTCTTTGCTCG
 AAAAGTGGTGGCGTTGCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCG
 ACTGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTAATGGAAGAGTGTTTCGATTTCGTGGTATG
 GTTGGCTTCGGCTGAACAATGCACTTATTGGACGTTTTTTCCTGCTGTGGCGT
 GATGGACTGGTGAACCATAGCTCGGTGGCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGC
 TGTTCGGAAGTAGGGTGGCAGCTTCGGTTGTGCGAGGGTCGATCCATTTGGG
 AACTTAATGTGTACTTTCGGTATGCATCTCAAT

>VN-Oo65 *Phytophthora nicotianae*

GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCACAC
 CTAAAAAACTTTCCACGTGAACCGTTTCAACCCAATAGTTGGGGGTCTTAT
 TTGGCGGCGGCTGCTGGCTTAATTGTTGGCGGCTGCTGCTGAGTGAGCCCT
 ATCAAAAAAAGGCGAACGTTTGGGCTTCGGCCTGATTTAGTAGTCTTTTTT
 TTCTTTTAAACCCATTCTTAATACTGAATATACTGTGGGGACGAAAGTCT
 CTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACA
 TCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTC
 AGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTTAGTCCTGG
 AAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATTAAACTTGACTTTCTTCCTTCCGT
 GTAGTCGGTGGAGGAGATGTCAGATGTGAAGTGTCTTGCGATTGGTCTTCG
 GACCGGCTGCGAGTCCTTTTAAATGTACTAAACTGAACTTCTCTTTGCTCG
 AAAAGTGGTGGCGTTGCTGGTTGTGAAGGCTGCTATTGTGGCAAATTGGCG
 ACTGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTAATGGAAGAGTGTTTCGATTTCGTGGTATG
 GTTGGCTTCGGCTGAACAATGCACTTATTGGACGTTTTTTCCTGCTGTGGCGT
 GATGGACTGGTGAACCATAGCTCGGTGGCTTGGCTTTTGAATTGGCTTTGC

TGTTGCGAAGTAGGGTGGCAGCTTCGGTTGTCGAGGGTCGATCCATTTGGG
AACTTAATGTGTACTTCGGTATGCATCTCAAT

>VN-Oo68 *Phytophthora mekongensis*

ACCTGGCGGGAAGGATCATTAACCACACCTAAAAAACTTTCCACGTG
AACCGTATCAACCCTTTTAGTTGGGGGTGTTGCTTGGCATTGCTGAGCC
GCGCCCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTCGGTCTGGGCTAGTAGCTTTTT
GTTTTAAACCATTTAACAATACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTG
CTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCG
ATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGT
GAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTAGTCCTGGGAG
TATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGGCTTTCTTCCTTCCGTGTA
GTCGGTGGAGGATGTGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGTTTGTGTGCCTTC
GGCCCGAGGCTGCGAGTCCTTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGC
TCGAAAAGCGTGTTGCTGGTGTGGAGGCTGCCTGCGTGGCCAGTCGG
CGGCCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGT
ATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGGCGCTTATTGTATGCTTTTCCTGCTGTGGC
GTGATGGGCTGGTGAACCGTAGCTGTGTGTGGCTTGGCTTTTGAACCGGCT
TTGCTGTTGCGAAGTAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGTGTGATCCATT
TGGGAACTTTTGTGTGCGCTTCGAGTGTGCATCTCAATGGACCTGAAT

>VN-Oo72 *Phytophthora mekongensis*

ACCTGGCGGGAAGGATCATTAACCACACCTAAAAAACTTTCCACGTG
AACCGTATCAACCCTTTTAGTTGGGGGTGTTGCTTGGCATTGCTGAGCC
GCGCCCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTCGGTCTGGGCTAGTAGCTTTTT
GTTTTAAACCATTTAACAATACTGATTATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTG
CTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCG
ATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGT
GAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGGTAGTCCTGGGAG
TATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAACCTTGGCTTTCTTCCTTCCGTGTA
GTCGGTGGAGGATGTGCCAGATGTGAAGTGTCTTGCGGTTTGTGTGCCTTC
GGCCCGAGGCTGCGAGTCCTTTGAAATGTACTGAACTGTACTTCTCTTTGC
TCGAAAAGCGTGTTGCTGGTGTGGAGGCTGCCTGCGTGGCCAGTCGG
CGGCCGGTTTGTCTGCTGCGGCGTTTAATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGT
ATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGGCGCTTATTGTATGCTTTTCCTGCTGTGGC
GTGATGGGCTGGTGAACCGTAGCTGTGTGTGGCTTGGCTTTTGAACCGGCT
TTGCTGTTGCGAAGTAGAGTGGCGGCTTCGGCTGTCGAGTGTGATCCATT
TGGGAACTTTTGTGTGCGCTTCGAGTGTGCATCTCAATGGACCTGAAT

>VN-Oo76 *Phytophthora citrophthora*

AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCTTTTAGTTGGGGGTGTT
GCTTGGCGTTTTTTGCTGAGCCACGCCCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTC
GGTCTGGGCTAGTAGCTTTTTTTGTTTTAAACCATTTAACAATACTGATTAT
ACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGT
GGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGT
AATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGC
ACTTCCGGGTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAA

CTTGGCTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGAGGATGTGCCAGATGTGAAG
 TGTCTTGCGGTTTTGTGTGCCTTCGGGCCGAGGCTGCGAGTCCTTTGAAAT
 GACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGGTGTGCTGGTTGTG
 GAGGCTGCCTGCGTGGCCAGTCGGCGACCGGTTTTGTCTGCTGCGGCGTTTA
 ATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGGCGCT
 TATTGTATGCTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGGCTGGTGAACCGTAGCTGT
 GTGTGGCTTGGCTTTTGAACCGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGAGTGGCGGC
 TTCGGCTGTTCGAGTGTCGATCCATTTTGGGAACGTTTGTGTGCGCTTCGAGT
 GTGCATCTCAATTGGACC

>VN-Oo78 *Phytophthora citrophthora*

AAAAAACTTTCCACGTGAACCGTATCAACCCTTTTAGTTGGGGGTGTT
 GCTTGGCGTTTTTGTGCTGAGCCACGCCCTATCATGGCGAATGTTTGGACTTC
 GGTCTGGGCTAGTAGCTTTTTTGTTTTAAACCCATTTAACAATACTGATTAT
 ACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGATAGCAACTTTCAGCAGT
 GGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGATACGT
 AATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAATTTTGAACGCATATTGC
 ACTTCCGGGTTAGTCCTGGGAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCAAA
 CTTGGCTTTCTTCCTTCCGTGTAGTCGGTGGAGGATGTGCCAGATGTGAAG
 TGTCTTGCGGTTTTGTGTGCCTTCGGGCCGAGGCTGCGAGTCCTTTGAAAT
 GACTGAACTGTACTTCTCTTTGCTCGAAAAGCGTGGTGTGCTGGTTGTG
 GAGGCTGCCTGCGTGGCCAGTCGGCGACCGGTTTTGTCTGCTGCGGCGTTTA
 ATGGAGGAGTGTTTCGATTCGCGGTATGGTTGGCTTCGGCTGAACAGGCGCT
 TATTGTATGCTTTTCCTGCTGTGGCGTGATGGGCTGGTGAACCGTAGCTGT
 GTGTGGCTTGGCTTTTGAACCGGCTTTGCTGTTGCGAAGTAGAGTGGCGGC
 TTCGGCTGTTCGAGTGTCGATCCATTTTGGGAACGTTTGTGTGCGCTTCGAGT
 GTGCATCTCAATTGGACC

Регион Cox1 (Oomycetes):

>VN-Oo76 *Phytophthora citrophthora*

AATTTTATATTTAATTTTTTAAGTGCTTTTGCAGGTGTTGTTGGGTACA
 ACATTATCTCTTTTAATTCGTATGGAATTAGCACAACCAGGTAATCAAATT
 TTTATGGGAAATCATCAATTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTCA
 TCATGGTTTTCTTTTATGTTATGCCTGCTTTAATTGGAGGTTTTGGTAATTG
 GTTTGTTCCTTTAATGATAGGTGCACCTGATATGGCTTTTCCTCGTATGAAT
 AATATAAGTTTTTGGTTATTACCTCCAGCTTTATTATTATTAGTTTCATCAG
 CTATTGTTGAATCAGGTGCTGGTACAGGTTGGACAGTTTATCCACCATTAT
 CAAGTGTACAAGCACACTCAGGTCCTTCAGTAGATTTAGCTATTTTTAGTTT
 ACATTTAACTGGTATTTCTTCATTATTAGGTGCAATTAATTTTATATCAACT
 ATTTATAATATGAGAGCTCCTGGTTTAAAGTTTTTCATAGATTACCTTTATTG
 TTTGGTCTGTATTAATTACAGCATTTCTTTTATTATTAACCTTTACCTGTATTA
 GCTGGTGCAATTACTATGTTATTAACCTGATAGAAATTTAAATACTTCTTTCT
 ATGATCCTTCAGGTGGAGGTGATCCAGTATTATATCAACATTTATTTTGGTT
 TTTGGTCATCCAGAAGTTATATTTAATTTACTGGATTTGGATANAAAGTCA
 AGTATTAA

>VN-Oo78 *Phytophthora citrophthora*

AATTTTATATTTAATTTTTTAAGTGCTTTTGCAGGTGTTGTTGGGTACA
 ACATTATCTCTTTTAATTCGTATGGAATTAGCACACCAGGTAATCAAATT
 TTTATGGGAAATCATCAATTATATAATGTAATTGTTACTGCTCATGCTTTCA
 TCATGGTTTTCTTTTTAGTTATGCCTGCTTTAATTGGAGGTTTTGGTAATTG
 GTTTGTTCCTTTAATGATAGGTGCACCTGATATGGCTTTTCCTCGTATGAAT
 AATATAAGTTTTTGGTTATTACCTCCAGCTTTATTATTATTAGTTTCATCAG
 CTATTGTTGAATCAGGTGCTGGTACAGGTTGGACAGTTTATCCACCATTAT
 CAAGTGTACAAGCACACTCAGGTCCTTCAGTAGATTTAGCTATTTTTAGTTT
 ACATTTAACTGGTATTTCTTCATTATTAGGTGCAATTAATTTTTATATCAACT
 ATTTATAATATGAGAGCTCCTGGTTTAAGTTTTTCATAGATTACCTTTATTTG
 TTTGGTCTGTATTAATTACAGCATTTCTTTTATTATTAACCTTTACCTGTATTA
 GCTGGTGCAATTACTATGTTATTAACCTGATAGAAATTTAAATACTTCTTTCT
 ATGATCCTTCAGGTGGAGGTGATCCAGTATTATATCAACATTTATTTTGGTT
 TTTGGTCATCCAGAAGTTATATTTAATTTACTGGATTTGGATANAAAGTCA
 AGTATTAA

