

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Российский научно-исследовательский институт информации и технико-
экономических исследований по инженерно-техническому обеспечению
агропромышленного комплекса»
(ФГБНУ «Росинформагротех»)

**МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ
ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР**

Аналитический обзор

Москва
2020

ББК 44.7
УДК 635-2
М 54

Рецензенты:

С.В. Резвякова, д-р с.-х. наук, зав. кафедрой защиты растений и экотоксикологии (ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет имени Н.В. Парахина»);

А.М. Артемьева, канд. с.-х. наук, зав. отделом генетических ресурсов овощных и бахчевых культур (ФИЦ Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР))

М 54 **Богоутдинов Д.З., Фоминых Т.С., Кастальева Т.Б., Гирсова Н.В., Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Мишуров Н.П., Неменушья Л.А., Пискунова Н.А. Методы диагностики возбудителей заболеваний овощных культур: анализ. обзор.** – М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2020. – 116 с.

ISBN 978-5-7367-1609-8

Рассмотрены современное состояние и основные направления развития защиты овощных культур от болезней. Особое внимание уделено преимуществам и недостаткам наиболее распространённых методов диагностики патогенов овощных культур. Обозначены передовые технологии выявления и идентификации болезней овощных культур, в том числе на ранних, довизуальных стадиях заражения и находящихся в латентной форме.

Предназначен для руководителей и специалистов сельскохозяйственных организаций, консультантов информационно-консультационных служб, студентов и преподавателей отраслевых колледжей и вузов.

Bogoutdinov, D.Z., Fominykh. T.S., Kastalyeva, T.B., Girsova, N.V., Pavlovskaya, N.E., Gagarina, I.N., Mishurov, N.P., Nemenuschaya, L.A., Piskunova, N.A. Methods for Diagnosing Causative Agents of Diseases of Vegetable Crops Analytical Overview (Moscow: Rosinformagrotech), 116 (2020).

The current state and the main areas of development of the vegetable crop protection against diseases are discussed. Particular attention is paid to the advantages and disadvantages of the most common methods for diagnosing pathogens of vegetable crops. The advanced techniques for detecting and identifying diseases of vegetable crops, including those at the early, pre-visual stages of infection and in a latent form, are described.

It is intended for managers and specialists of agricultural organizations, consultants of information and consulting services, and students and teachers of industry colleges and universities.

УДК 635-2
ББК 44.7

ISBN 978-5-7367-1609-8

© ФГБНУ «Росинформагротех», 2020

ВВЕДЕНИЕ

Для достижения конкурентоспособных результатов в выращивании овощных культур и обеспечении населения овощами важно использовать свободный от патогенов посевной материал, своевременно диагностировать и устранять появление заболеваний, применять приемы возделывания, способные максимально мобилизовать потенциальные защитные силы организма растений.

В настоящее время фактическое потребление овощей в Российской Федерации не соответствует физиологически минимальной норме, рекомендованной Всемирной организацией здравоохранения (146 кг в год на одного человека), и составляет около 40 %. Улучшение ситуации обеспечит увеличение объемов производства качественной овощной продукции, в том числе и за счет развития селекции и семеноводства, снижения заболеваемости выращиваемых овощных культур посредством своевременной диагностики патогенов, вызывающих болезни [1].

Из-за воздействия патогенных организмов на овощные культуры, значительно снижаются качество и объемы производимой продукции. Например, у широко распространенной овощной культуры – моркови столовой – в зависимости от погодных условий и фитосанитарного состояния посевов поражаемость фузариозом и альтернариозом может достигать 70-80 %, а урожайность корнеплодов – снижаться на 35-50 % [2].

Вирусы, вириды, вирусиды и фитоплазмы (далее – ВВФ) вызывают массовые поражения растений, сопровождаемые катастрофическим снижением урожая и качества растительной продукции. Если мировые потери от болезней растений оцениваются ежегодно в 60 млрд долл. США, то по приблизительным оценкам около трети из них обусловлены ВВФ, а половина (от этой трети) вызвана 300 видами нитевидных вирусов.

Среди обнаруженных за последнее десятилетие новых инфекционных болезней растений почти половина имеет вирусную природу. Непрерывно увеличивается число новых вирусов, а глобальное потепление способствует расширению ареала насекомых-переносчиков и увеличению их численности [3].

Фитоплазменные болезни носят природно-очаговый характер, и в годы эпифитотий потери урожая на томате, перце и баклажанах могут достигать 50-80 %. Из фитоплазмозов наиболее опасен столбур пасленовых, который

вызывает стерильность и пролиферацию генеративных органов, некротизацию флоэмных тканей и преждевременную гибель растений.

Систематически обнаруживаются очень вредоносные патогены, ранее не зарегистрированные в том или ином регионе. Например, для Центрального региона фитомониторинг специалистами ФГБНУ ФНЦ овощеводства показал наличие 14 возбудителей, ранее не описанных на моркови; на луке обнаружен патоген, вызывающий чёрную плесень к концу вегетации и в период хранения; по одному новому патогену выявили на свёкле столовой, семенах редиса, листьях бобов овощных; на салате обнаружены два вредоносных вируса; было зарегистрировано множество видов, ранее не отмеченных на культуре чеснока [4].

Контроль болезней растений должен начинаться еще до посева семян, поскольку их качественные характеристики обеспечивают урожайность. Поэтому для посева необходимо использовать только сертифицированные семена с высокой всхожестью (95 %), полученные от здоровых семенных растений, свободные от внутренней и наружной инфекции, что также достигается своевременной диагностикой заражения патогенами. Использование здоровых семян особенно важно для профилактики болезней, передающихся с семенным материалом.

В представленном аналитическом обзоре рассмотрены патогены, поражающие овощные культуры, и методы диагностики, перспективные для их выявления, проанализированы характеристики и практические примеры применения технологий диагностики патогенов овощных растений, разработанных и используемых научными и производственными организациями. Подготовленные материалы будут способствовать проявлению большего интереса среди сельскохозяйственных производителей к использованию перспективных технологий диагностики, а следовательно, повышению продуктивности овощеводства, в том числе в селекционных и семеноводческих технологиях, уровня конкурентоспособности отрасли и качества овощной продукции.

1. ОСНОВНЫЕ БОЛЕЗНИ И ПАТОГЕНЫ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР

Неинфекционные болезни растений развиваются под влиянием абиотических факторов и не передаются от больных растений здоровым. Они могут быть вызваны неблагоприятными условиями выращивания, нарушениями агротехники, несоблюдением регламентов применения гербицидов и удобрений, а также неправильным уходом за культурой. В результате развития неинфекционных болезней у растений снижается устойчивость к патогенам, уменьшается урожайность, ухудшается внешний вид и качество продукции, меняется ее химический состав и накапливаются токсичные элементы. Основные симптомы неинфекционных болезней проявляются в виде задержки роста, вытягивания и ослабления растений, увядания листьев, изменения их формы и окраски, образования некрозов [5, 6, 7].

Основные инфекционные болезни овощных культур вызывают грибы, вирусы, виоиды, фитоплазмы, бактерии, актиномицеты, оомицеты [8]. В табл. 1-4 представлены наиболее распространенные болезни по группам и основным овощным культурам.

Таблица 1

Перечень наиболее распространенных болезней луковых и зеленных культур

Культуры	Перечень болезней
Луковые	Ложная мучнистая роса, церкоспороз, мучнистая роса, антракноз, шейковая гниль лука, головня, гниль донца лука, мозаика лука
Зеленные (петрушка, укроп, базилик)	Альтернариоз, серая и белая гниль, фитоплазмы из групп желтухи астр и столбура, вирус пестрой карликовости моркови, вирус огуречной мозаики, вирус курчавости верхушки свеклы, латентный вирус петрушки, вирус желтой сетчатости сельдерея, вирус мозаики сельдерея, мокрая гниль, бактериальная пятнистость, черная ножка, фузариоз, мучнистая роса

Культуры	Перечень болезней
Салат-латук	Черная ножка, корневые гнили, краевой ожог листьев, листовые пятнистости, ложная и настоящая мучнистая роса, септориоз, белая и серая гнили. Фитоплазменные и вирусные болезни (зарегистрировано 15 вирусов), из них наиболее вредоносны вирус мозаики, вирус некротического пожелтения, вирусы гипертрофии жилок. Бактериальная мокрая гниль, краевой ожог листьев (бактериальный), опробковение корней, бактериальная пятнистость, бактериальная гниль, бактериальная розеточность

Таблица 2

Список заболеваний томата и их возбудителей

(Compendium of Tomato Diseases and Pests, Second Edition J. B. Jones, T. A. Zitter, T. M. Momol, and S. A. Miller, eds. Copyright © 2014 The American Phytopathological Society. Published Online: 29 Aug 2016 <https://doi.org/10.1094/9780890544341.002>)

Название болезни	Виды возбудителей
Альтернариозный рак стебля	<i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fr.) Keissl.
Антракноз	<i>Colletotrichum coccodes</i> (Wallr.) S. Hughes, <i>Colletotrichum dematium</i> (Pers.) Grove, <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc. <i>Glomerella cingulate</i> (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk [teleomorph]
Чёрная плесень	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.:Fr.) Keissl., <i>A. arborescens</i> E. G. Simmons, <i>Stemphylium botryosum</i> Wallr.
Чёрная плесневая гниль	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.:Fr.) Keissl. (syn. <i>A. tenuis</i> Nees), <i>Pleospora lycopersici</i> Marchal & É. J. Marchal (syn. <i>P. herbarum</i> [Pers.] Rabenh.), <i>Stemphylium botryosum</i> Wallr. (syn. <i>Pleospora tarda</i> E. G. Simmons), <i>S. consortiale</i> (Thüm.) J. W. Groves & Skolko
Чёрная корневая гниль	<i>Thielaviopsis basicola</i> (Berk. & Broome) Ferraris (syn. <i>Chalara elegans</i> Nag Raj & W. B. Kendr.)
Фитофторозная гниль	<i>Phytophthora capsici</i> Leonian, <i>P. drechsleri</i> Tucker, <i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> (Dastur) G. M. Waterhouse
Церкоспороз листьев	<i>Pseudocercospora fuligena</i> (Roldan) Deighton

Название болезни	Виды возбудителей
Угольная гниль	<i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid. (syn. <i>M. phaseoli</i> [Maubl.] S. F. Ashby)
Корковая гниль	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i> R. Schneid. & Gerlach
Дидимелловая гниль стебля	<i>Didymella lycopersici</i> Kleb. (syn. <i>Phoma lycopersici</i> Cooke)
Ранняя гниль	<i>Alternaria tomatophila</i> E. G. Simmons
Фузариозная гниль стебля и корня	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.: Fr. f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> Jarvis & Shoemaker
Фузариоз плодов	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. f. sp. <i>eumartii</i> (C. W. Carp.) W. C. Snyder & H. N. Hansen
Фузариозное увядание	<i>Fusarium oxysporum</i> Schltdl.: Fr. f. sp. <i>lycopersici</i> (Sacc.) W. C. Snyder & H. N. Hansen
Серая пятнистость листьев	<i>Stemphylium botryosum</i> Wallr. f. sp. <i>lycopersici</i> Rotem, Y. Cohen, & I. Wahl (syn. <i>Pleospora herbarum</i> [Pers.:Fr.] Rabenh.), <i>S. lycopersici</i> (Enjoji) W. Yamam (syn. <i>S. floridanum</i> Hannon & G. F. Weber), <i>S. solani</i> G. F. Weber
Серая плесень, серая гниль корня	<i>Botrytis cinerea</i> Pers.:Fr.
Поздняя фитофторозная гниль	<i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary
Фитофторозная корневая гниль	<i>Phytophthora capsici</i> Leonian, <i>P. nicotianae</i> var. <i>parasitica</i> (Dastur) G. M. Waterhouse
Плесневение листьев	<i>Passalora fulva</i> (Cooke) U. Braun & Crous (syn. <i>Fulvia fulva</i> [Cooke] Cif.)
Фомозная гниль	<i>Phoma destructiva</i> var. <i>destructiva</i> Plowr. (syn. <i>P. destructiva</i> Plowr.)
Мучнистая роса	<i>Leveillula taurica</i> (Lév.) G. Arnaud (syns. <i>Oidiopsis sicula</i> Scalia; <i>O. taurica</i> [Lév.] E. S. Salmon), <i>Oidium lycopersici</i> Cooke & Masee, <i>O. neolycopersici</i> L. Kiss
Питиозная гниль стебля	<i>Pythium aphanidermatum</i> (Edson) Fitzp., <i>P. arrhenomanes</i> Drechsler, <i>P. debaryanum</i> R. Hesse., <i>P. myriotylum</i> Drechsler, <i>P. ultimum</i> Trow
Питиозная гниль плодов	<i>Pythium aphanidermatum</i> (Edson) Fitzp., <i>P. ultimum</i> Trow
Ризоктониозная гниль стебля и корней	<i>Rhizoctonia solani</i> J. G. Kühn, (syn. <i>Thanatephorus cucumeris</i> [A. B. Frank] Donk)

Название болезни	Виды возбудителей
Ризоктониозная гниль листьев	<i>Rhizoctonia solani</i> J. G. Kühn anastomosis group 3 (AG-3) (syn. <i>Thanatephorus cucumeris</i> [A. B. Frank] Donk)
Ризоктониозная гниль плодов	<i>Rhizoctonia solani</i> J. G. Kühn (syn. <i>Thanatephorus cucumeris</i> [A. B. Frank] Donk)
Ризопусная гниль	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill. (syn. <i>R. nigricans</i> Ehrenb.)
Септориозная пятнистость листьев	<i>Septoria lycopersici</i> Speg.
Кислая гниль	<i>Geotrichum candidum</i> Link (syn. <i>Oidium lactis</i> Fresen; <i>Oospora lactis</i> [Fresen] Sacc.), <i>G. penicillatum</i> (Carmo Sousa) Arx
Южная гниль	<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. (syn. <i>Athelia rolfsii</i> [Curzi] Tu & Kimbr.)
Дырчатая пятнистость	<i>Corynespora cassiicola</i> (Berk. & M. A. Curtis) C. T. Wei
Вертициллёзное увядание	<i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke & Berthier, <i>V. dahliae</i> Kleb.
Белая гниль	<i>Sclerotinia minor</i> Jagger, <i>S. sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary
Зональная листовая пятнистость	<i>Hinomyces moricola</i> (I. Hino) Narumi & Y. Harada (syn. <i>Cristulariella moricola</i> [I. Hino] Redhead; <i>C. pyramidalis</i> Waterman & R. P. Marshall; <i>Grovesinia pyramidalis</i> M. N. Cline, J. L. Crane, & S. D. Cline)
Бактериозы	
Бактериальный рак	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Smith) Davis et al.
Бактериоз листьев	<i>Pseudomonas viridiflava</i> (Burkholder) Dowson
Мягкая бактериальная гниль	<i>Dickeya chrysanthemi</i> (Burkholder et al.) Samson et al., <i>Pectobacterium carotovorum</i> (Jones) Waldee (syn. <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> [Jones])
Бактериальная кислая гниль	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (Tsenkovskii) van Tieghem
Псевдомонасная пятнистость	<i>Pseudomonas syringae</i> van Hall pv. <i>tomato</i> (Okabe) Young, Dye, & Wilkie
Ксантомонасная пятнистость	<i>Xanthomonas euvesicatoria</i> Jones et al., <i>X. gardneri</i> (ex Šutic) Jones et al., <i>X. perforans</i> Jones et al., <i>X. vesicatoria</i> (ex Doidge) Vauterin et al.

Название болезни	Виды возбудителей
Бактериальная гниль стебля	<i>Pectobacterium carotovorum</i> (Jones) Waldee (syn. <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> [Jones] Dye)
Бактериальное увядание	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al.
Сердцевинный некроз	<i>Pseudomonas cichorii</i> (Swingle) Stapp, <i>P. corrugata</i> Roberts & Scarlett, <i>P. fluorescens</i> Migula, <i>P. mediterranea</i> Catara et al., <i>P. viridiflava</i> (Burkholder) Dowson
Псиллидная желтуха и пожелтение жилок	' <i>Candidatus Liberibacter solanacearum</i> ' Liefting et al.
Матовость корня	<i>Agrobacterium radiobacter</i> (Beijerinck & van Delden) Conn, biovar 1
Гниль семянцев и пятнистость листьев	<i>Herbaspirillum huttiense</i> (Leifson) Ding & Yokota
Фитоплазмы	<i>Hoja de perejil (parsley leaf)</i> , <i>Parsley leaf phytoplasma</i> , <i>Tomato big bud</i> , <i>Tomato big bud group of phytoplasmas</i> <i>Tomato yellows (TY)</i> , <i>Tomato yellows phytoplasma</i> 16SrI-B, 16SrI-C, 16SrII-A, 16SrII-D, 16SrVI-A16SrI-A, 16SrI-B, 16SrIII, 16SrVI 16SrI-B, 16SrI-C, 16SrIII, 16SrV, 16SrXII-A, 16SrI, 16SrII-A, 16SrII-C, 16SrII-D, 16SrV, 16SrVI, 16SrXII-A
Виридозы	<i>Citrus exocortis viroid</i> (CEVd), <i>Columnnea latent viroid</i> (CLVd), <i>Potato spindle tuber viroid</i> (PSTVd), <i>Tomato apical stunt viroid</i> (TASVd), <i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i> (TCDVd), <i>Tomato planta macho viroid</i> (TPMVD)
Вироzy	<i>Alfalfa mosaic virus (AMV)</i> , <i>Cucumber mosaic virus (CMV)</i> , <i>Beet curly top virus (BCTV)</i> , <i>Groundnut ring-spot virus (GRSV)</i> , <i>Pepino mosaic virus (PepMV)</i> , <i>Tomato chocolate spot virus (ToCSV)</i> , <i>Tomato apex necrosis virus (ToANV)</i> / <i>Tomato marchitez virus (ToMarV)</i> , <i>Tomato torrado virus (ToTV)</i> , <i>Potato yellow vein virus (PYVV)</i> , <i>Tobacco etch virus (TEV)</i> , <i>Lettuce necrotic stunt virus (LNSV)</i> , <i>Tomato bushy stunt virus (TBSV)</i> , <i>Tomato chlorotic spot virus (TCSV)</i> , <i>Tobacco mosaic virus (TMV)</i> , <i>Tomato mosaic virus (ToMV)</i> , <i>Tomato mottle virus (ToMoV)</i> , <i>Tomato spotted wilt virus (TSWV)</i> , <i>Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)</i> , <i>Tomato yellow mosaic virus (ToYMV)</i> , <i>Potato virus Y (PVY)</i> , <i>Tomato chlorosis virus (ToCV)</i> , <i>Tomato infectious chlorosis virus (TICV)</i>

Список заболеваний тыквенных культур и их возбудителей

(Compendium of Cucurbit Diseases and Pests, Second Edition editors

T. P. Keinath, W. M. Wintermantel, and T. A. Zitter. APS PRESS St. Paul, MN (June 2017) <https://www.apsnet.org/about/newsroom/releases/Pages/Cucurbit2E.aspx>)

Название болезней	Виды возбудителей
Альтернариоз листьев	<i>Alternaria cucumerina</i> (Ellis & Everh.) J.A. Elliott
Альтернариозная пятнистость листьев	<i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>cucurbitae</i> Vakal
Антракноз	<i>Colletotrichum orbiculare</i> (Berk. & Mont.) Arx = <i>Colletotrichum lagenaria</i> (Pass.) Ellis & Halst. [as 'lagenarium'] <i>Glomerella lagenarium</i> [teleomorph]
Брюшная гниль	<i>Rhizoctonia solani</i> J.G. Kühn, <i>Thanatephorus cucumeris</i> (A.B. Frank) Donk [teleomorph]
Черная корневая гниль	<i>Thielaviopsis basicola</i> (Berk. & Broome) Ferraris
Голубая плесневая гниль	<i>Penicillium</i> spp., <i>Penicillium digitatum</i> (Pers.) Sacc.
Корневая и гипокотильная цефалоспориозная гниль, штриховатость и отмирание стебля	<i>Acremonium</i> spp. = <i>Cephalosporium</i> spp.
Дидимелловая (перкоспоровая) пятнистость листьев	<i>Didymella bryoniae</i> (Fuckel) Rehm = <i>Cercospora cucurbitae</i> Ellis & Everh
Угольная гниль, увядание стебля и гниль плодов	<i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid.
Хоанефоровая гниль плодов	<i>Choanephora cucurbitarum</i> (Berk. & Ravenel) Thaxt.
Коллапс (гибель) дыни	<i>Monosporascus eutypoides</i> (Petr.) Arx = <i>Bitrimonospora indica</i> Sivan., Talde & Tilak
Корнеспоровая болезнь, дырчатая пятнистость	<i>Corynespora cassicola</i> (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei

Название болезней	Виды возбудителей
Ямчатая (кратерная) гниль плодов	<i>Myrothecium roridum</i> Tode
Гниль корня и стебля	<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc. = <i>Haematonectria haematococca</i> (Berk. & Broome) Samuels & Rossman, <i>Nectria haematococca</i> Berk. & Broome [teleomorph]
Микозное увядание	<i>Acremonium</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Fusarium equiseti</i> , <i>Gibberella intricans</i> [teleomorph], <i>Phytophthora</i> sp., <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Thielaviopsis basicola</i> и другие грибы
Ложная мучнистая роса	<i>Pseudoperonospora cubensis</i> (Berk. & M.A. Curtis) Rostovzev
Фузариозная гниль плодов	<i>Fusarium equiseti</i> = <i>Fusarium roseum</i> f. <i>gibbosum</i> App. et Wr.), <i>Fusarium graminearum</i> Schwabe, <i>Gibberella zeae</i> (Schwein.) Petch [teleomorph], <i>Fusarium semitectum</i> Berk. & Ravenel, <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>cucurbitae</i> (Mart.) Sacc., <i>Fusarium</i> spp.
Фузариозное увядание	<i>Fusarium oxysporum</i> включая формы: <i>F. ox. f. sp. enincasae</i> , <i>F. ox. f. sp. cucumerinum</i> , <i>F. ox. f. sp. lagenariae</i> , <i>F. ox. f. sp. luffae</i> , <i>F. ox. f. sp. melonis</i> , <i>F. ox. f. sp. momordicae</i> , <i>F. ox. f. sp. niveum</i>
Серая гниль	<i>Botrytis cinerea</i> Pers., <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel [teleomorph]
Клейкий упадок стебля (упадок лозы)	<i>Didymella bryoniae</i> (Fuckel) Rehm = <i>Mycosphaerella melonis</i> (Pass.) Chiu & J.C. Walker, <i>Phoma cucurbitacearum</i> (Fr.) Sacc., [anamorph]
Лазидиплоидальное увядание стебля и гниль плодов	<i>Lasioidiplodia theobromae</i> (Pat.) W. Nowell = <i>Diplodia natalensis</i> Pole-Evans
Моноспорасковая корневая гниль, миротециумовый черный рак	<i>Monosporascus cannonballus</i> Pollack & Uecker, <i>Myrothecium roridum</i> Tode
Сетчатая пятнистость	<i>Leandria momordicae</i> Rangel
Фомоз	<i>Phoma exigua</i> var. <i>Exigua</i> Sacc. = <i>Ascochyta phaseolorum</i> Sacc.

Название болезней	Виды возбудителей
Фиолетовость стебеля	<i>Diaporthe melonis</i> Beraha & M.J. O'Brien, <i>Phomopsis cucurbitae</i> McKeen [teleomorph]
Фомопсис, черный стебель	<i>Phomopsis sclerotioides</i> Kesteren
Филлостиктовая пятнистость листьев	<i>Phyllosticta cucurbitacearum</i> Sacc.
Фитофторозная корневая гниль	<i>Phytophthora</i> spp., <i>Phytophthora capsici</i> Leonian
Розовая гниль	<i>Trichothecium roseum</i> (Pers.) Link
Плектоспориоз	<i>Monographella cucumerina</i> (Lindf.) Arx = <i>Plectosporium tabacinum</i> (J.F.H. Beyma) M.E. Palm, W. Gams & Nirenberg
Мучнистая роса	<i>Podosphaera fuliginea</i> (Schltld.) U. Braun & S. Takam. = <i>Sphaerotheca fuliginea</i> Pollacci, <i>Erysiphe cichoracearum</i> (DC.)
Питиозная гниль плодов	<i>Pythium</i> spp.
Ризопусная мягкая гниль плодов	<i>Rhizopus stolonifer</i> Vuillemin = <i>Rhizopus nigricans</i> Ehrenberg
Парша / гуммоз	<i>Cladosporium cucumerinum</i> Ellis & Arthur
Склеротиниозная гниль стебля	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary
Септориоз	<i>Septoria cucurbitacearum</i> Sacc.
Склеротиниоз плодов и стебля	<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc., <i>Athelia rolfsii</i> (Curzi) C.C. Tu & Kimbr. [teleomorph]
Внезапное увядание	<i>Pythium aphanidermatum</i> (Edson) Fitzp.
Улокладимная пятнистость листьев	<i>Ulocladium consortiale</i> (Thüm.) E.G. Simmons
Вертициллёзное увядание	<i>Verticillium dahlia</i> Kleb., <i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke & Berthold
Ризоктониозная сетчатость	<i>Rhizoctonia solani</i> J.G. Kühn
Бактериозы	
Угловая пятнистость листьев	<i>Pseudomonas amygdali</i> pv. <i>Lachrymans</i> Psallidas and Panagopoulos

Название болезней	Виды возбудителей
Бактериальная пятнистость плодов / гниль проростков	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> Willems et al. = <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> subsp. <i>citrulli</i>
Бактериальная пятнистость листьев	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>cucurbitae</i> (Pammel 1895) Dowson
Бактериальный некроз кожуры	<i>Pectobacterium</i> spp. = <i>Erwinia</i> spp.
Мягкая бактериальная гниль	<i>Pectobacterium carotovorum</i> (Jones, 1901) Waldee = <i>Erwinia carotovora</i>
Бактериальное увядание	<i>Erwinia tracheiphila</i> (Smith 1895) Bergey et al.
Коричневая пятнистость	<i>Erwinia ananas</i> Winslow et al.
Фитоплазмы	<i>16SrI-A</i> , <i>16SrI-B</i> ('Ca. <i>P. asteris</i> '), <i>16SrII-D</i> , <i>16SrII-M</i> ('Ca. <i>P. aurantifolia</i> '), <i>16SrII-D</i> ('Ca. <i>P. australasia</i> '), <i>16SrIII-J</i> (<i>Ca. P. pruni</i> '), <i>16SrVI-A</i> ('Ca. <i>P. trifolii</i> '), <i>16SrVIII-A</i> ('Ca. <i>P. americanum</i> '), <i>16SrXII-A</i> (<i>Ca. P. solani</i>), <i>16SrXV-A</i> , ('Ca. <i>P. brasiliense</i> ') и др.
Вирусы	<i>Cucumber Mosaic Virus (CMV)</i> , <i>Squash Mosaic Virus (SqMV)</i> , <i>Zucchini Yellow Mosaic Virus (ZYMV)</i> , <i>Watermelon Mosaic Virus 2 (WMV-2)</i> , <i>Watermelon Mosaic Virus 1 (WMV-1)</i> , <i>Papaya Ringspot Virus (PRSV)</i> , <i>Tobacco ringspot virus (TRSV)</i> , <i>Tomato ringspot virus (TmRSV)</i> , <i>Tomato spotted wilt virus (TSWV)</i> , <i>Clover yellow vein virus (CYVV)</i> , <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV)</i> , <i>Zucchini lethal chlorosis virus (ZLCV)</i> , <i>Melon yellowing-associated virus (MYaV)</i> , <i>Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)</i> , <i>Cucumber leaf spot virus (CLSV)</i> , <i>Cucumber necrosis virus (CNV)</i> , <i>Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV)</i> , <i>Melon necrotic spot virus (MNSV)</i> , <i>Zucchini yellow fleck virus (ZYFV)</i> , <i>Ourmia melon virus (OuMV)</i> , <i>Hop stunt viroid (HSVd)</i> и др.

Список заболеваний крестоцветных культур и их возбудителей

(Diseases of Crucifers (Brassica and Raphanus spp.) Paul H. Williams, primary collator (last update 3/8/93) <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/commonnames/Pages/Crucifers.aspx>; https://santamariaseeds.com/wp-content/uploads/2016/10/Crucifer_Disease_Guide.pdf; <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01349/full> https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_virus_species)

Название болезней	Виды возбудителей
Микозы	
Альтернариоз	<i>Alternaria brassicae</i> (Berk.) Sacc., <i>A. brassicicola</i> (Schwein.) Wiltshire, <i>A. raphani</i> J.W. Groves & Skolko
Чёрная ножка	<i>Leptosphaeria maculans</i> (Sowerby) P.Karst., (anamorph: <i>Phoma lingam</i>), <i>Olpidium brassicae</i> (Woronin) P. A. Dang., <i>Pythium debarianum</i> R. Hesse, <i>Rhizoctonia solani</i> J. G. Kuehn
Чёрная гниль	<i>Aphanomyces raphanin</i> J.B. Kendr.
Ризоктониозная гниль нижних листьев и стебля	<i>Rhizoctonia solani</i> J.G. Kühn
Церкоспоровая пятнистость листьев	<i>Cercospora brassicicola</i> Henn.
Кила	<i>Plasmodiophora brassicae</i> Woronin
Загнивание «проводящий стержень» корня	<i>Pythium spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> J.G. Kühn
Пероноспороз (ложная мучнистая роса)	<i>Hyaloperonospora parasitica</i> (Pers.) Constant. = <i>Peronospora brassicae</i> Gäum.
Фитофторозная корневая гниль	<i>Phytophthora megasperma</i> Drechsler
Мучнистая роса	<i>Erysiphe cruciferarum</i> Opiz ex L. Junell
Кольцевая пятнистость листьев	<i>Mycosphaerella brassicicola</i> (anamorph: <i>Astromella brassicae</i>)
Антракноз	<i>Colletotrichum higginsianum</i> Sacc.
Чёрная плесневая гниль	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill.
Афаномицетная чёрная гниль	<i>Aphanomyces raphanin</i> J.B. Kendr.

Название болезней	Виды возбудителей
Гниль основания стебля и корня, корневая гниль проростков, проводочный стебель	<i>Ganoderma orbiforme</i> (Fr.) Ryvardeen, <i>Rhizoctonia solani</i> J.G. Kühn, <i>Thanatephorus cucumeris</i> [teleomorph]
Серая гниль	<i>Botrytis cinerea</i> Pers. <i>Botryotinia fuckeliana</i> (de Bary) Whetzel [teleomorph]
Светлая пятнистость листьев	<i>Pyrenopeziza brassicae</i> B. Sutton & Rawl.
Фиматотрихопсисная корневая гниль	<i>Phymatotrichopsis omnivore</i> (Duggar) Hennebert
Склеротиниозная стеблевая гниль и мокрая мягкая гниль	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary
Южный микоз	<i>Athelia rolfsii</i> (Curzi) C.C. Tu & Kimbr. = <i>Sclerotium rolfsii</i> anamorph Sacc.
Вертициллёзное увядание	<i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke & Berthold, <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.
Белая пятнистость листьев и сероватость стебля	<i>Pseudocercospora capsellae</i> (Ellis & Everh.) Deighton
Белая ржавчина и «голова оленя»	<i>Albugo candida</i> (Pers.) Kuntze, <i>Peronospora</i> sp.
Фузариозная желтуха	<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. emend. Snyder & Hansen
Бактериозы	
Бактериальная пятнистость листьев	<i>Pseudomonas cannabina</i> (ex Šutic and Dowson 1959) = <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>cannabina</i> Dye et al. Gardan et al.
Мягкая бактериальная гниль	<i>Pectobacterium carotovorum</i> (Jones, 1901) Waldee = <i>Erwinia carotovora</i>
Псевдомонасная мягкая бактериальная гниль	<i>Pseudomonas marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> (Brown 1918) Stevens
Чёрная гниль	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> (Dowson) Dye, et al.

Название болезней	Виды возбудителей
Корончатые галлы (бактериальный рак)	<i>Rhizobium radiobacter</i> (Beijerinck and van Delden 1902) Young et al. = <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ' (Smith and Townsend 1907) Conn
Ксантомоная пятнистость листьев	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>raphani</i> (Pammel 1895) Dowson
Парша	<i>Streptomyces scabies</i> Lambert and Loria
Фитоплазмы	16SrI ('Ca. <i>P. aster yellow</i> '), 16SrII-A ('Ca. <i>P. australasia</i> '), 16SrIII ('Ca. <i>P. pruni</i> '), 16SrVI-D ('Ca. <i>P. trifolii</i> '), 16SrXII ('Ca. <i>P. solani</i> ')
Вирусы	<i>Cauliflower mosaic virus (CMV)</i> (Ortervirales-Caulimoviridae-Caulimovirus), <i>Radish mosaic virus (RMV)</i> (Picornavirales-Secoviridae-Comovirus), <i>Turnip yellow mosaic virus (TMV)</i> (Tymovirales-Tymoviridae-Tymovirus), <i>Beet western yellows virus (BWYV)</i> (Tolivirales-Luteoviridae-Polerovirus), <i>Radish leaf curl virus (Geplafuvirales-Geminiviridae-Begomovirus)</i> , <i>Radish yellow edge virus (Durnavirales-Partitiviridae-)</i> , <i>Turnip crinkle virus (Tolivirales-Tombusviridae-Carmovirus)</i> , <i>Turnip curly top virus (Geplafuvirales-Geminiviridae-Turncurto-virus)</i> , <i>Turnip curly top virus (Geplafuvirales-Geminiviridae-Turncurtovirus)</i> , <i>Turnip mosaic virus (Patatavirales-Potyviridae-Potyvirus)</i> , <i>Turnip rosette virus (Sobelivirales-Solemoviridae-Sobemovirus)</i> , <i>Turnip vein-clearing virus (Martellivirales-Virgaviridae-Tobamovirus)</i> , <i>Turnip yellows virus (Tolivirales-Luteoviridae-Polerovirus)</i> , <i>Cabbage cytorhabdovirus</i> , <i>Broccoli necrotic yellows cytorhabdovirus (Mononegavirales-Rhabdoviridae-Cytorhabdovirus)</i> , <i>Cabbage leaf curl virus</i> , <i>Cabbage leaf curl Jamaica virus (Geplafuvirales-Geminiviridae-Begomovirus)</i>

Чтобы оценить серьезность болезни растений важно определить возбудителя, его вредоносность, источники инфекции и способы ее распространения в природе и агроценозах. При отсутствии такой информации невозможно разработать обоснованные приёмы защиты культуры.

1.1. Болезни овощных культур, вызываемые грибами, бактериями, актиномицетами

Болезни растений могут вызывать грибы, относящиеся к облигатным паразитам, факультативным паразитам и факультативным сапротрофам. Облигатные паразиты – патогены, развивающиеся только в живой ткани: мучнисторосяные, головневые, ржавчинные грибы и некоторые пероноспорные. Факультативные паразиты, как правило, питаются мертвыми растениями, но способны поражать живые ослабленные растения и их части. Факультативные сапротрофы – паразиты, способные продолжать вегетативный рост и размножение на растительных остатках после гибели растения-хозяина. Среди них различают некротрофов и биотрофов. Первые сначала убивают клетки растения выделяемыми токсинами и затем питаются их содержимым. Биотрофы извлекают питательные вещества из живых клеток, а затем пораженная ткань гибнет. У некротрофов некроз опережает распространение паразита, у биотрофов распространение паразита опережает некроз [9].

Различаются два способа размножения грибов – вегетативное и репродуктивное. Последнее происходит спорами, к которым относятся конидии, пикноспоры, зооспоры, базидиоспоры, аскоспоры и другие, именно они вызывают распространение и заражение растений в период вегетации. Чаще всего наличие капельножидкой влаги или относительно высокой влажности воздуха является определяющим условием для прорастания спор и заражения растений. Оптимальными условиями для развития большинства грибов является температура 20-25°C и кислая среда с низким значением pH.