>VN-Oo68 *Phytophthora mekongensis*

ACTTTATATTTTAATTTTTTAAGTGCTTTTGCAGGTGTTGTTTGGTACAA
 CATTATCTCTTTTAATTCGTATGGAATTGGCACACCCTGGTAATCAAATTTT
 TATGGGAAATCATCAATTATATAATGTTGTTGTTACTGCTCACGCTTTTATT
 ATGGTTTTCTTTTTAGTTATGCCAGCTTTAATTGGAGGTTTTGGTAATTGGT
 TTGTTCCTTTAATGATAGGTGCACCTGATATGGCTTTTCCTCGTATGAATAA
 TATAAGTTTTTGGTTATTACCTCCAGCTTTATTATTATTAGTTTCATCAGCT
 ATTGTTGAATCTGGTGCTGGTACAGGTTGGACAGTTTATCCACCATTATCT
 AGTGTACAAGCACACTCAGGTCCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTAGTTTAC
 ATTTAACAGGTATTTCTTCATTATTAGGTGCAATTAATTTTTATTTCAACTAT
 TTATAATATGAGAGCTCCTGGTTTAAGTTTTTCATAGATTACCTTTATTTGTT
 TGGTCTGTATTAATTACAGCATTTCTTTTATTATTAACCTTTACCTGTATTAG
 CTGGTGCAATTACTATGTTATTAACCTGATAGAAATTTAAACACTTCTTTTTA
 TGATCCTTCAGGTGGAGGTGATCCTGTATTATATCAACATTTATTTTGGTTT
 TTGGTCATCCAGAAGTTATATTTAATTTACAGGATTTGGTATCATTAAGTCA
 AGTATCTAAAC

>VN-Oo72 *Phytophthora mekongensis*

ACTTTATATTTTAATTTTTTAAGTGCTTTTGCAGGTGTTGTTTGGTACAA
 CATTATCTCTTTTAATTCGTATGGAATTGGCACACCCTGGTAATCAAATTTT
 TATGGGAAATCATCAATTATATAATGTTGTTGTTACTGCTCACGCTTTTATT
 ATGGTTTTCTTTTTAGTTATGCCAGCTTTAATTGGAGGTTTTGGTAATTGGT
 TTGTTCCTTTAATGATAGGTGCACCTGATATGGCTTTTCCTCGTATGAATAA
 TATAAGTTTTTGGTTATTACCTCCAGCTTTATTATTATTAGTTTCATCAGCT
 ATTGTTGAATCTGGTGCTGGTACAGGTTGGACAGTTTATCCACCATTATCT
 AGTGTACAAGCACACTCAGGTCCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTAGTTTAC
 ATTTAACAGGTATTTCTTCATTATTAGGTGCAATTAATTTTTATTTCAACTAT
 TTATAATATGAGAGCTCCTGGTTTAAGTTTTTCATAGATTACCTTTATTTGTT
 TGGTCTGTATTAATTACAGCATTTCTTTTATTATTAACCTTTACCTGTATTAG

CTGGTGCAATTACTATGTTATTAAGTATAGAAATTTAAACACTTCTTTTTA
TGATCCTTCAGGTGGAGGTGATCCTGTATTATATCAACATTTATTTTGGTTT
TTGGTCATCCAGAAGTTATATTTAATTTACAGGATTTGGTATCATTAAGTCA
AGTATCTAAAC

>VN-Oo58 *Phytophthora nicotianae*

AATTTTATATTTAATTTTAAAGTAGCTTTTGCTGGGTGTTTGTAGGTAC
AACACTATCTCTTTTAATTAGAATGGAATTAGCACAACTGGTAATCAAAT
TTTTATGGGTAATCATCAATTATATAATGTTGTTGTTACAGCACATGCTTTT
ATTATGGTATTTTTTTTTAGTTATGCCTGCTTTAATTGGTGGGTGTTGGTAACT
GGTTTGTACCTTTAATGATAGGTGCTCCTGATATGGCATTTCCTCGTATGAA
TAATATAAGTTTTTGGTTATTACCTCCAGCTTTATTATTATTAGTTTCATCA
GCTATTGTAGAATCTGGTGCTGGTACTGGTTGGACTGTTTATCCCCCATTAT
CTAGTGTACAAGCACATTCAGGTCCTTCTGTAGATTTAGCGATTTTATAGTTT
ACATTTATCAGGTATTTCTTCTTTATTAGGTGCTATTAATTTTATTTCAACTA
TTTATAATATGAGAGCTCCTGGTTTAAGTTTTTCATAGATTACCTTTATTCGT
ATGGTCTATATTAATTACCGCATTTCTTTTATTATTAACCTTTACCTGTATTA
GCTGGAGCAATTACTATGTTATTAACAGATAGAAATTTAAATACTTCTTTTT
ATGATCCATCTGGTGGAGGTGATCCAGTATTATATCAACATTTATTTTGGTT
TTTGGTCATCCAGAAGTTATGTTTAATTTTACAGCATTTGTATCATAAGTCA
AGTAATAAAT