Бактерии – самые мелкие клеточные организмы с прокариотным строением клеток. Как и грибы, лишены хлорофилла и используют для своего развития готовые питательные вещества. Размножаются бактерии простым делением материнской клетки на две части. Рост бактерий обычно начинается при температуре 2-5°C, оптимальной является температура 20-30°C. Наибольший рост колоний бактерий наблюдается в нейтральной и слабощелочной средах (pH 7,0-7,5). Различают две группы бактериозов: общее заражение растений, при котором поражаются корни или сосудистая система, и местное,

ограниченное внедрение бактерий в отдельные органы или их части. Наиболее вредоносны общие бактериозы, так как они приводят к гибели растений. По внешним признакам поражения бактериозы делятся на гнили, увядание, некрозы, ожоги, наросты.


Источниками сохранения и распространения бактерий являются зараженные семена, посадочный материал, почва, остатки пораженных растений, сорняки и насекомые. От растения к растению они передаются ветром, дождями, насекомыми, нематодами и человеком.


Актиномицеты (Актинобактерии – *Actinobacteria*) по своей организации и внутреннему строению занимают промежуточное положение между грибами и бактериями. Их вегетативное тело имеет очень тонкий ветвящийся мицелий, напоминающий мицелий некоторых грибов. Но в отличие от грибов они – прокариоты, как и бактерии. Актиномицеты очень широко распространены в почве, что обуславливает ее характерный «почвенный» запах. Большинство из них — сапротрофы. Размножаются актиномицеты фрагментами мицелия или спорами, формирующимися на специальных органах – спораносцах [9].

Эти группы патогенов вызывают большое количество болезней овощных культур. В описании вошли некоторые патогены, вызывающие наиболее распространенные болезни. В табл. 5 представлены примеры визуального поражения овощных культур наиболее распространенными патогенными грибами, бактериями и актиномицетами.

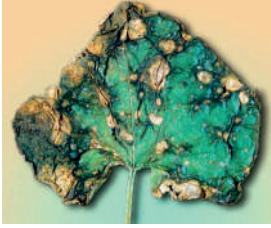


Таблица 5

Характеристика основных болезней овощных культур, вызываемых грибами, бактериями и актиномицетами

Болезни и патогены	Визуальные признаки поражения	Описание поражения
<p>Мучнистая роса на примере огурца. Грибы <i>Podosphaera fuliginea</i>, <i>Erysiphe cichoracearum</i></p>		<p>На листьях или стеблях белый (реже слегка рыжеватый) мучнистый налет в виде небольших пятен, распространяющихся на весь лист, после чего лист начинает желтеть и постепенно сохнуть (https:// 7dach.ru/Exspert/skoraya-pomosch-dlya-ogurcov-bolezni-i-metody-borby-s-nimi-6266.html)</p>

Болезни и патогены	Визуальные признаки поражения	Описание поражения
<p>Пероноспороз на примере огурца. Гриб <i>Pseudoperonospora cubensis</i> Rostowz</p>		<p>На верхней стороне листьев появляются желтоватые пятна, затем с их нижней стороны образуется серовато-фиолетовый налет. Пятна сливаются, края листьев сворачиваются вверх, лист засыхает. Задерживается процесс завязывания плодов и их нормальное развитие. Зрелые плоды становятся безвкусными и слабо окрашенными (https:// agroflora.ru/ wp-content/ uploads/ 2014/ 05/ Pseudoperonospora-cubensis.jpg)</p>
<p>Кладоспориоз, оливковая пятнистость на примере томата. Гриб <i>Cladosporium cucumerinum</i> Ellis & Arthur</p>		<p>На верхней стороне листьев появляются округлые желтовато-коричневые пятна, а с нижней стороны на пятнах образуется оливково-коричневый бархатистый налёт, состоящий из конидиально-го спороношения. Листья постепенно скручиваются и засыхают. Плоды и стебли растения покрываются небольшими округлыми язвами зелено-бурого или оливкового цвета, которые темнеют и увеличиваются в размерах (https:// 7dach. ru/ Exspert/ skoraya-pomosch-dlya-ogurcov-bolezni-i-metody-borby-s-nimi-6266.html)</p>


Болезни и патогены	Визуальные признаки поражения	Описание поражения
<p>Белая гниль. Гриб <i>Sclerotinia sclerotiorum</i></p>		<p>На побуревших участках побегов формируется белый ватообразный налёт, на поверхности которого со временем формируются склерции тёмной окраски. Затем листья, стебли и даже плоды растения покрываются сплошным белым налетом, ослизняются, размягчаются и загнивают (https:// 7dach.ru/ Exspert/ skoraya-pomosch-dlya-ogurcov-bolezni-i-metody-borby-s-nimi-6266.html)</p>
<p>Серая гниль на примере огурца. Гриб <i>Botrytis cinerea</i></p>		<p>На листьях, побегах и плодах образуются коричневые пятна, на которых формируется плотный серый налёт спороношения. Поражённые органы загнивают (https:// floristics.info/ ru/ stati/ bolezni/ 3177-seraya-gnil-lechenie-i-profilaktika-mery-borby.html)</p>
<p>Антракноз на примере томата. Грибы родов <i>Kabatiella</i>, <i>Colletotrichum</i>, <i>Gloeosporium</i></p>		<p>На листьях, стеблях, плодах появляются многочисленные бурые пятна. Поражённые листья засыхают, плоды покрываются мокрыми язвами (https:// nasotke.ru/ wp-content/ uploads/ 2018/ 04/ antraknoz-na-plodah-tomata.jpg)</p>

Болезни и патогены	Визуальные признаки поражения	Описание поражения
<p>Аскохитоз на примере огурца. Грибы рода <i>Ascochyta</i> sp.</p>		<p>На стеблях, листьях и плодах появляются пятна округлой формы, сначала зеленые, затем буреют и становятся светлыми. На их поверхности формируются плодовые тела – пикниды – в виде темных точек (https://7dach.ru/Exspert/skoraya-pomosch-dlya-ogurcov-bolezni-i-metody-borby-s-nimi-6266.html)</p>
<p>Фитофтороз на примере томата. Грибоподобный оомицет <i>Phytophthora infestans</i> Mont. de Bary</p>		<p>На листьях, побегах и плодах образуются коричневые некротические пятна. С нижней стороны листьев по краю пятна формируется спороношение зооспорангиев. Поражённые участки загнивают при вторичной инфекции бактерий и грибов (https://i2.wp.com/stylishgarden.ru/wp-content/uploads/2016/06/314.jpg)</p>
<p>Черная ножка на примере капусты. Псевдогриб <i>Pythium debaryanum</i> Hesse <i>Leptosphaeria maculans</i> (Sow-erby) P.Karst., (anamorph: <i>Phoma lingam</i>), + <i>Olpidium brassicae</i> (Woronin) P. A. Dang., <i>Pythium debarianum</i> R. Hesse, <i>Rhizoctonia solani</i> J. G. Kuehn</p>		<p>В основном проявляется почернением и загниванием всходов (https://diz-cafe.com/wp-content/uploads/2019/05/post_5a7f019d395a8.jpg)</p>

Болезни и патогены	Визуальные признаки поражения	Описание поражения
<p>Фузариозное увядание на примере огурца. Грибы рода <i>Fusarium sp.</i></p>		<p>В результате заражения сосудов корня и стеблей они преобретают бурый цвет. На поверхности поражённых органов формируется беловатый налёт спороношения. Листья желтеют, растения увядают и усыхают (https://rufazenda.ru/fuzarioznoe-uvyadanie-tomatov.html, https://monateka.com/images/293080.jpg)</p>
<p>Кила на примере капусты. Грибоподобный протист <i>Plasmodiophora brassicae</i> Wor</p>		<p>Под воздействием возбудителя клетки корней усиленно делятся, что приводит к образованию вздутий в форме утолщений, желваков. Растения начинают привядать в жаркую погоду, кочаны недоразвиваются, теряют товарные качества. Ткани наростов подвергаются загниванию (https://landshaft-stroy.ru/img/kapusta-slava-posadka-i-uhod-v-otkrytom-grunte_8.jpg)</p>
<p>Ржавчина на примере свёклы. Гриб <i>Uromyces betae</i></p>		<p>На поверхности листа возникают оранжево-коричневые бугорки пустул с уредоспорами овальной или круглой формы. Листья желтеют и опадают (https://www.botanichka.ru/article/puccinia/)</p>

Болезни и патогены	Визуальные признаки поражения	Описание поражения
Церкоспороз на примере свёклы. Гриб <i>Cercospora longissima</i> (Cugini) Sacc.		<p>На листьях образуются небольшие округлые пятна светло-бурого цвета с ярко выраженной красно-коричневой каймой. На черешках и стеблях пятна, слегка вдавленные, вытянутые, светло-коричневого цвета (https:// agronom.expert/ posadka/ ogorod/ drugie-rasteniya/ svekla/ tserkosporoz-kak-ne-dopustit.html)</p>
Фомоз на примере свёклы. Гриб <i>Phoma rostrupii</i> Sacc.		<p>Проявляется в виде коричневато-серых пятен на листьях. На них образуются точки плодовых тел – пикниды. Пораженные корнеплоды при хранении покрываются вдавленными пятнами темно-коричневого цвета. Внутри больного корнеплода могут быть пустоты или ткань бурого цвета (https:// vsadu.ru/ post/ fomoz-ovoshhej-mery-borby-i-profilaktika.html)</p>
Септориоз, или белая пятнистость на примере свеклы. Гриб <i>Septoria sp.</i>		<p>Вначале на старых листьях появляются небольшие красно-коричневые пятна, затем они бледнеют, покрываются белесым сероватым налетом, а на их поверхности образуются черные пикниды (https:// ogorod.ua/ bl/4/80190103. jpg; https:// 7ogorod.ru/ pomidory/ septorioz-tomatov.html)</p>

Болезни и патогены	Визуальные признаки поражения	Описание поражения
<p>Ризоктониоз на примере моркови и капусты. Гриб <i>Rhizoctonia sp.</i></p>		<p>Пораженные болезнью ткани у капусты становятся водянистыми, приобретают светло-бурую окраску. На листьях можно заметить беловатый налет, который потом становится бурым. Рядом с центральной жилкой листа начинают формироваться мелкие плоские черные или темно-серые склероции.</p> <p>При поражении моркови на корнеплодах возникают серо-свинцового цвета пятна с фиолетово-красными точками. Поверхность корнеплода начинает буреть и покрывается фиолетово-красным налетом. Со временем она уплотняется, превращаясь в сплошную твердую корку со склероциями. Корнеплод растрескивается, ссыхается и вянет (http:// www.udec.ru/ images/ 2110a-28.jpg)</p>
<p>Головня лука. Гриб <i>Urocystis cepulae</i> Frost</p>		<p>На листьях сначала появляются узкие сероватые продольные полосы со вздувшимся эпидермисом. Затем они подсыхают, эпидермис разрывается и из трещин выступает масса черных, склеенных в комочки спор гриба (https:// agroflora.ru/ golovnya-luka/; https:// vsadu.ru/ images/zhelteet-lukgnienie-lukovicy.jpg)</p>

Болезни и патогены	Визуальные признаки поражения	Описание поражения
<p>Мокрая или мягкая бактериальная гниль лука. Бактерии: <i>Pectobacterium carotovorum subsp. (Jones) Waldee</i>. <i>Pseudomonas gladioli pv. allicola Burk.</i> (син. <i>Pseudomonas allicola</i>)</p>		<p>У лука заражённые листья преждевременно увядают и высыхают, вокруг шейки образуется расплывчатое светлое или чуть розоватое пятно, ткань в этом месте размягчается. Отдельные сочные чешуи, середина луковицы покрывается слизью бледно-жёлтого или светло-коричневого цвета. Происходит общее размягчение луковиц, они приобретают резкий неприятный запах. В сухих помещениях луковицы часто усыхают. Распространению заболевания способствуют акариформные клещи (https://boleznisada.ru/myagkaya-ili-mokraya-bakterialnaya-gnil-luka)</p>
<p>Шейковая гниль лука. Гриб <i>Botrytis allii</i> Munn</p>		<p>Поражает лук при хранении, чаще проявляется в дождливое лето. Луковицы не хранятся, быстро загнивают (https://karantin.net/wp-content/uploads/2017/04/1610-009-1.jpg)</p>
<p>Парша корнеплодов Актинобактерия рода <i>Streptomyces sp.</i></p>		<p>На корнеплодах, чаще в верхней части, появляются выпуклые сухие опробковевшие наросты. Образования часто имеют форму колец, опоясывающих корнеплод, что снижает товарность и может привести к загниванию при хранении (https://ogorodnash.ru/wp-content/uploads/2019/07/Bolezni-morkovi-5-par.jpg)</p>

1.2. Болезни овощных культур, вызываемые вирусами

По мнению более 250 фитовирусологов мира, в десятку наиболее значимых фитовирусов, способных инфицировать и вызывать заболевания овощных культур входят вирус мозаики табака (*Tobacco mosaic virus*), вирус пятнистого увядания томата (*Tomato spotted wilt virus*), вирус жёлтого скручивания листьев томата (*Tomato yellow leaf curl virus*), вирус мозаики огурца (*Cucumber mosaic virus*), Y-вирус картофеля (*Potato virus Y*), вирус мозаики цветной капусты (*Cauliflower mosaic virus*). Почти все перечисленные патогены, кроме вируса жёлтого скручивания листьев томата и вируса кустистой задержки роста томата, известны на овощных и в России [10, 11].

На территории Российской Федерации на овощных культурах выявлено около 50 вирусов, у 35 из которых подтверждена вирусная природа современными методами (ИФА и ПЦР).

Вирус мозаики томата (ВМТо) – *Tomato mosaic virus* (ToMV). Род *Tabamovirus*, семейство *Virgaviridae*. NCBI: 12253.

Распространенность. Вирусы группы табачной мозаики (ВТМ) повсеместно распространены на томате, перце и баклажане. ВМТо методом ИФА выявлен на томатах закрытого грунта в Астрахани, Брянске, Волгограде, Калуге, Кировске, Краснодаре, Липецке, Москве и Московской области, Нальчике, Новом Осколе, Обнинске, Ростове-на-Дону, Саратове, Сургуте, Тамбове, в открытом грунте на баклажане, перце и томатах на Дальнем Востоке, на томатах в Астраханской и Оренбургской областях [12].

Симптомы. Мозаика – наиболее частая форма проявления заболевания. Пестрая окраска листьев может быть от бледно-зеленой пятнистости до ярко-желтой узорчатой мозаичности. При повышенной влажности воздуха и сравнительно низкой температуре на мозаичных растениях развивается нитевидность листьев.

Стрик (некротическая штриховатость) характеризуется образованием некротических пятен и полос на листьях, стеблях и плодах.

Внутренний некроз плодов проявляется в образовании некротических участков коричнево-бурого цвета в мякоти плода, которые распространяются от места прикрепления плодоножки к вершине.

Некротическая пятнистость плодов – сравнительно новое заболевание томата, оно зарегистрировано на гибридах с геном устойчивости к ВТМ. Симптомы болезни проявляются в виде некротических колец размером 0,3-2,5 см. Овальные бурые пятна чаще образуются на нижней стороне плода, в месте прикрепления к плодоножке. Иногда отмечается сплошное побурение плода, напоминающее симптомы фитофтороза, но без прогрессирующего загнивания тканей (рис. 1).



Рис. 1. Признаки вируса мозаики томата и табака на листьях перца, тыквы и томатов (фото Т.С. Фоминых)

Эпифитотология. ВМТо относится к контактным патогенам, частично сохранившим связь с природными очагами инфекции. Имеет устойчивые пути циркуляции в пределах поражаемой культуры. Инфекция обычно ограничивается растениями, которые выращиваются через рассаду и пересаживаются, так как вирус интенсивнее заражает растения в процессе обработок и ухода [13].

Диагностика. Для идентификации вируса используются индикаторный, серологический методы (ИФА), ПЦР и электронная микроскопия.

Вирус мозаики табака (ВТМ) – *Tobacco mosaic virus (TMV)*. Род *Tabamovirus*, семейство *Virgaviridae*. NCBI:71010012.

Распространение. ВТМ распространён во всём мире. В России ИФА-методами ВМТ был выявлен на томатах закрытого грунта в 16 из 19 хозяйств (более 80 %), которые участвовали в обследовании. Распространенность составила 18,3-19,7 % [12].

Симптомы. Светло-зеленая окраска между жилками молодых листьев, сопровождающаяся появлением мозаичного рисунка из светло- и темно-зеленых участков, морщинистостью и вытянутостью молодых листьев. Нижние листья в жаркую погоду могут подвергаться

«мозаичному ожогу», приводящему к отмиранию больших участков ткани. Иногда проявляется нитевидность, может наблюдаться некротический стрик листьев и внутренний некроз плодов. Снижается завязываемость плодов, появляются дефекты и уродливость их развития, иногда с некротическим эффектом (рис. 2).

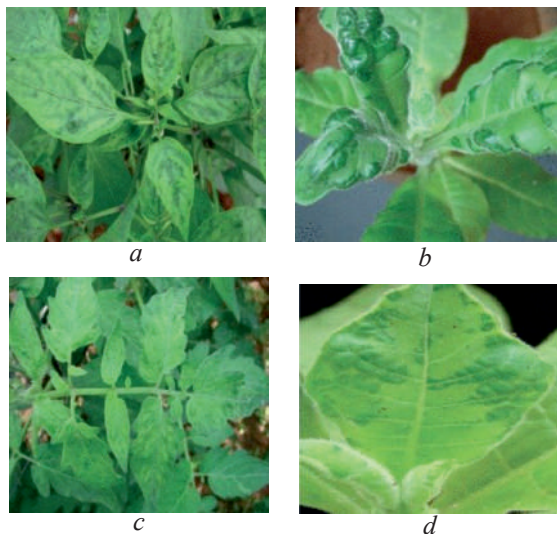


Рис. 2. Симптомы ВТМ: а – на листьях перца; b, d – на табаке *Nicotiana tabacum* с. *Samsun*; с – на томате

(https://www.researchgate.net/publication/51478099_Detection_of_Tobacco_mosaic_virus_and_Tomato_mosaic_virus_in_pepper_and_tomato_by_multiplex_RT-PCR/figures?lo=1)

Эпифитотимология. ВТМ заражает более 125 отдельных видов растений из 9 семейств, включая всех представителей овощных пасленовых и огурцы. ВТМ сохраняется в инфицированных стеблях и листьях, в почве, на поверхности зараженных семян. Высоко контагиозен, и эффективно заражает при контакте с инфицированными растениями-хозяевами, может передаваться неперсистентно насекомыми (тли, цикадки), через инструменты, руки сельскохозяйственных работников.

Диагностика. Индикаторный, серологический (ИФА, экспресс-метод ИФА) методы и ПЦР. Растения индикаторы: *Nicotiana tabacum* – системная мозаика; *Chenopodium quinoa*, *Nicotiana glu-*

tinosa и *N. tabacum* св. *Xanthi* – локальные некротические пятна. Праймеры для ПЦР: fp – 5'-CGACATCAGCCGATGCAGC-3'; rp – 5'-ACCGTTTTCGAACCGAGACT-3' (DOI:10.1111/j.1472-765X.2011.03117.x).

Вирус мозаики пепино (ВМПеп) – *Pepino mosaic virus (PepMV)*.
Род *Potexvirus*, семейство *Alphaflexiviridae*. NCBI ID: 112229.

Распространение. В Московской области на овощной станции РГАУ-МСХА и агрокомбинате «Московский» в единичных образцах растений [12].

Симптомы. На листьях томата развиваются желтые пятна, слабый межжилковый хлороз, в некоторых случаях – узколистость. Наблюдается задержка роста верхушки или симптомы, похожие на ожог гербицидом. Могут появляться коричневые полосы, охватывающие весь стебель, вплоть до точки роста и соцветий, что вызывает их опадание. Основным симптом на томате – вздутия на молодых листьях, «мраморность» и иногда некрозы плодов (рис. 3).



Рис. 3. Симптомы ВМПеп на томате
(<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epp.12023>)

Эпифитотология. Распространяется семенами и контактом при уходе за растениями. Тли, четырёхногие клещи, шмели и почвенный хитридиомицет *Olpidium virulentus* (Sahtiy.) Karling могут способствовать распространению вируса. Выявлен также в сорняках: вьюнке полевом (*Convolvulus arvensis* L.) и щавеле (*Rumex* sp.) в Московской области [14, 15].

Диагностика. Индикаторный: *N. venthamiana* 37В — системная мозаика, хлороз (иногда некроз) и деформация листьев; *N. occidentalis* Р1 – локальные хлороз и некрозы, системный хлороз, карликовость. Серологический (ИФА, экспресс-метод ИФА), ПЦР-праймеры: F5 5'GACTTCTCAAATCCTAATACAGC3' и R5R 5'CACATCAGCATAAGCAGAGC3' (<http://www.uku.fi/~kuulasma/OligoSoftware>; <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/epp.12023>).

Вирус пятнистости зональной пеларгонии (ВПЗП) — *Pelargonium Zonate Spot Virus (PZSV)*. Семейство Bromoviridae, род Anulavirus. NCBI: 116056.

Распространение. Вирус обнаружен на томатах в Италии, Испании, Франции, США, Израиле, Китае и на перце в Испании. В нашей стране вирус диагностирован в тепличных хозяйствах Астрахани, Волгограда, Тамбова с частотой распространения 2,6 % [12].

Симптомы. На томатах отмечаются концентрические хлоротические или некротические кольца и линии на побегах, листьях и плодах, листья могут становиться узкими, а на плодах формируются расплывчатые обесцвеченные пятна, урожайность плодов снижена, растения часто погибают (рис. 4).



Рис. 4. Симптомы PZSV на томатах и перце
(фото Moshe Lapidot 2013 <https://tgc.ifas.ufl.edu/2013/2013/08%20-%20Lapidot.pdf>)

Эпифитотология. Источником инфекции служат декоративные растения и в первую очередь виды рода пеларгонии *Pelargonium L'Hér. ex Ait.* Вирус имеет широкий круг хозяев. Передается семенами и цветочным трипсом *Melanothrips fuscus L.*

Диагностика. Вирус может быть диагностирован с помощью растений-индикаторов: *Cucumis sativus* (локальные хлоротические пятна), *Nicotiana glutinosa* (деформация листьев, хлоротические или некротические локальные пятна, системная мозаика и краевой некроз). Инструментальные методы: ИФА- или ПЦР-праймеры 5'-GGATCCATGCCCCSTAAGAGACAG-3', 5'-GTGCACSTACAGAGGTATATACTCTGCTT-3'.

Вирусы, передающиеся нематодами

Вирус кольцевой пятнистости табака (ВКПТ) – *Tobacco ringspot virus (TRSV)*. Семейство Secoviridae, род Nepovirus. NCBI: ID: 12282.

Распространение. В России выявлен на томатах закрытого грунта в Брянске, Кировске, Краснодаре, в открытом грунте на Дальнем Востоке – на перце и сое [16-18]. Включён в список карантинных объектов Евросоюза: EPPO A2 List no. 228; EU Annex I/A1.

Симптомы. У тыквенных происходит задержка роста с крапчатостью листьев и деформация плодов. У томатов может быть папоротниковидная вытянутость, морщинистость, измельчение, скручивание и хлороз листьев [19, 20]. Кроме того, на поверхности и внутри инфицированных плодов может наблюдаться обесцвечивание (рис. 5).



Рис. 5. Симптомы вируса кольцевой пятнистости на томатах (фото Ontario CropIPM, <http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/english/tomatoes/diseases-and-disorders/viruses.html>)

Эпифитотимология. В природе TRSV передается нематодами-переносчиками *Xiphinema americanum Cobb.* и близкородственными видами рода *Xiphinema*. Передача через семена была зарегистрирована у 12 видов сельскохозяйственных культур и сорняков-хозяев, частота передачи колеблется от 3 % у *Cucumis melo* до 100 % у *Glucine max*. Вирус выявлен у более чем 40 видов растений из 20 семейств. Легко передаётся инокуляцией соком.

Диагностика. Индикаторный метод, электронная микроскопия, ИФА- и ПЦР-праймеры: RSV-FP 5'-GGGGTGCTTACTGGCAAGG-3', TRSV-RP 5'-GCACCA GCG TAAGAACCCAA-3' и TaqMan-MGB TRSV FAM Probe 5'-FAM-TGATTTGCGGCGTACTG-MGB-3'.

Вирус кольцевой пятнистости томата (ВКПТо) – *Tomato ringspot virus (TORSV0)* NCBI ID: 12280. ICTVdB /00.018.0.03.029. Семейство *Secoviridae*, род *Nepovirus*.

Распространение. Обнаружен в европейской части России на томатах.

Симптомы. Томаты, выращенные в полевых условиях, имеют некроз верхушек активно растущих побегов, коричневые некротические кольца и извилистые линии на молодых листьях. На ранних стадиях заражения плоды бледнеют, затем имеют серый оттенок и коричневые, пробковые, поверхностные концентрические кольца или дуги (рис. 6).



Рис. 6. Симптомы вируса кольцевой мозаики томата на листьях и плодах томата

(фото Gerald Holmes, Strawberry Center, Cal Poly San Luis Obispo, Bugwood.org <https://www.forestryimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1573848#>;
<https://www.thedailygarden.us/garden-word-of-the-day/tomato-ringspot>)

Эпифитотиология. Зарегистрирован на 30 видах растений, искусственно заражает огурец и фасоль [21, 22]. Вирус легко передаётся инокуляцией соком. В природе передается нематодами *Xiphinema americanum* и другими видами этого рода, а также передается через семена и пыльцой нескольких растений-хозяев.

Диагностика. Индикаторный метод: *Chenopodium amaranticolor* (Н.Ж. Coste & А. Реун.) и *Chenopodium quinoa* (Крокк.) (хлоротичные или некротические локальные поражения; системный апикальный некроз), *Nicotiana clevelandii* А. Gray и *Nicotiana tabacum* L. (некротические локальные кольца), *Phaseolus vulgaris* L., (хлоротичные локальные поражения; системная морщинистость и некроз), *Cucumis sativus* L. (хлоротичные локальные пятна; системный хлороз и крапчатость), *Petunia x hybrida* hort. ex Vilm. (некротические локальные поражения; некротическое отмирание верхних листьев при системной реакции). Из инструментальных методов для обнаружения виру-

са используются иммунная электронносканирующая микроскопия, ИФА- и ПЦР-праймеры: TCC GTC CAA TCA CGC GAA TA) и U1 (GAC GAAGTT ATC AAT GGC AGC [23-30].

Вирус чёрной кольцевой пятнистости томата (ВЧКПТ) – *Tomato black ring virus* (TBRV). NCBI: txid12275. Семейство *Secoviridae*, род *Nepovirus*.

Распространение. В европейской части России выявлен на томатах закрытого грунта [20, 24].

Симптомы. На листьях первичная инфекция может проявляться в виде некротических колец и пятен, а вторичная – в виде деформаций (морщинистость, скручивание листьев), сопровождающихся некрозом, иногда резко замедляется рост растений. На плодах появляются жёлтые кольца. На нижней стороне листьев тепличного огурца могут образоваться энации (листообразные выросты).

Эпифитотиология. TBRV передается почвенными нематодами рода *Longidorus* и с высокой частотой (10-100%) семенами инфицированных растений. Естественное заражение вирусом выявлено также у растений: лука, свёклы, капусты, салата, фасоли.

Диагностика. Индикаторный метод с использованием видов *Chenopodium amaranticolor* и *C. quinoa*, а также *Nicotiana rustica* и *N. tabacum*. Из инструментальных методов: электронная микроскопия, ИФА, ПЦР праймеры: TBRV-CP-F: 5'-GGCAGACGGGGATTTTGC-3' и TBRV-CP-R: 5'-СТАТGCRGGAATAGTWARAGG-3' [31].

Вирус мозаики резухи (ВМР) – *Arabis mosaic virus* (ArMV) *Taxonomy* NCBI ID: 12271. Семейство *Secoviridae*, род *Nepovirus*.

Распространение. Выявлен в томатах закрытого грунта.

Симптомы. Инфекция ArMV обычно носит латентный характер. В определённых условиях у чувствительных растений может проявляться задержка роста, крапчатость и посветление жилок, деформация и энации на листьях (рис. 7) [12].

Эпифитотиология. Предполагается, что несколько видов нематод семейства *Longidoridae* могут быть векторами ArMV, но доказательства получены только для *Xiphinema diversicaudatum* Micoletzky. Передача через семена — обычное явление, обнаружено как минимум у 12 из 15 видов растений с эффективностью, достигающей 100 %. В базе EPPO Global Database указано более 25 видов рас-

тений-хозяев вируса, из них овощи: *Lactuca sativa* L., *Cucumis sativus* L., *Apium graveolens* L., *Armoracia rusticana* G.Gaertn. B.Mey. & Scherb., *Rheum rhabarbarum* L. и *Beta vulgaris* L.



Рис. 7. Симптомы сетчатой (жилковой) мозаики на сныти обыкновенной и винограде при инфицировании ArMV – *Aegopodium podagraria*

(<http://shutterstock.puzzlepix.hu/kep/1407958211>, <http://www.omafra.gov.on.ca/IPM/english/grapes/diseases-and-disorders/fanleaf.html>)

Диагностика. Индикаторами являются *Chenopodium quinoa* и *C. amaranticolor*, реагирующие образованием хлоротичных локальных пятен с последующей системной крапчатостью. У огурца может наблюдаться хлоротичное поражение семядолей, посветление жилок или желтые пятна. Фасоль реагирует локальными жёлтыми пятнами, системным некрозом и деформацией листьев. Электронная микроскопия, ИФА- и ПЦР-праймеры: ArMV ArMVcpF TAGCCSTTGAGACAATCCT ArMVcpR CCTCCAAATCCCACATTAAC, ArMVcp Probe TGCCCATATGATAGCTTGTGCATGGAC [28-33].

Заболевания томатов, распространяемые трипсами

Вирус бронзовости томата (ВБТ) – *Tomato spotted wilt virus (TSWV)*. Род *Tospovirus*, семейство *Bunyaviridae*. NCBI: txid267287.

Распространение. Широко распространен в южных районах России (4,9 %). Был выявлен на томатах закрытого грунта в Волгограде, Краснодаре, Нальчике, Обнинске и Ростове-на Дону, а также на перце [12, 34].

Симптомы. На листьях томата проявляются бронзовые пятна, некротические кольца и узоры, постепенно покрывающие всю поверхность листа и деформирующие её. Нередко болезнь начинается с отмирания верхушки растения, после чего отрастают вполне здоровые стебли. На листьях перца образуются хлоротические кольца, на плодах – узорчатое изменение окраски от ярко-красной до ярко-желтой.

На баклажане симптомы отмечены только на листьях в виде желтых и некротических пятен (рис. 8).

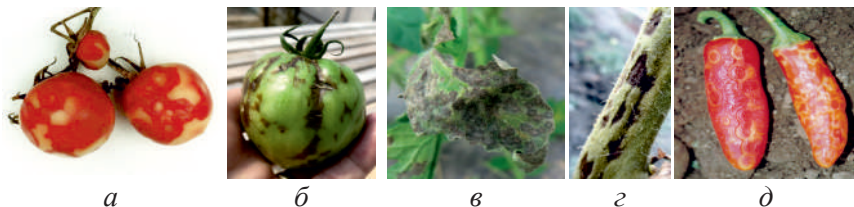


Рис. 8. Симптомы вируса бронзовости:
а – кольцевая пятнистость плодов томата

(фото Т.С. Фоминых);

б, в – некрозы плода томата и листьев томата

(фото Gene McAvoy <https://www.growingproduce.com/vegetables/what-you-should-know-about-tomato-spotted-wilt-virus/>);

г – некрозы стебля томата

(фото Д.З. Богоутдинова);

д – кольцевая мозаичность плодов перца

(фото © Utah State University <http://vegetableguide.usu.edu/diseases/tomato-pepper-eggplant/tomato-spotted-wilt-virus>)

Эпифитотимология. Заболевание относится к числу природно-очаговых, но вместе с тем вирус имеет устойчивые пути циркуляции независимо от сорных и дикорастущих растений-резервуаров инфекции. В России в качестве переносчика ВБТ зарегистрирован трипс *Thrips tabaci* Lind.

Вирус бронзовости томатов поражает более 1000 видов растений, относящихся к 80 семействам, в том числе, салат, перец, баклажан, томат. Передача семенами не наблюдалась.

Диагностика. В практике широко применяется индикаторный метод растения *Petunia hybrida* Hort, *Nicotiana glutinosa* L. и ряд других видов табака. Из инструментальных методов применяются экспресс-метод ИФА (иммунострипы фирмы Agdia) и ПЦР: праймеры для мультиплексного анализа TaqMan: TSWV-CP-17F – CTC TTG ATG CAA AGT CTG TGA; TSWV TC-100R – TCT CAA AGC TAT CAA CTG AAG CAA TAA TSWVAGG TAA GCT ACCTSWV-CP-73 AGG TAA GCT ACC TCC CAG CAT TAT GGC AAG [35].

Кроме TSWV трипсы могут переносить *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) (*Tospoviridae* – *Orthotospovirus*), *Tobacco streak virus* (TSV) (*Bromoviridae* – *Ilarvirus*), *Tomato yellow ring*

virus (TYRV) (Bunyaviridae – Tospovirus), Capsicum chlorosis virus (CaCV) (Bunyaviridae – Tospovirus) и Tomato zonate spot virus (TZSV) (Bunyaviridae – Tospovirus) [36].

Заболевания томатов, распространяемые белокрылками

Вирус желтой курчавости листьев томатов (ВЖКЛТ) – *Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)*. *Под Begomovirus, семейство Geminiviridae. NCBI: txid66366.*

Распространение. В России желтая карликовость листьев томатов пока не зарегистрирована.

Симптомы. Утолщение жилок, желтая мозаика, курчавость и скручивание листьев, подавление роста растения, сокращение числа цветков, снижение плодоношения, уменьшение размера плодов, ухудшение их товарных качеств.

При сильном поражении семена в плодах не образуются или остаются недоразвитыми. Потери урожая от болезни колеблются в пределах 90-100 %.

Эпифитотимология. Переносчиком вируса является табачная белокрылка *Bemisia tabaci Germ.*, в меньшей степени – *тепличная белокрылка Trialeurodes vaporariorum Westwood*. Вирус не удалось передать через семена томатов и механическим путем.

Диагностика. Индикаторный метод, ИФА, ПЦР, ПЦР в реальном времени с использованием специфических праймеров: *V781* CTC ACA GAG TGG GTA AGA GG; *I256* TTA ATT TGA TAT TGA ATC ATA GAA ATA G; *V1769* GCG AAC AGT GGC TCG TAG AGG G и др. DOI: 10.1023/A:1008699603559.

Помимо TYLCV, белокрылки могут быть переносчиками вирусов *Tomato torrado virus (ToTV) (Secoviridae – Torradovirus)*, *Tomato infectious chlorosis virus (TICV) (Closteroviridae – Crinivirus)* и *Tomato chlorosis virus (ToCV) (Closteroviridae – Crinivirus) [36].*

Заболевания томата, распространяемые тлями

Вирус мозаики огурца (ВОМ) – *Cucumber mosaic virus (CMV)*. Род *Cuscutovirus*, семейство *Bromoviridae*. NCBI: txid12305.

Распространение. В России наиболее вредоносен на Северном Кавказе, в Нижнем Поволжье, Хабаровском крае и на Дальнем Востоке. В Ростовской и Самарской областях считается самым рас-

пространственным из полевых вирусов двудольных растений, в открытом грунте был выявлен на томате, огурце, перце, баклажане, кабачке, дыне, арбузе, фасоли и салате. На томатах закрытого грунта встречался в 14 из 19 хозяйств с частотой 26,7-31,4 % [12, 37-44].