>VN-Oo65 *Phytophthora nicotianae*

AATTTTATATTTAATTTTAAAGTAGCTTTTGCTGGGTGTTTGTAGGTAC
AACACTATCTCTTTTAATTAGAATGGAATTAGCACAACTGGTAATCAAAT
TTTTATGGGTAATCATCAATTATATAATGTTGTTGTTACAGCACATGCTTTT
ATTATGGTATTTTTTTTTAGTTATGCCTGCTTTAATTGGTGGGTGTTGGTAACT
GGTTTGTACCTTTAATGATAGGTGCTCCTGATATGGCATTTCCTCGTATGAA
TAATATAAGTTTTTGGTTATTACCTCCAGCTTTATTATTATTAGTTTCATCA
GCTATTGTAGAATCTGGTGCTGGTACTGGTTGGACTGTTTATCCCCCATTAT
CTAGTGTACAAGCACATTCAGGTCCTTCTGTAGATTTAGCGATTTTATAGTTT
ACATTTATCAGGTATTTCTTCTTTATTAGGTGCTATTAATTTTATTTCAACTA
TTTATAATATGAGAGCTCCTGGTTTAAGTTTTTCATAGATTACCTTTATTCGT
ATGGTCTATATTAATTACCGCATTTCTTTTATTATTAACCTTTACCTGTATTA
GCTGGAGCAATTACTATGTTATTAACAGATAGAAATTTAAATACTTCTTTTT
ATGATCCATCTGGTGGAGGTGATCCAGTATTATATCAACATTTATTTTGGTT
TTTGGTCATCCAGAAGTTATGTTTAATTTTACAGCATTTGTATCATAAGTCA
AGTAATAAAT

>VN-Oo30 *Phytophthora palmivora*

GTTGGTATAATACTGGATCTCCTCCCCCAGATGGATCATAAAAAGAAG
TATTTAAATTTCTATCAGTTAATAACATAGTAATCGCACCTGCTAATACTG
GTAATGTTAATAATAAAAGAAAAGCAGTAATTAATAAGACACACAAAT
AAAGGTAATCTATGAAAACCTTAATCCAGGAGCTCTCATATTATAAATAGTT
GAAATAAAATTAATAGCACCTAATAACGAAGAAATACCTGTTAAATGTAA
ACTAAAAATAGCTAAATCAACAGAAGGTCCTGAATGTGCTTGTACACTTGA
TAATGGTGGATAAACAGTCCAACCAGTACCAGCACCAGATTCAACAATAG

CAGATGAACTAATAATAATAAAGCTGGGGGTAATAACCAAAAACTTATA
 TTATTCATACGTGGAAAAGCCATATCAGGTGCACCGATCATTAAAGGAAC
 AAACCAATTACCAAAAACCACCAATTAAAGCAGGCATAACTAAAAAAAAAA
 CCATAATAAAAGCATGAGCAGTCACAACAACATTATATAATTGATGATTTC
 CCATAAAAATTTGATTACCTGGTTGTGATAATTCCATTCTAATTAAGAG
 ATAAAGTTGTACCAACTACACCAGCAAAAGCACTAAAAATTAAATATAAA
 GTTCCAATATCTTTATGATTTGTTGAAAAA

>VN-Oo33 *Phytophthora palmivora*

ACTTTTATATTTAATTTTAAAGTGCTTTTGCTGGGTGTAGTTGGTACAA
 CTTTATCTCTTTTAATTAGAATGGAATTATCACAACCAGGTAATCAAATTTT
 TATGGGAAATCATCAATTATATAATGTTGTTGTGACTGCTCATGCTTTTATT
 ATGGTTTTTTTTTTAGTTATGCCTGCTTTAATTGGTGGTTTTGGTAATTGGTT
 TGTTCCTTTAATGATCGGTGCACCTGATATGGCTTTTCCACGTATGAATAAT
 ATAAGTTTTTGGTTATTACCCCCAGCTTTATTATTATTAGTTTCATCTGCTAT
 TGTTGAATCTGGTGCTGGTACTGGTTGGACTGTTTATCCACCATTATCAAGT
 GTACAAGCACATTCAGGACCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTTAGTTTACATT
 TAACAGGTATTTCTTCGTTATTAGGTGCTATTAATTTTATTCAACTATTTA
 TAATATGAGAGCTCCTGGATTAAGTTTTTCATAGATTACCTTTATTTGTGTGG
 TCTATTTTAATTACTGCTTTTCTTTTATTATTAACATTACCAGTATTAGCAG
 GTGCGATTACTATGTTATTAAGTATAGAAATTTAAATACTTCTTTTTATGA
 TCCATCTGGGGGAGGAGATCCAGTATTATACCAACATTTATTTTGGTTTTTG
 GTCATCCTGAAGTTATGTTTAATTTACCAGCTTTTGGATCATAAAGTCAAGT
 ATCCAATT

>VN-Oo38 *Phytophthora palmivora*

ACTTTTATATTTAATTTTAAAGTGCTTTTGCTGGGTGTAGTTGGTACAA
 CTTTATCTCTTTTAATTAGAATGGAATTATCACAACCAGGTAATCAAATTTT
 TATGGGAAATCATCAATTATATAATGTTGTTGTGACTGCTCATGCTTTTATT
 ATGGTTTTTTTTTTAGTTATGCCTGCTTTAATTGGTGGTTTTGGTAATTGGTT
 TGTTCCTTTAATGATCGGTGCACCTGATATGGCTTTTCCACGTATGAATAAT
 ATAAGTTTTTGGTTATTACCCCCAGCTTTATTATTATTAGTTTCATCTGCTAT
 TGTTGAATCTGGTGCTGGTACTGGTTGGACTGTTTATCCACCATTATCAAGT
 GTACAAGCACATTCAGGACCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTTAGTTTACATT
 TAACAGGTATTTCTTCGTTATTAGGTGCTATTAATTTTATTCAACTATTTA
 TAATATGAGAGCTCCTGGATTAAGTTTTTCATAGATTACCTTTATTTGTGTGG
 TCTATTTTAATTACTGCTTTTCTTTTATTATTAACATTACCAGTATTAGCAG
 GTGCGATTACTATGTTATTAAGTATAGAAATTTAAATACTTCTTTTTATGA
 TCCATCTGGGGGAGGAGATCCAGTATTATACCAACATTTATTTTGGTTTTTG
 GTCATCCTGAAGTTATGTTTAATTTACCAGCTTTTGGATCATAAAGTCAAGT
 ATCCAATT