Симптомы. На большинстве овощных культур вызывает симптомы деформации и нитевидности листьев, значительную задержку роста, чрезмерное кущение и мелкоплодность. На тыквенных культурах проявляется в виде различных типов мозаики, укорочения междоузлий и даже увядания растений. На плодах отмечена пестрая расцветка поверхности с выпуклыми темно-зелеными участками; они более мелкие, нередко уродливой формы. На листьях кабачка, тыквы, дыни, патиссона развиваются симптомы мозаики листьев с темными пузыревидными вздутиями. На плодах отмечены признаки бородавчатости и пестрой мозаики (рис. 9).



Рис. 9. Симптомы ВОМ на овощных культурах:
а – мелколистность и мозаичность листьев томата *f₁* каспар;
б – измельчение и мозаичность листьев перца;
в – некротические кольца на плодах томата сорта *Прима*
(фото Т.С. Фоминых)

Эпифитотимология. Относится к типичным природно-очаговым. Устойчивая циркуляция в природе осуществляется посредством тлей-переносчиков вируса. Отмечена передача через семена 19 видов растений.

Диагностика. Осуществляется индикаторным, ИФА, ПЦР и другими методами. Для идентификации используются *Nicotiana glutinosa*, *Datura stramonium*, *Capsicum angulosum*, *Chenododium quinoa*. Праймеры для ПЦР: CMV_{cp}-FCCACACGGTAGAATCAATTCC и CMV_{cp}-RGGTCTTATTACGGTAAAGGTTG и CMV_{cp}Probe – GCGCGAAACAAGCTTCTTATC [42].

Вирус мозаики люцерны (ВМЛ) – *Alfalfa mosaic virus* (AMV).
Род *Alfavirus*, семейство *Bromoviridae*. NCBI: txid12321.

Распространение. Вирус был обнаружен в Европейской части России на томатах, на Дальнем Востоке – на перце [37, 46]. Передается при инокуляции соком, прививке, в результате механических повреждений или при контакте с соседними растениями. Возможна передача пыльцой и семенами.

Симптомы. Растения, зараженные в ранний период, перестают расти, начинают куститься. У взрослых растений заболевание проявляется в виде ярких желтых пятен (желтой мозаики) по краю листочков или ближе к вершине. По мере развития растения симптомы усиливаются вплоть до некроза листьев и общего увядания. Иногда растение может болеть бессимптомно. Плоды поражаются реже. Признаки напоминают повреждение градом, но отличаются кольцеватостью и поверхностным характером повреждения. Вирионы могут быть обнаружены в любой части растения (рис. 10).



Рис. 10. Симптомы вируса мозаики люцерны на томатах и перце:
а, б — точечные некрозы плодов и жёлтая мозаичность
при инфицировании ВМЛ

(фото T.A. Zitter; Cornell University, Ithaca, NY. http://vegetablemendonline.ppath.cornell.edu/DiagnosticKeys/TomFrt/AlfalfaMV_Tom.htm);

в — ярко-жёлтая мозаичность, измельчение, гофрированность, некрозы листьев и приостановка роста перца при ВМЛ-инфекции
(фото Steven Koike <https://www.tricaldiagnostics.com/2018/07/02/alfalfa-mosaic-virus-on-vegetable-crops/>)

Эпифитотиология. Вирус способен инфицировать томат, фасоль, горох, салат и др. ВМЛ неперсистентно передается зеленой персиковой тлей (*Myzodes persicae* Sulz.) и еще 14 видами *Aphididae*. Кроме того, вирус передается при инокуляции соком, прививке, а также в

результате механических повреждений или при контакте с соседними растениями. Возможна передача пыльцой и семенами, инфекция может локализоваться не только на поверхности, но и в зародыше.

Диагностика. Индикаторный метод, ИФА- или ПЦР-методы: праймеры MV-F (5'-CCATCATGAGTTCTTCASAAAAG-3') и AMV-R(5'-TCGTCACGTCATCAGTGAGAC-3') [47].

Вирусные заболевания огурца защищённого грунта

В мировой практике на огурцах отмечены такие вирусы, как вирус зеленой крапчатой мозаики огурца (*Cucumber green mottle mosaic virus*), вирус мозаики огурца (*Cucumber mosaic virus*), вирус некроза огурца (*Cucumber necrosis virus*), вирус листовой пятнистости огурца (*Cucumber leaf spot*), вирус мозаики арбуза (*Watermelon mosaic virus*), вирус желтой мозаики цукини (*Zucchini yellow mosaic virus*), вирионд белоплодности (*Cucumber pale fruit viroid*) и др. В тепличных хозяйствах России наиболее опасными вирусными болезнями являются зеленая крапчатая и обыкновенная мозаики. Однако следует учитывать потенциальную опасность всех вышеперечисленных патогенов.

Вирус зеленой крапчатой мозаики огурца (ВЗКМО) – *Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)*. Род *Tobamovirus*, семейство *Virgaviridae*. NCBI Taxonomy ID: 12235.

Распространение. Вирус повсеместно встречается в защищенном грунте.

Симптомы. Проявляются вначале на молодых листьях в виде посветления ткани вдоль жилок. Потом появляется четкая мозаика: чередование светло-зеленых и желтоватых участков листа с темно-зелеными пузыревидно вздутыми участками. Листья больных растений морщинистые, обычно меньших размеров, чем здоровые. При белой мозаике образуются белые или желтые пятна звездчатой формы. Рост растений подавлен. На плодах – яркая мозаичная расцветка, при сильном развитии отмечается искривление (рис. 11).

Эпифитотимология. Первоисточниками вируса в теплицах являются семена, собранные с больных растений, зараженная почва или искусственный субстрат, питательный раствор. Переносчики в естественных условиях достоверно не установлены. Передается при

прищипке, подвязке, сборе урожая и других производственных операциях [48, 49].

Диагностика. Серологическим, электронно-микроскопическим методами, по специфическим включениям, ИФА [50]. Ввиду узкой специализации вируса надежных растений-индикаторов пока не найдено.



Рис. 11. Симптомы ВЗКМО на листьях и плодах огурца (<https://cuccap.org/disease-management/melon/cucumber-mosaic-virus/>; https://projectblue.blob.core.windows.net/media/Default/Horticulture/Diseases/18_11%20Cucumber%20green%20mottle; https://www.researchgate.net/publication/265902306_2013_Liu_CGMMV_IN_CUCUMBER/figures?lo=1; фото Фоминых Т.С.)

Кроме вируса зеленой крапчатой мозаики на огурце в теплицах также встречаются вирус мозаики огурца (ВОМ) – *Cucumber mosaic virus (CMV)* и вирус некроза табака (ВНТ) – *Tobacco necrosis virus A (TNV)* (*Tombusviridae-Alphanecrovirus*).

Вирус мозаики арбуза (ВМА) – *Watermelon virus (WMV2)*. Род *Potyvirus*, семейство *Potyviridae*. NCBI: txid146500.

Распространение. В России выявлен в Приморском крае на растениях тыквы, дыни и кабачка. Симптомы зарегистрированы также в Ростовской и Самарской областях на тыкве, дыне и кабачках до 10 % (рис. 12)

Симптомы. Наиболее характерным признаком является системная мозаика, крапчатость, тёмно-зелёное окаймление жилок, вздутия листовой пластинки, деформация и уродливость плодов (рис. 12) [51].

Эпифитотимология. Лишь некоторые виды *Cucurbitaceae* и *Leguminosae* инфицированы естественным путем, а растения из 17 семейств были инфицированы экспериментально. Передаётся тлями: персиковой – *Myzus persicae*, бахчёвой – *Aphis gossypii*, бобовой – *Aphis fabae* и др.

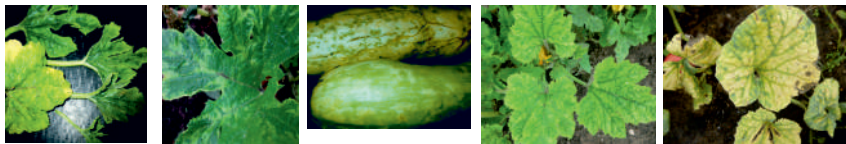


Рис. 12. Симптомы ВМА на кабачке, дыне и тыкве

Диагностика. Индикаторы: *Citrullus vulgaris* (системная полосатость жилок, мозаика и деформация листьев); *Cucurbita pepo* (межилковый хлороз, мозаика, зеленые вздутия и деформация листьев); ИФА, в том числе иммунострипы, ПЦР-праймеры: F: TTRTTGTTGAATGCTGTCCT и R: GCTGCACAAATGCCTCAG. https://www.researchgate.net/publication/330576627_Multiplex_RT-PCR_Identification_of_Five_Viruses_Associated_with_the_Watermelon_Crops_in_the_Brazilian_Cerrado.

Вирус жёлтой мозаики фасоли (ВЖМФ) – *Bean yellow mosaic virus (BYMV)*. Род *Potyvirus*, семейство *Potyviridae*. NCBI: txid12197.

Распространение. Распространён по всему миру. В Российской Федерации зарегистрирован в Московской области и на Дальнем Востоке.

Симптомы. На тыкве наблюдаются признаки яркой хлоротичной мозаики и сильной деформации листьев [51, 52].

Эпифитотиология. Легко передаётся контактом и тлями неперсистентно. Выявлен небольшой процент семенной передачи, зависящий от вида и сорта растения.

Диагностика. Растения-индикаторы, вирусные X-включения, ИФА, ПЦР. Для накопления вируса рекомендованы бобы конские, а для диагностики виды: *Phaseolus vulgaris* (эпинастии, локальные хлоротичные и некротические пятна, системная желтоватая мозаика, скручивание или деформация листьев и часто задержка роста); *Pisum sativum* (хлороз жилок, мозаика, иногда некротические полосы стеблей и жилок); *Vicia faba* (хлороз жилок, мозаика); *Chenopodium amaranticolor* (локальные хлоротичные пятна, пожелтение жилок и деформация листа) [53]. Праймеры для ПЦР: BYMV-pnsF (5'-TCAGATCAAGAGCAACTCAATGCA-3') and BYMV-pnsR (5'-GACGGATACTCTAAATACGAACA-3') <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4663705/>

Кроме выше охарактеризованных вирусов в Российской Федерации на овощных культурах в отдельных регионах распространены и

другие вирусы: вирус погрешности табака (ВПТ) – *Tobacco rattle virus (TRV)* (*Martellivirales – Virgaviridae – Tobravirus*), вирус некроза табака (ВНТ) – *Tobacco necrosis virus A (TNV)* (*Tolivirales – Tombusviridae – Alphanecrovirus*), Y-вирус картофеля (YBK) – *Potato virus Y (Patatavirales – Potyviridae – Potyvirus)*, вирус скручивания листьев картофеля (ВСЛК) – *Potato leafroll virus (PLRV)* (*Tolivirales – Luteoviridae – Polerovirus*), вирус желтой мозаики перца (ВЖМП) – *Pepper yellow mosaic virus (Patatavirales – Potyviridae – Potyvirus)*, X-вирус картофеля (ХБК) – *Potato virus X (PVX)* (*Tymovirales – Alphaflexiviridae – Potexvirus*), M вирус картофеля (МБК) – *Potato virus M (PVM)* (*Tymovirales – Betaflexiviridae – Carlavirus*), S вирус картофеля (SBK) – *Potato virus S (SBK)* (*Tymovirales – Betaflexiviridae – Carlavirus*), вирус мозаики цветной капусты (ВМЦК) – *Cauliflower mosaic virus (CaMV)* (*Ortervirales – Caulimoviridae – Caulimovirus*), вирус мозаики чеснока (ВМЧ) – *Garlic mosaic virus (GMV)* (*Tymovirales – Betaflexiviridae – Carlavirus*), вирус желтой карликовости лука (ВЖКЛ) – *Allium yellow dwarf virus (AYDV)* (*Patatavirales – Potyviridae – Potyvirus*), вирус желтой мозаики фасоли (ВЖМФ) – *Bean yellow mosaic virus (BYMV)* (*Patatavirales – Potyviridae – Potyvirus*), вирус мозаики турнепса (ВМТ) – *Turnip mosaic virus (TuMV)* (*Patatavirales – Potyviridae – Potyvirus*), вирус обыкновенной мозаики фасоли (ВОМФ) – *Bean common mosaic virus (BCMV)* (*Patatavirales – Potyviridae – Potyvirus*), вирус мозаики редиса (ВМР) – *Radish mosaic virus (RaMV)* (*Picornavirales – Secoviridae – Comovirus*), Вирус деформирующей мозаики гороха 1 (ВДМГ 1) – *Pea enation mosaic virus (PEMV-1)* (*Tolivirales – Luteoviridae – Enamovirus*), вирус обыкновенной мозаики гороха – *Pea mosaic virus, PMV* или *Pea seed-borne mosaic virus – (PSbMV)* (*Patatavirales – Potyviridae – Potyvirus*), вирус мозаики белого клевера (ВМБК) – *White clover mosaic virus (Tymovirales – Alphaflexiviridae – Potexvirus)*, вирус крапчатости красного клевера (ВКККл) – *Red clover mottle virus – (RCMV)* (*Picornavirales – Secoviridae – Comovirus*), вирус мозаики салата (ВМС) – *Letuce mosaic virus (LMV)* (*Tymovirales – Alphaflexiviridae – Potexvirus*), вирус шарки сливы (ВШС) – *Plum pox virus (PPV)* (*Patatavirales – Potyviridae – Potyvirus*), вирус мозаики сои (ВМС) – *Soybean mosaic virus (SMV)* (*Patatavirales – Potyviridae –*

Potyvirus), вирус морокканского перца (ВМП) – *Moroccan pepper virus (MPV) Tolvirales – Tombusviridae – Tombusvirus*), вирус мозаики шалота (ВМШ) – *Shallotvirus X (ShVX) (Tymovirales – Alphaflexiviridae – Allexivirus)*, вирус некротической пятнистости бальзамина (ВНПБ) – *Impatiens necrotic spot virus (INSV) (Bunyavirales – Tospoviridae – Orthotospovirus)* и некоторые другие [12, 14, 15, 54–64].

1.3. Болезни овощных культур, вызываемые фитоплазмами

К настоящему времени фитоплазмы выявлены в более 1000 видах растений из 100 семейств во всех странах мира. Они заселяют только флоэмные (и пограничные паренхимные) ткани растений, а также слюнные железы переносчиков, главным образом цикадок, псиллид и реже клопов. ФП относят к некультивируемым или трудно культивируемым бактериям, они не способны сохраняться в почве, воздухе или воде. Распространению способствуют вегетативные способы размножения заражённого посадочного материала, не исключается сохранение их в культуре тканей, а также перезаражение может осуществлять растение-паразит повилика – *Cuscuta sp.* Для некоторых фитоплазменных заболеваний в лабораторных исследованиях с использованием молекулярных методов показана возможность передачи заражения через семена томатов, люцерны, кокоса.

Признаки фитоплазмозов характерны для системных заболеваний растений группы желтух и характеризуются изменением окраски органов (чаще в жёлто-красную часть спектра) и их деформацией. Уменьшаются размеры отдельных органов или всего растения (карликовость), появляются ведьмины метлы (многочисленные побеги, растущие из одной точки), филлодия (листовые образования на месте лепестков), наблюдается обесцвечивание частей растения (листьев, стеблей, цветков) или виресценция (аномальное развитие зеленой пигментации цветков), стерильность, а также увядание и усыхание всего растения или его частей.

В России изучение генетического разнообразия фитоплазм начаты во ВНИИФ в 2006 г. и к настоящему времени фитоплазменная природа установлена для заболеваний 122 видов растений из 36 се-

мейств [65]. В нашей стране выявлено распространение 10 групп фитоплазм. Среди основных и массовых переносчиков фитоплазмозов генетическими методами выявлены следующие виды цикадовых: *Hyalosthes obsoletus*, *Pentastiridium leporinus*, *Macrosteles laevis*, *Empoasca pteridis* *Euscelis incisus*, потенциальными векторами могут быть также и другие флэоэнтопитающиеся виды цикадовых, псиллид и клопов.

В России выявлены фитоплазмы, принадлежащие к четырем группам по классификации, основанной на последовательности гена, кодирующего 16S рибосомальную РНК: группе желтухи астр – *Aster yellow group* (16SrI), X-болезни – *X-disease group* (16SrIII), пролиферации клевера – *Clover proliferation group* (16SrVI) и столбура – *Stolbur group* (16SrXII) были выявлены в 11 видах овощных культур: хрене обыкновенном – *Armoracia rusticana* L., эстрагоне – *Artemisia dracuncululus* L., перце стручковом – *Capsicum annuum* L., кориандре посевном – *Coriándrum sátivum* L., тыкке крупноплодной – *Cucurbita maxima Duchesne ex Lam.*, моркови посевной – *Daucus carota var. Sativus* (HOFFM.) SCHÜBL. & G.MARTENS, мелиссе лекарственной – *Melissa officinalis* L., петрушке кудрявой – *Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss, фасоли обыкновенной – *Phaseolus vulgaris* L., томате обыкновенном – *Solanum lycopersicum* L. и бобе садовом – *Vicia faba* L.

Фитоплазмозы томатов в России вызываются фитоплазмами группы столбура *Candidatus Phytoplasma solani* – 16SrXII-A, желтухи астр *Candidatus Phytoplasma asteris* – 16SrI-B, X-болезни – *Candidatus Phytoplasma pruni* и пролиферации клевера 16SrVI – *Candidatus Phytoplasma trifolii*.

Распространены повсеместно. К примеру, ареал заболеваний, вызываемых фитоплазмой столбура, охватывает южные районы и распространяется на север до Среднего Поволжья. В 2006-2020 гг. в стране фитоплазма, родственная виду ‘*Ca. P. solani*’, была выявлена у растений 51 вида, принадлежащих к 21 семейству. Фитоплазмы других групп могут иметь более широкий ареал.

К группе пролиферирующего характера относятся симптомы, которые проявляются в избыточном образовании пазушных побегов и пролиферации пестика в вегетативный побег. При этих типах столбура претерпевают качественные изменения цветки: измельчение, обесцвечивание и позеленение лепестков, разные формы раз-

растения чашелистиков цветка и срастание их в виде колокольчика (до 5 см величиной) или превращение их в редуцированные листья (рис. 13). При сильном пролиферирующем действии соцветие может превращаться в побег в виде ведьминой метлы. Видоизменившиеся цветки не образуют плодов, если плоды успели образоваться до проявления симптомов заболевания, они становятся ребристыми, жёсткими, с одревеснением тканей у основания плода.

Ко второй группе можно отнести форму столбура, подробно описанную в Астраханской области [66-68]. Больные растения характеризуются задержкой роста, утолщением и редукцией листовой пластинки, хлорозом и антоцианом, незначительным изменением и редукцией цветка, преждевременной гибелью растений. Такой тип поражения томатов, возможно, вызывается суровым штаммом фитоплазмы столбура, присутствием комплексной инфекции с другими агентами (вирусами, вириодами) в условиях высоких температур и при недостатке орошения. Увядание и усыхание больных растений может быть спровоцировано также поражением корней и сосудов грибными инфекциями, выявленными на картофеле и перцах.



Рис. 13. Изменения цветков, плодов и листьев при фитоплазменной инфекции томатов (фото Д.З. Богоутдинова)

Фитоплазмы сладкого перца в России вызываются ФП: групп желтухи астр 16SrI-B, X-болезни 16SrIII-B и столбура 16SrXII-A.

При поражении фитоплазмами верхние листья приобретают жёлто-зелёную или хлорозную окраску. Верхние листья измельчаются,

скручиваются и имеют гофрированную поверхность. Нижние листья скручиваются, становятся хлоротичными, возможно антоцианирование жилок. Цветки редуцируются, может наблюдаться слабое их позеленение и небольшое увеличение чашелистников. Чаще такие цветки усыхают и опадают [69]. Успевшие сформироваться плоды мелкие, обесцвеченные, уродливые, увядшие. Урожайность может снижаться до 100 %.

Фитоплазмы баклажана. Возбудители принадлежат к тем же группам, что и у других видов паслёновых. Заболевание проявляется первоначально на верхних листьях в виде их измельчения, гофрированности и скручивания. Листья могут отходить под острым углом к стеблю. В последующем весь куст приобретает тускло-жёлтую окраску, возможно антоцианирование жилок, листья теряют тургор, повисают или опадают. Цветки, как и у перца, претерпевают редукцию и опадают. Позеленение и израстание цветка – редкое явление. В итоге основание побега одревесневает и растение усыхает. Сформировавшиеся плоды мелкие обесцвеченные вялые, бессемянные, поролонообразной консистенции (рис. 14). Урожайность снижается до 100 %.



*Рис. 14. Признаки столбура на баклажане и перце
(фото В.Г. Паршина)*

Фитоплазмы крестоцветных культур. У разных видов капусты, а также редиса, редьки, репы, кресс-салата инфицирование фитоплазмами приводит к хлорозу листьев, антоцианированию жилок, уменьшению размеров листьев и всего растения, образованию пазушных побегов, а на цветках может появляться филлодия, виресценция и пролиферация. Кочаны, если успевают сформироваться, растрескиваются, но чаще вместо кочана образуется рыхлая розетка листьев (рис. 15).



Рис. 15. Симптомы поражения фитоплазмами разных видов капусты (фото Д.З. Богоутдинова)

Фитоплазмы тыквенных. Распространены в Среднем, Нижнем Поволжье и в Ростовской области. Симптомы характеризуются приземистым ростом, укорочением междоузлий, хлорозом и измельчением листьев, уменьшением и обесцвечиванием цветков, отсутствием завязывания плодов. В Самарской области на тыкве, инфицированной фитоплазмой из группы пролиферации клевера 16SrVI, в условиях хорошей влагообеспеченности отмечалась виресценция и филлодия цветка (рис. 16).



Рис. 16. Признаки поражения тыквы фитоплазмами: 1-3 – хлороз, измельчение листьев, пролиферация пазушных побегов и низкорослость тыквы (фото Д.З. Богоутдинов);

4 – проявление фитоплазма желтухи астр на тыкве (фото Т.А. Zitter, Cornell University) (http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/DiagnosticKeys/CucurLeaf/Aster/Aster_smrsq.htm)

В России признаки фитоплазменных заболеваний отмечены также и на других культурах. Следует отметить, что ещё в 1970-1990 гг. при электронно-микроскопических исследованиях в растениях с признаками фитоплазменного поражения кроме фитоплазм обнаруживались и другие флоэмные бактерии [70]. Применение современных генетических исследований позволяет уточнить их роль в патогенезе растений типа желтух.

Желтухи моркови (краснолистность). В России зарегистрированы фитоплазмы столбура и желтухи астр, поражающие морковь.

Симптомы характеризуются образованием желтых и красных листьев, измельчением новых листьев внутреннего кольца. Нередко отмечается образование не одного, а нескольких розеток листьев на корнеплоде. Корнеплоды меньшего размера, мягкие, с пониженным тургором. На поверхности корнеплода наблюдается разрастание чечевичек и образование волосков по всей поверхности корнеплода, что может проявляться более отчётливо в процессе хранения. Больные растения более склонны к образованию уродливых разрастаний (многохвостности) и образования узелков на волосках. Больные корнеплоды имеют плохие вкусовые качества и низкую сахаристость, на поверхности коры отмечается антоцианирование тканей (рис. 17).



Рис. 17. Признаки фитоплазмозов на моркове и петрушке
(фото Д.З. Богоутдинова)

Аналогичные симптомы фитоплазмы характерны и для других культур семейства зонтичных: кервеля, кориандра, любистока, петрушки, сельдерея, укропа, пастернака.

Желтухи свёклы. На красной свёкле отмечалось измельчение верхних листьев, их хлороз и множественность розеток листьев на

корнеплоде. Так же, как и на моркови, наблюдалось усиленное образование боковых тонких корней. Часто больные растения образуют ребристые корнеплоды. Во внутренней части корнеплодов по кольцам флоэмы может отмечаться образование некрозов и каверн. Больные корнеплоды уже в поле повреждаются грибными патогенами (рис. 18). В Самарской области было показано, что переносчик столбура – вьюнковая циксиида – предпочитает зимовать в корнеплодах свеклы.

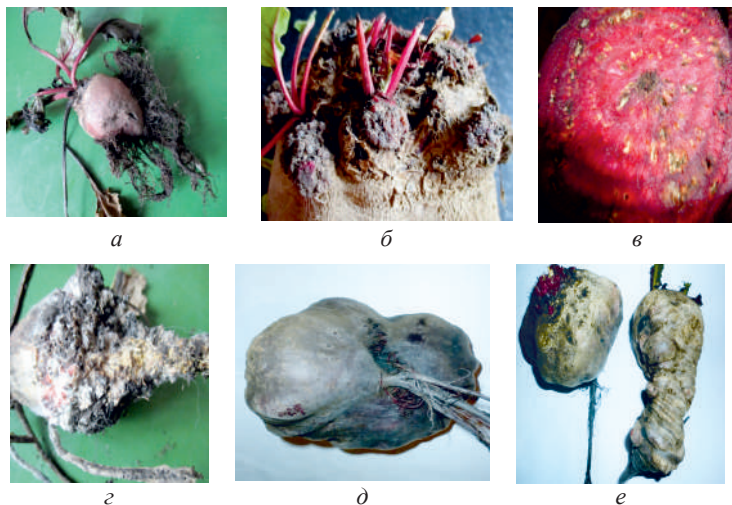


Рис. 18. Признаки заражения свёклы желтухой:
а – повышенное образование корневых волосков (бородатость);
б – образование множества розеток листьев;
в – некрозы и каверны в ткани корнеплода; г – сухая гниль корнеплода;
д – ребристость корнеплода; е – уродливость корнеплодов
 (фото Д.З. Богоутдинова)

Признаки заражения фитоплазмами и другими флоэмными бактериями трудно отличимы, чтобы определить их участие в патогенезе растений кроме электронной микроскопии требуется проведение ПЦР-диагностики.

Эпифитотиология. Ю.И. Власовым (1999) столбур паслёновых отнесён к типичным природно-очаговым заболеваниям [71]. Фитоплазмы циркулируют среди растений с помощью насекомых-пере-

носчиков, в организмах которых могут сохраняться в зимний период (корни многолетних растений, личинки и имаго цикадовых или псиллид).

1.4. Болезни овощных культур, вызываемые виридами

Вириды (Вд) представляют собой низкомолекулярные одноцепочные ковалентно замкнутые рибонуклеиновые кислоты, обладающие инфекционностью для ряда видов растений. Они имеют 220-457 нуклеотидов, в то время как геном самого мелкого известного вируса, способного вызывать патогенез, содержит 2000 пар оснований. Вириды не содержат и не кодируют белки. Имеют высокую устойчивость к внешним воздействиям и сильную контагиозность, для некоторых из них показана передача пыльцой и семенами. Установлено, что семена томата способны сохранять вириод веретеновидности клубней картофеля в течение 17 лет [69]. Исследователями НИИ фитопатологии инструментально установлено, что вириод сохраняет инфекционность в сухих листьях и семенах более 20 лет [72]. Для вириода картофеля выявлена возможность переноса некоторыми видами насекомых. В Самарской области Б.С. Герасимов (1971) показал возможность передачи вириода цикадкой *Pentastiridius leporinus* L. и клопами [73].

Заболевание у растений при вириодной инфекции может протекать латентно и с проявлением визуальных признаков. Оно сопровождается анатомическими изменениями паренхимных клеток и проводящих тканей, разрушением их клеточных стенок и мембран, что приводит к нарушению ритмичности работы устьиц, фракционного состава воды в листьях, замедлению оттока ассимилянтов. Под влиянием ВВКК в листьях картофеля и томатов уменьшается содержание зеленых пигментов, а количество каротиноидов увеличивается. ВВКК также влияет на накопление крахмала в хлоропластах и на деформацию оболочки хлоропластов [74]. Выявленные внутриклеточные изменения влияют на характер патологических изменений растений, проявляющиеся карликовостью, деформациями и эпина-

ствиями, что обусловлено нарушениями метаболизма и баланса ростовых веществ. При поражении вириодом экзокортиса цитрусовых в растениях индуцируется синтез ауксиноподобных веществ, снижается уровень эндогенных гиббереллинов. Одновременно изменяется уровень других гормонов: абсцизовой и индолилуксусной кислот. В России распространён повсеместно.

Вириодозы томата и других овощей. На томатах известно распространение семи вириодов: *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Columnea latent viroid* (CLVd), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TC-DVd), *Tomato planta macho viroid* (TPMVd) и *Hop stunt viroid* (HSVd). До 2018 г. в России был идентифицирован только один вид ВВКК, способный поражать томаты. В 2018 г. в бессимптомных растениях картофеля сорта Невский (Нижний Новгород) и сорта Королева Анна (Новгород) выделен вириод приостановки роста хризантем *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd). Транскрибированная к ДНК CSVd РНК оказалась способной заражать растения картофеля, томатов и хризантем. Искусственно заражённые картофель и томаты были бессимптомными [75].

Вириод веретеновидности клубней картофеля на томате – *Potato spindle tuber viroid* – PSTVd. Род *Pospiviroid*, семейство *Pospiviroidae*, 357-361 нуклеотидов.

Распространение и вредоносность. ВВКК в производственных посадках томатов изучен недостаточно.

Симптомы. Приостановка роста до карликовости, скручивание листьев, укорочение верхних междоузлий и измельчение верхних листьев, их эпинастии и морщинистость (рис. 19). Окраска листьев варьирует от слабого посветления до хлороза, при резких изменениях условий погоды может отмечаться антоциан жилкок. За рубежом также отмечены некрозы на листьях и других органах. На заражённых томатах формируются мелкие немногочисленные плоды, может отмечаться бессемянность.

Эпифитотиология: контактная и семенная передача, возможно участие насекомых в переносе инфекции и наличие растений-резервуаров, в том числе бессимптомных.



а

б

в

Рис. 19. Симптомы вирусного поражения (укорочение верхних междоузлий, измельчение, хлороз верхних листьев, скручивание листьев и антоциан жилок томата:

а – сорта *Poire* через три недели после исхлестывания побегами картофеля, инфицированного ВВКК

(Богоутдинов Д.З., 2005);

б – сорта *Волгоградский 5/95* (Леонтьева Ю.А., 1970);

в – изменение симптомов от карликовости и измельчения листьев до незначительного снижения роста при заражении суровым штаммом ВВКК RG-1, промежуточным (*intermediate*) и мягким (*mild*)

(США, рSTVon Tomatoplants; <https://www.apsnet.org>)

Диагностика вирусных заболеваний томатов и других овощных культур основана на индикаторном методе и ПЦР-анализе с использованием специфических праймеров: CCCTGAAGCGCTCCTCCGAG и ATCCCCGGG GAAACCTGGAGCGAAC. https://www.researchgate.net/publication/259136171_Detection_of_potato_spindle_tuber_viroid_PSTVd_in_minute_amounts_of_Potato_Solanum_Tuberosum_L_leaf_tissue_by_hybridization_techniques_and_together_with_potato_viruses_by_multiplex_RT-PCR.

Вирус карликовости верхушки томата – *Tomato bunchy top viroid* (молекулярно не охарактеризован).

Распространение. Зарегистрирован в 1998 г. на юге Приморского края в тепличном хозяйстве [76].

Симптомы отмечались в январе-феврале на главных и боковых нижних листьях в виде белых точек, которые разрастались вдоль жилок, приобретая тёмно-коричневую окраску и некротизировались. Листья вытягивались, а листовая пластинка закручивалась вниз. Цветки приобретали бледно-жёлтую окраску, часть цветка срасталась, образуя бутон.

Эпифитотиология. Доказана передача семенами, пыльцой, механически и прививкой [66].

Диагностика: метод растений индикаторов, ПЦР.

Бледноплодность огурца *Cucumbers pale fruit viroid (CPFVd)*.

Род *Hostuviroid*, семейство *Pospiviroidae*, штамм *Hop stunt viroid (HSVd)*, 297, 303 нуклеотида.

Распространение и вредоносность. Эпизодически вредит в теплицах на некоторых гибридах огурца, преимущественно на партенокарпических длинноплодных. В России молекулярно не охарактеризован [38].

Симптомы включают в себя голубовато-зелёную окраску и морщинистость листьев, с отчётливой пузырчатостью, по мере их старения морщинистость исчезает, появляется хлороз. Междоузлия у таких растений короткие, цветки мелкие (рис. 20). Плоды небольших размеров, часто грушевидные, бледной окраски, имеют расплывчатые жёлтые или белые пятна, причём сами плоды не деформируются [77]. Заболевание появляется в теплицах обычно в начале резкого увеличения температуры воздуха в весенне-летний период. Пожелтение плодов может происходить не только на растениях, но и на складе готовой продукции.

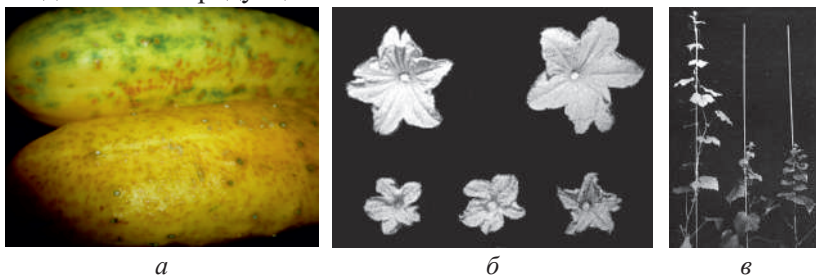


Рис. 20. Признаки бледноплодности огурца: а – поэтапное пожелтение от бледно-зелёного до жёлтого в период хранения, при отсутствии мозаичности листьев (Самарская область, 2014);

б – измельчение и обесцвечивание цветков;

в – укорочение междоузлий и измельчение листьев

Эпифитотиология определяется способностью вирида передаваться экспериментально семенами и контактом. Не выявлена передача насекомыми и через растительные остатки. Резерваторами ви-

роида может быть широкий круг растений — резерваторов вириода приостановки роста хмеля [44].

Диагностика с использованием растений-индикаторов и ПЦР. В качестве тест-растения рекомендована восковая тыква *B. hispida*, проявляющая следующие ранние симптомы: угнетение роста, пожелтение жилок, хлороз и некроз верхушки. Праймеры для ПЦР: HSV-78P (5'-AACCCGGGGCAACTCTTCTC-3', и HSV-83M (5'-AACCCGGGGCTCCTTCTCA-3') <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5733102/>

2. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ПАТОГЕНОВ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР

Диагностика болезней растений – это различные этапы и приемы определения вида возбудителя, являющегося причиной изучаемого заболевания. Диагностика основывается на свойствах патогена и на материалах наблюдений за развитием заболевания.

Основные методы диагностики: визуальный; установление способа передачи инфекции (контактный, прививкой, насекомыми, клещами, грибами, нематодами); биологическое тестирование на растениях-индикаторах; метод включений; анатомо-цитологический; электронная микроскопия; серологический; молекулярно-генетический.

2.1. Визуальный метод

Диагностика болезней по внешним симптомам – прием вспомогательный, позволяющий сделать предварительное представление о природе болезни. Но данный метод очень важен для выбора комплекса диагностических методов.

По разнообразию симптомы, например, для вирусных, вириодных и фитоплазменных болезней можно условно разделить на четыре типа:

- задержка роста;
- изменение окраски различных органов;
- изменение формы и размеров органов;

- поражения некротического типа.

В результате задержки роста междоузлий растения могут приобретать «карликовый» вид (*Cucumber mosaic virus* (CMV), *Potato leafroll virus* (PLRV), *Tomato aspermy virus* (TAV)).

Изменение окраски проявляется чаще всего мозаичной расцветкой, различными пятнистостями и узорами (кольца, полукольца, извилистые рисунки, дубовидные, линейные узоры и др.) (*Watermelon mosaic virus 2* (WMV), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) *Pepino mosaic virus* (PepMV)).