>VN-Oo48 *Phytophthora mekongensis*

TGTTGATATAATACAGGATCACCTCCACCTGAAGGATCATAAAAAGA
 AGTGTTTAAATTTCTATCAGTTAATAACATAGTAATTGCACCAGCTAATAC
 AGGTAAAGTTAATAATAAAAGAAATGCTGTAATTAATACAGACCAAAACA
 ATAAAGGTAATCTATGAAAACCTTAAACCAGGAGCTCTCATATTATAAATAG

TTGAAATAAAAATTAATTGCACCTAATAATGAAGAAATACCTGTTAAATGTA
 AACTAAAAATAGCTAAATCTACAGAAGGACCTGAGTGTGCTTGTACACTA
 GATAATGGTGGATAAACTGTCCAACCTGTACCAGCACCAGATTCAACAAT
 AGCTGATGAACTAATAATAATAAAGCTGGAGGTAATAACCAAAAACTTA
 TATTATTCATACGAGGAAAAGCCATATCAGGTGCACCTATCATTAAAGGAA
 CAAACCAATTACCAAAAACCTCCAATTAAAGCTGGCATAACTAAAAAGAAA
 ACCATAATAAAAAGCGTGAGCAGTAACAACAACATTATATAATTGATGATTT
 CCCATAAAAATTTGATTACCAGGTTGTGCCAATTCCATACGAATTAAAAGA
 GATAATGTTGTACCAACAACACCTGCAAAAAGCACTAAAAATTAAATATAA
 AGTTCCAATATCTTTATGATTTGTT

>VN-Oo52 *Phytophthora mekongensis*

TGTTGATATAATACAGGATCACCTCCACCTGAAGGATCATAAAAAGA
 AGTGTTTAAATTTCTATCAGTTAATAACATAGTAATTGCACCAGCTAATAC
 AGGTAAAGTTAATAATAAAAAGAAATGCTGTAATTAATACAGACCAAACAA
 ATAAAGGTAATCTATGAAAACTTAAACCAGGAGCTCTCATATTATAAATAG
 TTGAAATAAAAATTAATTGCACCTAATAATGAAGAAATACCTGTTAAATGTA
 AACTAAAAATAGCTAAATCTACAGAAGGACCTGAGTGTGCTTGTACACTA
 GATAATGGTGGATAAACTGTCCAACCTGTACCAGCACCAGATTCAACAAT
 AGCTGATGAACTAATAATAATAAAGCTGGAGGTAATAACCAAAAACTTA
 TATTATTCATACGAGGAAAAGCCATATCAGGTGCACCTATCATTAAAGGAA
 CAAACCAATTACCAAAAACCTCCAATTAAAGCTGGCATAACTAAAAAGAAA
 ACCATAATAAAAAGCGTGAGCAGTAACAACAACATTATATAATTGATGATTT
 CCCATAAAAATTTGATTACCAGGTTGTGCCAATTCCATACGAATTAAAAGA
 GATAATGTTGTACCAACAACACCTGCAAAAAGCACTAAAAATTAAATATAA
 AGTTCCAATATCTTTATGATTTGTT

>VN-Oo16 *Pythium deliense*

AACAAATCACAAAGATATCGGTACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTTT
 TCAGGTGTAGTTGGTACAACCTTTATCTGTTTTAATTAGAATGGAATTAGCG
 CAACCAGGTAATCAAATTTTTATGGGAAACCATCAATTATATAATGTTGTT
 GTAACAGCTCATGCTTTTATAATGATTTTCTTTATGGTTATGCCTGTATTAA
 TCGGTGGTTTTGGTAACCTGGTTTATCCCTTTAATGATAGGTGCTCCTGATAT
 GGCTTTTCCAAGAATGAATAATATTAGTTTTTGGTTATTACCTCCTTCATTA
 TTATTATTAGTATCTTCTGCCATTGTAGAATCTGGTGCAGGTACAGGTTGG
 ACAGTATATCCACCATTATCAAGTGTACAAGCACACTCTGGTCCTTCAGTA
 GATTTAGCTATTTTTAGTTTACACTTATCAGGTATTTCTTCATTATTAGGTG
 CTATTAATTTTTTATCAACTATTTATAATATGAGAGCTCCAGGATTAAGTTT
 TCATAGATTACCTTTATTCGTATGGTCAGTATTTATTACAGCTTTCTTATTA
 TTATTAACATTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATGTTATTAACAGAC
 AGAACTTAAATACTTCTTTTTATGATCCTTCAGGTGGAGGTGATCCCGTA
 TTATATCAACATTTATTTTGGT

>VN-Oo29 *Pythium deliense*

AACAAATCACAAAGATATCGGTACTTTATATTTAATTTTTGGTGCTTTT
 TCAGGTGTAGTTGGTACAACCTTTATCTGTTTTAATTAGAATGGAATTAGCG
 CAACCAGGTAATCAAATTTTTATGGGAAACCATCAATTATATAATGTTGTT