Деформации различных органов наглядно проявляются при поражении *Cucumber mosaic virus* (CMV) комплексом вирусов, в том числе вирусом мозаики томата *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) и др. Другой формой отклонений от нормального роста является образование выростов (так называемых энаций) на верхней и нижней поверхности листа (*Pea enation mosaic virus* (PEMV)). Наиболее яркие типы деформаций отмечаются у ВВФ группы желтух. Деформация может быть также характерна и для виридов, например, при поражении томата отмечается кустистость верхушки, измельчение листьев и плодов [43, 66, 68, 78].

Некрозы при вирусном заражении возникают, как правило, у устойчивых растений, у которых формируется гиперчувствительный ответ (HR), сопровождающийся запрограммированной гибелью клеток и как следствие ограничение размножения вирусов. Некрозы могут иметь локальный (в месте внедрения вируса) и системный характер, приводящий к гибели растения. Примерами могут служить вирусы табачной (ВТМ) и томатной мозаики (ВМТо), Х и У- вирусы картофеля (ХВК, УВК), вирус мозаики сои (ВМС), вирус мозаики люцерны (ВМЛ), вирус чёрной кольцевой пятнистости томата (ВЧ-КПТ), вирус бронзовости томата (ВБТ), вирус кольцевой пятнистости томата (ВКПТо) и многие другие.

2.2. Метод растений-индикаторов

Индикаторным называют растение, которое дает четкую и типичную реакцию на заражение возбудителем, сравнительно легко отличимую от реакции этого же вида растения на другие патогены.

Например, *Nicotiana glutinosa* L. является тест-растением на вирус табачной мозаики *Tobacco mosaic virus* (TMV). В ответ на заражение этим вирусом через два-три дня на инокулированных листьях развиваются локальные некротические пятна. *N. glutinosa* заражается и другими вирусами, но реакция на ВТМ является специфичной.

Как правило, для точного определения какого-либо вируса этим методом применяется заражение двух-трех видов растений-индикаторов. Нередки и такие случаи, когда один и тот же индикатор пригоден для диагностики нескольких вирусов.

Метод растений-индикаторов пригоден при диагностике смешанных инфекций, для выделения отдельных патогенов и при определении концентрации вирусов методом биологического титрования (в этом случае используются тест-растения с локальной реакцией на вирус). В настоящее время в качестве индикаторов используется свыше 600 видов растений, относящихся к 43 семействам и 175 родам. Примеры видов растений-индикаторов и их реакции на заражение вирусами даны в охарактеризованных выше заболеваниях.

2.3. Метод включений

Наиболее характерным цитопатологическим признаком при репродукции некоторых фитовирусов служит возникновение специфических образований, так называемых *включений*. Это явление легло в основу диагностического метода по внутриклеточным вирусным включениям, дающего возможность достаточно простого (при световой микроскопии) выявления вируса табачной мозаики (ВТМ), вирусов бобовых культур, вируса зеленой крапчатой мозаики огурца (ВЗКМО) и др. Метод включений может быть также применен для обнаружения заболеваний в латентной форме, при дифференциальной диагностике различных штаммов вирусов (например, ВТМ) и смешанной вирусной инфекции. У некоторых вирусов включения могут быть выявлены только на ультратонких срезах в электронный микроскоп. Описано около 100 фитовирусов, которые можно диагностировать по включениям.


Природа и состав вирусных включений изучены недостаточно. Существуют четыре основных типа внутриклеточных включений:

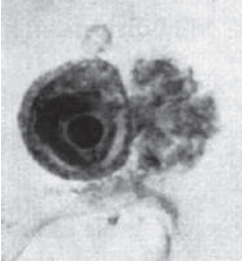
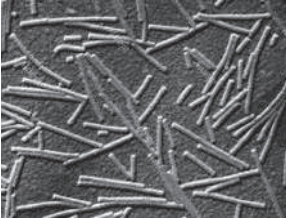
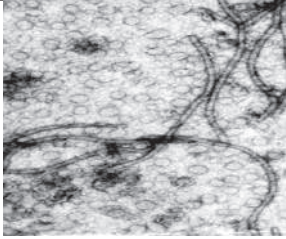
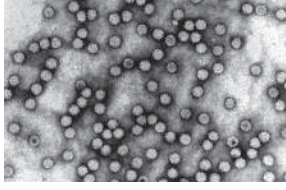
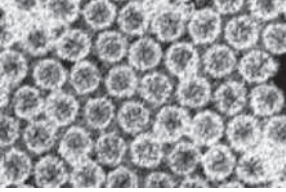
- кристаллические включения, видимые в световой микроскоп и состоящие в значительной степени из более или менее правильно расположенных вирусных частиц;
- аморфные включения, тоже видимые в световой микроскоп, но помимо вирусных частиц содержащие также некоторые компоненты клетки растения-хозяина;
- включения, состоящие исключительно из клеточных органелл;
- включения, наблюдаемые только под электронным микроскопом и содержащие вирусный структурный белок или не идентифицированный белок, упакованный в виде волокон, трубочек, колесиков [43, 66, 68, 78].

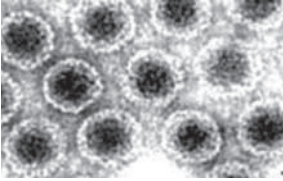
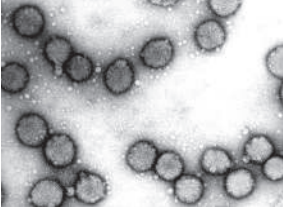

Формы кристаллических включений разнообразны. Нередко один и тот же штамм вируса способен на одном растении образовывать включения различной формы. В качестве примера можно назвать вирус гравировки табака, который образует зернистые включения в цитоплазме и кристаллические – в ядре, штаммы ВТМ, дающие при поражении кристаллы и аморфные образования, и др. (табл. 6). Морфологически Х-тела (аморфные включения) могут быть гомогенными, плотными, без вакуолей (вирусы курчавости верхушки сахарной свеклы, американской мозаики озимой пшеницы) или рыхлыми, содержащими одну или несколько вакуолей (некоторые штаммы ВТМ, вирусы бронзовости томата (ВБТ)). Чаще всего внутриклеточные включения возникают в цитоплазме (изредка в ядрах) в различных тканях и органах растения: листьях, стеблях, корнях, цветках.

Таблица 6

Включения вирусов при световом, их вирионы и фитоплазма при электронном микрофотографировании

Гексагональный вирусный кристалл вируса табачной мозаики – <i>Tobacco mosaic virus</i> (ТМВ) (слева) и клеточное ядро (справа) в клетке волоска табака <i>N. tabacum</i> . Метка соответствует 6 мкм		http:// www.dpvweb.net/ dpv/ showfig.php?dpv-no=151&figno=03
--	---	--

<p>Фото кристаллов в ядре и цитоплазматических включений в эпидермальной клетке табака, инфицированного вирусом гравировки табака (ВТГ) – <i>Tobacco etch virus</i> (TEV) (×1200)</p>		<p>http:// www.dpvweb.net/dpv/showfig.php?dpv-no=55&figno=07</p>
<p>Палочковидные вирионы вируса табачной мозаики <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV), размер вириона 300×18 нм, электронная трансмиссивная микроскопия</p>		<p>https:// www.alamy.com/stock-photo-tobacco-mosaic-virus-tem-134945427.html</p>
<p>Нитевидные вирионы вируса хлороза томата <i>Tomato chlorosis virus</i> (TCV), размер 800-850 нм, электронная микроскопия</p>		<p>(Photo courtesy K. Schlueter, USDA) http:// progressivecrop.com/ 2020/ 07/ virus-pathogens-challenges-to-the-health-of-vegetable-crops/</p>
<p>Изометрические вирионы вируса кустистой приостановки роста <i>Tomato bushy stunt virus</i> (TBSV), диаметр 30 нм, электронная микроскопия</p>		<p>http:// bio-mirror.im.ac.cn/ mirrors/ pvo/ vide/ images/ c7.jpg</p>
<p>Изометрические и бациловидные вирионы вируса огуречной мозаики <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) размер 26-35 нм, электронная микроскопия</p>		<p>https:// link.springer.com/ reference-workentry/ 10.1007/ 978-0-387-95919-1_26</p>

Изометрические вирионы вируса мозаики цветной капусты <i>Cauliflower mosaic virus</i> (CaMV), диаметр 52 нм, электронная микроскопия		https:// en.wiki- pedia.org/ wiki/ Cauliflower_mosa- ic_virus
Изометрические вирионы вируса пятнистого увядания томата <i>Tomato spotted wilt orthotospovirus</i> (TSWV), диаметр 80-120 нм, электронная микроскопия		http://ephytia.inra. fr/en/C/10818/ Tobacco-Toma- to-spotted-wilt-vi- rus-TSWV
Овальные, гантелевидные, округлые фитоплазменные тела размером 100-600 нм электронная микроскопия		Фото Самсоновой Л.Н. (1980)

При изучении фитоплазм в лабораторных исследованиях применяется метод окраски флоэмы растений по Динесу и метод культивирования на искусственных жидких и твёрдых питательных средах, позволяющие содержать коллекции фитоплазм и изучать свойства бактериоцидов и другие вопросы [43, 66, 68, 78].

2.4. Методы электронно-микроскопического анализа

Вирусные частицы вследствие малых размеров почти прозрачны для электронов и слабо их рассеивают, для того чтобы изображение вирионов было четко видимым, используются контрастирование вирусных препаратов при их приготовлении – напыление металлом (хром, вольфрам, золото, платина и др.) или так называемое негативное контрастирование с помощью химических соединений (фосфорновольфрамовая кислота – ФВК, вольфрамат натрия, молибденово-кислый аммоний и др.).

При диагностике фитовирусов необходимо определить форму и размер вирионов, для чего следует, как показали исследования ряда

авторов, измерить не менее 100 вирусных частиц. Распределяя затем размеры вирионов по классам, определяют величину, наиболее часто встречающуюся, которую принимают за типичные размеры исследуемого вируса.

При приготовлении вирусных препаратов в качестве предметных стекол, на которые обычно помещают объект исследования, используются специальные сетки диаметром 2-3 мм (в зависимости от типа микроскопа), покрытые пленкой-подложкой из коллодия или формвара, препараты готовят методами погружения, разбавленной суспензии, приготовления препаратов лабильных вирусов.

Для повышения чувствительности микроскопии при низкой концентрации вирионов применяют метод *иммуноэлектронной микроскопии*. Иммуномикроскопический метод применяется в трех вариантах: исследуют образцы, приготовленные из смеси вирус-антисыворотки; препарат с адсорбированными на плёнке подложки вирусными частицами, а затем обработанные антисывороткой; сеточки обрабатывают антисывороткой, а затем их помещают на вирусную суспензию сока растений для связывания с антителами.

Для электронной микроскопии лабильных вирусов и фитоплазм ткани растения с симптомами предварительно фиксируют в смолах, а в электронном микроскопе смотрят окрашенные ультратонкие срезы этих тканей. Этот метод также позволяет определить смешанную инфекцию фитоплазм, спироплазм, других бактерий и вирусов, что является необходимым при отсутствии возможности применения иммунного или генетического мультиплексных анализов.

Если развитие мицелия слабое, то для выявления и определения возбудителя применяется закладка растений или их частей во «влажные камеры» для интенсификации прорастания мицелия и определения патогена по характерным морфологическим признакам. Бывает, что патогены находятся в растительном организме в скрытой форме или дают сходные симптомы поражения, развивают однотипный мицелий, в таких случаях применяются инструментальные серологические или молекулярные методы, дополненные выделением подзреваемого возбудителя в чистую культуру, и подтверждение патогенности исследуемых микроорганизмов правилами Роберта Коха (Триада Коха) [43, 66, 68, 78].

Использование данных методов позволяет разрабатывать для практического использования системы надзора за болезнями. В Центральном Сибирском ботаническом саду СО РАН и Новосибирском ГАУ исследовали в условиях необогреваемой пленочной теплицы на юге Западной Сибири состав возбудителей и степень поражения болезнями прорастающих семян, растений коллекции вигны из ВНИИ имени Н.И. Вавилова и биоресурсной научной коллекции ЦСБС СО РАН УНУ № USU 440534, включающей в себя 87 сортообразцов. Зараженность семян определяли по ГОСТ 12044-93 методами микологического анализа на универсальных питательных средах Чапека и КДА и «влажной камеры». Этиологию пятнистостей и гнилей устанавливали методами прямого микроскопирования и «влажной камеры» [79]. В результате были сформированы методические рекомендации по защите растения от болезней на основе фенологии.

2.5. Методы серодиагностики

Методов серодиагностики основаны на иммуногенных и антигенных свойствах возбудителей, имеющих белок, и позволяют установить вид патогена, определить концентрацию и локализацию возбудителя в клетках и тканях растений. Серодиагностика широко применяется в фитопатологии для диагностики вирусных, фитоплазменных, бактериальных и грибных заболеваний.

Получение антисывороток. Диагностические сыворотки можно получить, вводя очищенный препарат вируса в организм различных видов животных. Очищаются фитопрепараты методами дифференциального центрифугирования. В зависимости от вида патогена варьируют и схемы введения антигена животным. После завершения цикла инъекций у животного берут кровь для получения из нее сыворотки, которую после соответствующей обработки разливается по ампулам и подвергается лиофильной сушке [43, 66, 68, 78].

Капельный метод. Получил широкое практическое применение в XX в. В ходе исследования на стекло наносят каплю диагностической сыворотки и каплю нормальной (контрольной) антисыворотки (из крови животного, не подвергавшегося введению антигена). К ка-

ждой из них добавляют по капле сока из анализируемого растения, после чего капли смешивают и выдерживают во влажной камере при температуре 22 °С в течение 40 мин. Нормальная сыворотка служит контролем. Реакция считается положительной, если в капле с анти-сывороткой виден четкий осадок, отсутствующий в капле с нормальной сывороткой (рис. 21а). Для чтения реакции используется бинокулярная лупа с увеличением в 20-25 раз [43, 66, 68, 78].

Энзимосвязанный иммуносорбентный тест (ELISA-тест, ИФА) – высокочувствительный серологический метод, в основе которого лежит использование связанных с энзимами антител для определения специфических антигенов (белков возбудителей). Основные области использования ELISA в фитопатологии – детекция и количественное определение патогенов в растениях, почве или других образцах, выявление инфицированных растений до появления симптомов заболевания, а также отбор здоровых семян или посевного материала. Относительно простой и недорогой иммуноанализ быстро сделал эти методы популярными. Количество тестов ELISA, используемых для обнаружения сельскохозяйственных патогенов во всем мире, достигает 10 млн в год [80, 81].

В качестве энзимов используют щелочную фосфатазу с ее субстратом п-нитрофенил фосфатом или пероксидазу. Принцип метода состоит в следующем:

- антитела, специфичные для определенного вида возбудителя, адсорбируются на специальных пластиковых пластинах с углублениями-колодцами (0,5 мм). С этой целью в колодцы добавляют раствор у-глобулиновой фракции антисыворотки;
- после инкубирования неадсорбированные антитела отмывают и затем добавляют сок больного растения. Если вирус присутствует в соке, он будет реагировать с адсорбированными антителами и, таким образом, связываться с пластинкой;
- затем в колодцы добавляют раствор, содержащий антитела, связанные с энзимом. Если вирус находится в колодце, то он связывается с энзимом. При промывании удаляется несвязанный конъюгат и в колодец добавляют энзимный субстрат.

После инкубационного периода измеряют активность энзима. Количество гидролизата прямо пропорционально количеству возбуди-

теля. Интенсивность окраски также пропорциональна концентрации вируса (рис. 21б).

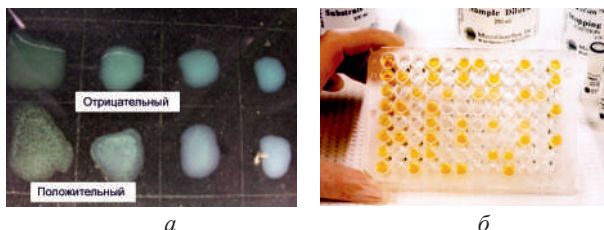


Рис. 21. Капельный метод (а) – первая капля во втором ряду с образованием хлопьевидного осадка свидетельствует о наличии в образце вируса, специфичного к данной антисыворотке (<http://science-fund.kz/o-fonde/nashi-proekty/2017/razrabotka-i-organizaciya-proizvodstva-roz-bengal-antigena-dlya-plastinchatoj-reakcii-agglyutinacii-pri-diagnostike-brucelleza-zhivotnyh>); микроплашет ИФА (ELISA) (б) – цветные лунки указывают на реактивность, чем интенсивнее цвет, тем выше реакционная способность и концентрация вируса (<https://virology-online.com/general/Tests.htm>)

Твердофазный иммуноферментный анализ ELISA получил заслуженное признание в диагностической фитопатологии. Разновидности ИФА могут быть отнесены к гомогенным или гетерогенным, в зависимости от того, где происходит специфическое взаимодействие «антиген-антитело». При гомогенном анализе все стадии, включая ферментативную реакцию, происходят в растворе. Гетерогенный вариант анализа предполагает разделение свободного и иммунохимически связанного иммунореагента (антигена, антитела) на твердой фазе с помощью иммобилизованных на ней комплементарных реагентов, соответственно, антитела и антигена.

Среди вариантов ELISA различают конкурентные и неконкурентные. Отличительными чертами конкурентного варианта является одновременное присутствие на первой стадии анализа антигена из анализируемого образца и меченого антигена, а также их конкуренция за соединение с ограниченным числом сайтов связывания на антителах. Конкурентный ELISA применяется для диагностики фитопатогенов, но не является широко распространенным, поскольку в качестве иммуногенов в фитопатологии часто используют не ин-

дивидуальные антигены, в которые можно ввести метку, а их смеси или просто экстракты.