GTAACAGCTCATGCTTTTATAATGATTTTCTTTATGGTTATGCCTGTATTAA
 TCGGTGGTTTTGGTAACTGGTTTATCCCTTTAATGATAGGTGCTCCTGATAT
 GGCTTTTCCAAGAATGAATAATATTAGTTTTTGGTTATTACCTCCTTCATTA
 TTATTATTAGTATCTTCTGCCATTGTAGAATCTGGTGCAGGTACAGGTTGG
 ACAGTATATCCACCATTTATCAAGTGTACAAGCACACTCTGGTCCTTCAGTA
 GATTTAGCTATTTTTAGTTTACACTTATCAGGTATTTCTTCATTATTAGGTG
 CTATTAATTTTTTATCAACTATTTATAATATGAGAGCTCCAGGATTAAGTTT
 TCATAGATTACCTTTATTCGTATGGTCAGTATTTATTACAGCTTTCTTATTA
 TTATTAACATTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATGTTATTAACAGAC
 AGAAACTTAAATACTTCTTTTTATGATCCTTCAGGTGGAGGTGATCCCGTA
 TTATATCAACATTTATTTTGGT

*** *Bacillus pumilus* (Регион 16S)**

>VN-H5 (OQ617941)

CTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTT
 AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGA
 TAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGT
 TCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACCTACAGATGGACCCGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCC
 GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG
 GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT
 TAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAA
 CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCT
 TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAAC
 TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTG
 AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGT
 CTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTC
 CGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
 GTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTG
 GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
 ATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACA
 GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTC
 TAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT
 CATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAA
 AAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGT
 TCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC
 GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
 CGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTAT
 GGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCA

>VN-H8 (OQ617942)

CTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTT
 AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGA
 TAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGT
 TCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCC
 GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG
 GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT
 TAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAA
 CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCT
 TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAAC
 TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTG
 AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGCGGAAGGCGACTCTCTGGT
 CTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGCGGAGCGAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTC
 CGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
 GTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTG
 GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
 ATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACA
 GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTC
 TAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT
 CATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACA
 AAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGT
 TCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC
 GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
 CGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTAT
 GGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCA

>VN-F8 (OQ617943)

CTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTT
 AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGA
 TAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGT
 TCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCC
 GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG
 GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT
 TAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAA
 CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTTCT
 TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAAC
 TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTG

AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGT
 CTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTC
 CGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
 GTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTG
 GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
 ATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACA
 GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTC
 TAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT
 CATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACA
 AAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGT
 TCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC
 GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC
 CGTCACACCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTAT
 GGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCA

>VN-K13 (OQ617944)

CTATACATGCAGTCGAGCGGACAGAAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTT
 AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTGCCTGTAAGACTGGGA
 TAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCCTGAACCGCATGGT
 TCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCGCGGCG
 CATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCC
 GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
 CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG
 GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGT
 TAGGGAAGAACAAGTGCGAGAGTAAGTCTCGCACCTTGACGGTACCTAA
 CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCT
 TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAAC
 TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTG
 AAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGT
 CTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGAT
 ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTC
 CGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG
 GTCGCAAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTG
 GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
 ATCCTCTGACAACCCTAGAGATAGGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACA
 GGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
 CGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTC
 TAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT
 CATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACA
 AAGGGCTGCGAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAATCTGTTCTCAGT
 TCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC
 GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCC

CGTCACACCACGAGAGTTTGTCAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTAT
GGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGGCA

*** *Bacillus pumilus* (Регион *gyrB*)**

>VN-H5 (OQ626334)

GAGATTTAGAGATCATTGGTGAAACAGATGTTACAGGGACAACCACT
CATTTTGTGCCAGATCCAGAAATTTTTACTGAAACCATTGAATTTGATTAC
GACACACTTGCCAACCGTGTACGTGAGTTAGCTTTCTTAACAAAAGGTGTA
AACATCATTATTGAAGATTTACGTGAAGGTAAAGAACGACGAAATGAATA
CTGCTATGAAGGCGGTATTAAGAGCTATGTAGAACATTTAAATCGCTCAAA
AGAAGTCGTTTCATGAAGAACCCGTTTACATCGAAGGTGAAAAAGACGGAA
TCACGATTGAAGTGGCATTACAATATAACGATTCCTATTCAAGCAACATCT
ATTCCTTCGCCAACAATATCAACACGTATGAAGGCGGAACGCACGAAGCA
GGCTTTAAAACAGGTTTGACGCGTGTTATCAATGATTATGCTCGTAAAAAT
GGCGTATTCAAAGATGGAGACTCGAATTTGAGCGGTGAAGATGTGCGAGA
AGGCTTAACAGCCATTATCTCCATCAAACATCCAGATCCTCAATTCGAAGG
ACAAACGAAGACAAAGCTTGGGAACTCAGAAGCAAGAACCATTACCGACT
CCCTTTTCTCTGAAGCACTTGAGAAATTCCTCTTAGAGAATCCTGATGCTGC
AAAGAAAATTGTGGAGAAAGGTGTGATGGCAGCTCGTGCGAGAATGGCTG
CCAAAAAGGCACGTGAGCTGACAAGACGTAAAAGTGCCTGGAAGTCTCC
AGCTTACCGGGGAACTGGCGGACTGTTCTTCTAAAGACCCTTCCATCTCT
GAACTCTATATCGTAGAGGGAGATTCTGCGGGCGGATCTGCTAAACAAGG
CCGTGATCGTCACTTCCAAGCGATCTTACCGTTAAGAGGGAAGATCCTAAA
CGTTGAAAAAGCGCGACTAGATAAAAATTCTATCGAACAACGAGG

>VN-H8 (OQ626335)

GAGATTTAGAGATCATTGGTGAAACAGATGTTACAGGGACAACCACT
CATTTTGTGCCAGATCCAGAAATTTTTACTGAAACCATTGAATTTGATTAC
GACACACTTGCCAACCGTGTACGTGAGTTAGCTTTCTTAACAAAAGGTGTA
AACATCATTATTGAAGATTTACGTGAAGGTAAAGAACGACGAAATGAATA
CTGCTATGAAGGCGGTATTAAGAGCTATGTAGAACATTTAAATCGCTCAAA
AGAAGTCGTTTCATGAAGAACCCGTTTACATCGAAGGTGAAAAAGACGGAA
TCACGATTGAAGTGGCATTACAATATAACGATTCCTATTCAAGCAACATCT
ATTCCTTCGCCAACAATATCAACACGTATGAAGGCGGAACGCACGAAGCA
GGCTTTAAAACAGGTTTGACGCGTGTTATCAATGATTATGCTCGTAAAAAT
GGCGTATTCAAAGATGGAGACTCGAATTTGAGCGGTGAAGATGTGCGAGA
AGGCTTAACAGCCATTATCTCCATCAAACATCCAGATCCTCAATTCGAAGG
ACAAACGAAGACAAAGCTTGGGAACTCAGAAGCAAGAACCATTACCGACT
CCCTTTTCTCTGAAGCACTTGAGAAATTCCTCTTAGAGAATCCTGATGCTGC
AAAGAAAATTGTGGAGAAAGGTGTGATGGCAGCTCGTGCGAGAATGGCTG
CCAAAAAGGCACGTGAGCTGACAAGACGTAAAAGTGCCTGGAAGTCTCC
AGCTTACCGGGGAACTGGCGGACTGTTCTTCTAAAGACCCTTCCATCTCT
GAACTCTATATCGTAGAGGGAGATTCTGCGGGCGGATCTGCTAAACAAGG
CCGTGATCGTCACTTCCAAGCGATCTTACCGTTAAGAGGGAAGATCCTAAA
CGTTGAAAAAGCGCGACTAGATAAAAATTCTATCGAACAACGAGG

>VN-F8 (OQ626336)

GAGATTTAGAGATCATTGGTGAAACAGATGTTACAGGGACAACCACT
 CATTTTGTGCCAGATCCAGAAATTTTACTGAAACCATTGAATTTGATTAC
 GACACACTTGCCAACCGTGTACGTGAGTTAGCTTTCTTAACAAAAGGTGTA
 AACATCATTATTGAAGATTTACGTGAAGGTAAAGAACGACGAAATGAATA
 CTGCTATGAAGGCGGTATTAAGAGCTATGTAGAACATTTAAATCGCTCAA
 AGAAGTCGTTTCATGAAGAACCCGTTTACATCGAAGGTGAAAAAGACGGAA
 TCACGATTGAAGTGGCATTACAATATAACGATTCTTATTCAAGCAACATCT
 ATTCCTTCGCCAACAATATCAACACGTATGAAGGCGGAACGCACGAAGCA
 GGCTTTAAAACAGGTTTGACGCGTGTTATCAATGATTATGCTCGTAAAAAT
 GGCGTATTCAAAGATGGAGACTCGAATTTGAGCGGTGAAGATGTGCGAGA
 AGGCTTAACAGCCATTATCTCCATCAAACATCCAGATCCTCAATTCGAAGG
 ACAAACGAAGACAAAGCTTGGGAACTCAGAAGCAAGAACCATTACCGACT
 CCCTTTTCTCTGAAGCACTTGAGAAATTCCTCTTAGAGAATCCTGATGCTGC
 AAAGAAAATTGTGGAGAAAGGTGTGATGGCAGCTCGTGCGAGAATGGCTG
 CCAAAAAGGCACGTGAGCTGACAAGACGTAAAAGTGCCTGGAAGTCTCC
 AGCTTACCGGGGAACTGGCGGACTGTTCTTCTAAAGACCCTTCCATCTCT
 GAACTCTATATCGTAGAGGGAGATTCTGCGGGCGGATCTGCTAAACAAGG
 CCGTGATCGTCACTTCCAAGCGATCTTACCGTTAAGAGGGAAGATCCTAAA
 CGTTGAAAAAGCGCGACTAGATAAAATTCTATCGAACAACGAGG

>VN-K13 (OQ626337)

GAGATTTAGAGATCATTGGTGAAACAGATGTTACAGGGACAACCACT
 CATTTTGTGCCAGATCCAGAAATTTTACTGAAACCATTGAATTTGATTAC
 GACACACTTGCCAACCGTGTACGTGAGTTAGCTTTCTTAACAAAAGGTGTA
 AACATCATTATTGAAGATTTACGTGAAGGTAAAGAACGACGAAATGAATA
 CTGCTATGAAGGCGGTATTAAGAGCTATGTAGAACATTTAAATCGCTCAA
 AGAAGTCGTTTCATGAAGAACCCGTTTACATCGAAGGTGAAAAAGACGGAA
 TCACGATTGAAGTGGCATTACAATATAACGATTCTTATTCAAGCAACATCT
 ATTCCTTCGCCAACAATATCAACACGTATGAAGGCGGAACGCACGAAGCA
 GGCTTTAAAACAGGTTTGACGCGTGTTATCAATGATTATGCTCGTAAAAAT
 GGCGTATTCAAAGATGGAGACTCGAATTTGAGCGGTGAAGATGTGCGAGA
 AGGCTTAACAGCCATTATCTCCATCAAACATCCAGATCCTCAATTCGAAGG
 ACAAACGAAGACAAAGCTTGGGAACTCAGAAGCAAGAACCATTACCGACT
 CCCTTTTCTCTGAAGCACTTGAGAAATTCCTCTTAGAGAATCCTGATGCTGC
 AAAGAAAATTGTGGAGAAAGGTGTGATGGCAGCTCGTGCGAGAATGGCTG
 CCAAAAAGGCACGTGAGCTGACAAGACGTAAAAGTGCCTGGAAGTCTCC
 AGCTTACCGGGGAACTGGCGGACTGTTCTTCTAAAGACCCTTCCATCTCT
 GAACTCTATATCGTAGAGGGAGATTCTGCGGGCGGATCTGCTAAACAAGG
 CCGTGATCGTCACTTCCAAGCGATCTTACCGTTAAGAGGGAAGATCCTAAA
 CGTTGAAAAAGCGCGACTAGATAAAATTCTATCGAACAACGAGG

*** *Bacillus pumilus* (Регион PyrE)**

>VN-H5 (OQ626338)

AAGCGGTCTCATTTAAAACCAGACGAACCGTTTACATGGGCAAGCGGT
 ATCAAATCACCGATCTATTGTGACAACCGTCTTACCTTGTCCTACCCAGAA
 GTAAGACACGACATTGCTGAAGGTCTTAAAGATTTGATTCTCACTCATTTT

GAAAGAGCGGAGGTTGTTGCTGGTACTGCAACAGCAGGCATCCCGCATGC
 GGCATTAGCGGCAGACCGTCTGAACGTGCCGATGTGTTATGTGAGAAGTA
 AGCCAAAAGCACATGGAAAAGGGAATCAAATTGAAGGAGCCGTATCAAA
 AGGTCAAAAGGTGGTCGTCGTAGAAGACTTGATTTCAACAGGAGGCAGTG
 TGCTTGAAGTGGTCGCTGCTCTTCAAGAAGCGGGCTGTGACGTACTAGGCG
 TTGCCGCGATCTTCACATACGGACTGCCAAAAGCTGCAGCAGCTTTTCAAG
 AGAAAAACATTCCATATGTCACCCTAACAGACTATGACACAC

>VN-H8 (OQ626339)

AAGCGGTCTCATTAAAACCAGACGAACCGTTTACATGGGCAAGCGGT
 ATCAAATCACCGATCTATTGTGACAACCGTCTTACCTTGTCTTACCCAGAA
 GTAAGACACGACATTGCTGAAGGTCTTAAAGATTTGATTCTCACTCATTTT
 GAAAGAGCGGAGGTTGTTGCTGGTACTGCAACAGCAGGCATCCCGCATGC
 GGCATTAGCGGCAGACCGTCTGAACGTGCCGATGTGTTATGTGAGAAGTA
 AGCCAAAAGCACATGGAAAAGGGAATCAAATTGAAGGAGCCGTATCAAA
 AGGTCAAAAGGTGGTCGTCGTAGAAGACTTGATTTCAACAGGAGGCAGTG
 TGCTTGAAGTGGTCGCTGCTCTTCAAGAAGCGGGCTGTGACGTACTAGGCG
 TTGCCGCGATCTTCACATACGGACTGCCAAAAGCTGCAGCAGCTTTTCAAG
 AGAAAAACATTCCATATGTCACCCTAACAGACTATGACACAC

>VN-F8 (OQ626340)

AAGCGGTCTCATTAAAACCAGACGAACCGTTTACATGGGCAAGCGGT
 ATCAAATCACCGATCTATTGTGACAACCGTCTTACCTTGTCTTACCCAGAA
 GTAAGACACGACATTGCTGAAGGTCTTAAAGATTTGATTCTCACTCATTTT
 GAAAGAGCGGAGGTTGTTGCTGGTACTGCAACAGCAGGCATCCCGCATGC
 GGCATTAGCGGCAGACCGTCTGAACGTGCCGATGTGTTATGTGAGAAGTA
 AGCCAAAAGCACATGGAAAAGGGAATCAAATTGAAGGAGCCGTATCAAA
 AGGTCAAAAGGTGGTCGTCGTAGAAGACTTGATTTCAACAGGAGGCAGTG
 TGCTTGAAGTGGTCGCTGCTCTTCAAGAAGCGGGCTGTGACGTACTAGGCG
 TTGCCGCGATCTTCACATACGGACTGCCAAAAGCTGCAGCAGCTTTTCAAG
 AGAAAAACATTCCATATGTCACCCTAACAGACTATGACACAC

>VN-K13 (OQ626341)

AAGCGGTCTCATTAAAACCAGACGAACCGTTTACATGGGCAAGCGGT
 ATCAAATCACCGATCTATTGTGACAACCGTCTTACCTTGTCTTACCCAGAA
 GTAAGACACGACATTGCTGAAGGTCTTAAAGATTTGATTCTCACTCATTTT
 GAAAGAGCGGAGGTTGTTGCTGGTACTGCAACAGCAGGCATCCCGCATGC
 GGCATTAGCGGCAGACCGTCTGAACGTGCCGATGTGTTATGTGAGAAGTA
 AGCCAAAAGCACATGGAAAAGGGAATCAAATTGAAGGAGCCGTATCAAA
 AGGTCAAAAGGTGGTCGTCGTAGAAGACTTGATTTCAACAGGAGGCAGTG
 TGCTTGAAGTGGTCGCTGCTCTTCAAGAAGCGGGCTGTGACGTACTAGGCG
 TTGCCGCGATCTTCACATACGGACTGCCAAAAGCTGCAGCAGCTTTTCAAG
 AGAAAAACATTCCATATGTCACCCTAACAGACTATGACACAC