ELISA называют прямым или непрямым в зависимости от типа антитела, маркированного ферментом. В прямом варианте метода определяемый антиген обнаруживают конъюгатом гомологичных (полученных к данному антигену и специфичных к нему) антител. В непрямом ELISA для связывания целевого антигена используют немеченые гомологичные антитела (ABs1), а затем образовавшийся комплекс «антиген-антитело» детектируют с помощью ферментных конъюгатов других (вторичных, или антивидовых) антител, которые получены против ABs1.

Различают варианты ELISA в зависимости от типа фермента и субстрата (колориметрический, флуориметрический, биолюминесцентный ELISA) или от способа измерения ферментативной активности [82].

На фоне питиозного поражения корней и плодов в защищённом грунте часто развивается фузариоз. Диагностика комплексного заболевания сложна. Обычно доминирует один из возбудителей, его выявляют и назначают средства защиты, другие часто остаются незамеченными. Кроме того, в последние годы на огурце прогрессирует новая болезнь увядания – акремониоз (возбудитель *Acremonium strictum*). Средства химической борьбы с комплексными заболеваниями не эффективны. Время для защиты от другого патогена часто бывает упущено и растения погибают, а инфекция переносится на соседние.

Для срочной идентификации патогенного комплекса сотрудниками ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» разработана и апробирована на практике модель биомониторинга ранней зараженности грибными заболеваниями различных видов овощных культур в условиях защищенного грунта с помощью ИФА-анализа системы культур. Также для оздоровления зараженного посадочного материала овощных культур специалистами центра предложено использовать иммунодиагностику, включающую в себя выбраковку больного материала, с помощью полученных в центре антител к конкретно доминирующему возбудителю грибных заболеваний фитопатогену *Fusarium oxysporum* в

условиях защищенного грунта на территории Орловской области [83-89].

*Методика проведения
предложенного иммуноферментного анализа*

Для проведения анализа использовали стерильные планшеты Терассаки на 96 лунок с адгезивным покрытием и U-образным дном. Готовили антитела 200 мг/л, нагружали по 100 мкл каждую лунку планшета, инкубировали 2 ч при температуре 4 °С, в атмосфере с 5 % CO₂. Троекратно отмывали 300 мкл раствора NaCl (0,15 М) и 7 раз дистиллированной водой.

Вносили по 100 мкл раствора бычьего сывороточного альбумина (10 г/л) в 0,01М фосфатном буферном растворе, содержащем NaCl (0,15М) и ТВИН 20 (0,05% w/v), pH 7,3±0,1, инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Промывали по той же схеме.

Подготовленные аликвоты доводили до комнатной температуры. В лунки планшета вносили 25 мкл контрольных и опытных образцов, инкубировали 1 ч при температуре 37 °С на термостатируемом шейкере с частотой встряхивания 650 раз/мин, троекратно отмывали 300 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ-Т, «Вектор Бест»).

Вносили 100 мкл раствора конъюгата, меченного пероксидазой хрена, инкубировали 30 мин при температуре 37 °С на термостатируемом шейкере с частотой встряхивания 650 раз/мин. Несвязавшийся конъюгат декантировали, лунки планшета отмывали фосфатно-солевым буфером троекратно по 300 мкл.

Вносили 100 мкл хромогена в субстратно-буферном растворе (ТМБ+СБР, «Вектор Бест»), инкубировали 15 мин при комнатной температуре в темном месте. Добавляли 100 мкл HCl 1N (Стоп-реагент, «Вектор Бест») для остановки реакции. Измеряли оптическую плотность при длине волны 450-620 нм против холостой пробы на планшетном фотометре Multiscan EX [3, 6].

Расчет критической и оптической плотности (Cut off) проводили по уравнению

$$\text{Cut off} = A \cdot K^- + B \cdot K^- + C \cdot KK + D.$$

При наличии в растительном материале антигенов исследуемого фитопатогена реакционная смесь становится окрашенной, тогда

как образцы здоровых растений остаются прозрачными. Изменение окраски и её интенсивность прямо пропорциональна количеству антигена в растительном материале (рис. 22).



Рис. 22. Пластиет с исследуемыми образцами

Усиленное образование активных форм кислорода АФК является одной из ранних реакций растения на повреждающее воздействие. Специфическим ферментом, препятствующим повреждающему влиянию супероксиданион-радикала кислорода на биологические структуры, является супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1) [83-89].

Основываясь на том, что супероксиддисмутаза играет важнейшую роль одного из главных представителей антиоксидантной системы защиты живых организмов, сотрудниками ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» была разработана тест-система биомониторинга ранней зараженности грибными заболеваниями различных сортов овощных культур в условиях защищенного грунта на различных этапах вегетации с помощью иммуноферментных методов анализа и биохимического тестирования (активности фермента супероксиддисмутазы).

Активация СОД при неблагоприятных воздействиях является ответом на увеличение продукции радикалов супероксида в этих условиях, что обеспечивает защиту клеток и тканей растений от окислительных повреждений. Активность СОД при этом изменяется разнонаправлено: в одних случаях возможно ее увеличение, в других – снижение, в зависимости от напряженности действия стрессовых факторов, этапов вегетации растения и др. [90].

Поскольку гидроксильные радикалы, синглетный кислород активно окисляют белковые молекулы, специфических ферментов-де-

заактиваторов данных АФК не существует, уровень их в клетке опосредованно регулируется СОД путем инактивации супероксидных радикалов – источника их образования. По этой причине СОД является первичной линией защиты от окислительных повреждений, обрывая окисление клеточных макромолекул еще на стадии иницирования [91].

Определение активности супероксиддисмутазы. Для определения активности супероксиддисмутазы была использована модифицированная методика [83, 92].

Растительный материал измельчали с 25 мл фосфатного буферного раствора рН 7,8 и центрифугировали с частотой 7000 мин⁻¹ в течение 15 мин, затем отделяли надосадочную жидкость. Анализ проводили методом фиксированного времени. Реакционная среда объемом 2,5 мл содержала 50 мМ фосфатного буфера с рН 7,8, 13 мМ L-метионина, 75 мкМ нитросинего тетразолия, 2 мкМ рибофлавина, 0,1 мМ ЭДТА и 0,5 мл экстракта СОД. Рибофлавин добавляли в последнюю очередь и размещали контрольные и опытные пробирки в фотореакторе. Через 15 мин реакцию прекращали, выключая лампу фотореактора, затем измеряли оптическую плотность растворов на спектрофотометре Spekol 11 при длине волны 560 нм. Необлученная реакционная смесь не окрашивалась и служила базовой линией для спектрофотометра. Активность СОД рассчитывалась по формуле и выражена в единицах оптической плотности на 1 г сырой массы:

$$A_{\text{СОД}} = \frac{\bar{D}_{\text{контр}} - \bar{D}_x}{\bar{D}_{\text{контр}}} \cdot \frac{V_{\text{реакц смеси}} \cdot V_{\text{экстракта}}}{V_{\text{для реакц}} \cdot m_{\text{навески}}},$$

где $A_{\text{СОД}}$ – активность супероксиддисмутазы;

$\bar{D}_{\text{контр}}$ – среднее арифметическое из оптических плотностей контрольных растворов;

\bar{D}_x – среднее арифметическое из оптических плотностей растворов с содержанием экстракта;

$V_{\text{реакц. смеси}}$ – общий объем реакционной смеси;

$V_{\text{экстракта}}$ – общий объем экстракта;

$V_{\text{для реакции}}$ – объем экстракта, взятого для реакции;

$m_{\text{навески}}$ – масса навески биологического материала.

● Экспресс-метод ИФА (иммунострипы)

Для быстрого выявления различных болезней растений созданы тест-системы, с помощью которых в полевых условиях можно подтвердить наличие инфекции. Подобное оборудование уже с 1981 г. выпускает американская фирма Flashkits Agdia Inc. (США). Алгоритм диагностики включает в себя выделение сока из части листа (0,15 г) исследуемого растения в емкость; погружение иммунострипа на 0,5 см до метки «sample» в сок; ожидание результата в течение 5-30 мин [84, 92]. По мере выполнения теста появляются одна или две полоски, указывающие соответственно на отрицательный или положительный результат (рис. 23).



Рис. 23. Тестирование растительного материала на наличие вирусов группы Y-вируса картофеля с помощью тест-системы Flashkits:

Negative Result — отрицательный результат (инфекции нет);

Positive Result — положительный результат

(окрашивание двух полосок свидетельствует о наличии вируса)

(<http://www.agdia-biofords.com>)

Для диагностики патогенов на овощных культурах Agdia предлагает самый большой ассортимент коммерческих тест-систем на определение более 40 наиболее вредоносных фитовирусов и вирида веретеновидности клубней картофеля, их штаммов и групп [93].

Для экспрессного определения фитовирусов во внелабораторных условиях в МГУ разработан новый метод виробактериальной агглютинации (АБВ-тест), основанный на коагглютинации вирусных частиц и протеина А из клеток стафилококка *Staphylococcus aureus*, покрытых антителами к вирусу. Совместно с Институтом биохимии имени А.Н. Баха РАН впервые в России разработана технология получения мультимембранных композитов (тест-полосок) для внела-

бораторной диагностики вирусов растений методом иммунохроматографии, основанным на использовании поликлональных антител к вирусам и частиц коллоидного золота в качестве маркера.

Отечественные иммунохроматографические тест-системы для визуальной экспресс-диагностики вирусных инфекций картофеля на поликомпонентных мембранных тест-полосках разрабатывали кафедры вирусологии биологического факультета МГУ, ИФХБ имени А.Н. Белозерского, ЗАО НВО «Иммунотех» и ВНИИКХ. В результате были созданы отечественные иммунохроматографические тест-системы и отработаны методические аспекты экспресс диагностики X-, M- и Y-вирусов картофеля [94, 95], многие из них подходят и для определения патогенов, поражающих овощные культуры.

Метод ИХА в его современном и наиболее распространенном формате применительно к диагностике патогенов растений выглядит следующим образом. Тест-полоска представляет собой мультимембранный композит, состоящий из впитывающей мембраны, погружаемый в образец. Мембраны для нанесения конъюгата антител выполнены с частицами коллоидного золота; на рабочей мембране в аналитической зоне фиксированы антитела к определяемому вирусу, а в контрольной зоне – антитела к IgG кролика (или мыши); другая (впитывающая мембрана) поддерживает поток жидкости по полоске.

Все мембраны монтируются на пластиковой подложке, обеспечивающей единство конструкции и механическую прочность тест-полоски, и покрыты сверху прозрачной пленкой или заключены в пластиковую кассету. При погружении тест-полоски в экстракт патогена, продвигаясь по полоске с фронтом жидкости, связывается с конъюгатом, а затем с антителами, фиксированными в аналитической зоне. Концентрирование связанных с патогеном частиц коллоидного золота приводит к образованию в этом месте окрашенной полосы. Избыток конъюгата улавливается антивидами антителами, в результате чего в контрольной зоне тоже образуется окрашенная полоса. При отсутствии патогена в экстракте (здоровое растение) окрашенная полоса в аналитической зоне не образуется. Если окрашенная полоса не образуется в контрольной зоне, тест признается недостоверным независимо от того, образовалась ли полоса в аналитической зоне.

Высокая скорость анализа, занимающего всего несколько минут, высокая чувствительность определения вирусов, простота подготовки образцов и процедуры анализа позволяют использовать метод во вне-лабораторных и полевых условиях. Чувствительность определения варьирует в интервале от 0,08 до 2 мкг/мл в экстрагирующем буфере и в растительном экстракте и зависит главным образом от свойств поликлональных антител к соответствующему патогену. Метод отличается высокой специфичностью. Это обстоятельство позволило создать лабораторный образец тест-полосок для одновременного определения трех вирусов ХВК, УВК и ВТМ путем формирования трех аналитических зон на одной полоске. Поскольку время анализа при этом не увеличилось, применение мультиспецифичных тест-полосок способствует повышению производительности процедуры диагностики [94].

В ФГБНУ ВНИИКХ имени А.Г. Лорха реализуются иммуноферментные диагностические наборы для выявления, идентификации и количественного определения и иммунохроматографические диагностические комплекты для экспресс-диагностики (PVX, PVS, PVM, PVY, PLRV). ООО «Компания «Биоком» совместно с ГНУ ВНИИ картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха, МГУ имени М.В. Ломоносова и ЗАО «НВО ИММУНОТЕХ» организовала выпуск диагностических наборов для определения вирусных патогенов (Иммунотест-ХВК, Иммунотест-УВК, Иммунотест-МВК, Иммунотест-АВК, Иммунотест-СВК, Иммунотест-ВСЛК). Использование высокоочищенных препаратов высокоспецифичных высокоаффинных иммобилизованных и меченых антител производства ВНИИ картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха (Россия) и фирмы «Bioreba» (Швейцария) обеспечивает высокую специфичность анализа. Минимальная концентрация вируса, определяемая с помощью набора, составляет не более 1 нг/мл, а бактериальных патогенов — не более 10⁴ кл/мл. Коэффициент вариации результатов определения вирусного антигена в одном и том же тестируемом образце не превышает 10 %. Тест-система может быть использована в диапазоне концентраций определяемого антигена от 1 до 1000 нг/мл для вирусов и 10⁴-10⁸ кл/мл – для бактериальных патогенов [96].

В научных исследованиях также используются различные модификации серологического метода, электронной и электронно-ска-

нирующей микроскопии, позволяющие определить форму, размеры фитопатогенов и их вариации, приуроченность к органам и тканям растения или переносчика, характер патологии.

2.6. Молекулярно-генетические методы

В современных условиях для диагностики патогенов все более широко и успешно используются молекулярно-генетические методы. Прежде всего, это метод полимеразно-цепной реакции (ПЦР) и его модификации: прямая, с обратной транскрипцией ОТ-ПЦР (RT-PCR), вложенная (NESTED PCR), изометрическая (LAMP PCR), FLASH-ПЦР (FLASH-PCR), ПЦР в реальном времени (Realtime – RQ-PCR), матричный микрочиповый ПЦР (MICROCHIP PCR), мультипраймерная ПЦР (MULTIPLEX PCR, MULTIPRIMER PCR), цифровая ПЦР (DIGITAL PCR, dPCR), секвенирования следующего поколения (NGS). Достоинствами этих тестов являются их специфичность и высокая чувствительность, позволяющие поставить точный диагноз при минимальных концентрациях возбудителей, когда применение других общепринятых методов не эффективно [97].

● Метод полимеразной цепной реакции – ПЦР

Метод ПЦР (рис. 24) произвел настоящую революцию в биотехнологии, с его помощью идентификацию патогенных микроорганизмов можно провести всего за один день, ее легко автоматизировать, реакция сравнительно недорога и чрезвычайно специфична.

ПЦР основана на многократном копировании (амплификации) определённого участка ДНК при помощи особой ДНК полимеразы, способной осуществлять синтез при повышенной температуре *in vitro*. При этом происходит копирование только заранее заданного, интересующего исследователя участка, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. Достигается это путем использования специфичных праймеров – коротких синтетических нуклеотидов (18-30 оснований), один из которых комплементарен началу интересующего участка на плюс цепи ДНК, а другой – концу этого

участка на минус цепи ДНК. В процессе реакции после расплетания матричной ДНК (при повышении температуры) и последующего отжига (при понижении температуры) образуются комплексы между ней и праймерами, которые теперь служат затравкой для ДНК-полимеразы, – начинается достраивание комплементарной цепочки ДНК. Каждый вновь синтезированный фрагмент ДНК может служить матрицей для синтеза новых фрагментов. При многократном повторении циклов повышения и понижения температуры реакционной среды происходит наработка требуемого продукта до количества, которые легко обнаружить после разделения их электрофорезом в полиакриламидном геле и окрашивания интеркалирующими красителями (например, бромистым этидием).

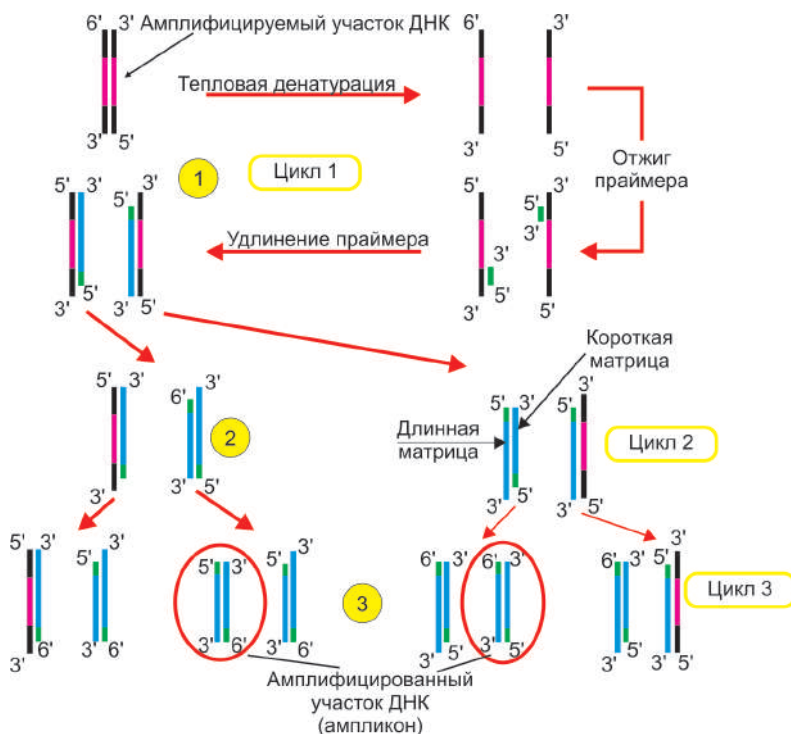


Рис. 24. Схема первых трех циклов полимеразной цепной реакции (<https://helpiks.org/4-9019.html>)

Для проведения ПЦР требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать;
- два праймера, комплементарные концам требуемого фрагмента;
- термостабильная ДНК-полимераза – фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК;
- дезоксинуклеотидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), которые необходимы для синтеза комплементарной цепи ДНК; ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы;
- буферный раствор, обеспечивающий условия реакции – pH, ионную силу раствора;
- праймеры – искусственно синтезированные олигонуклеотиды размером от 15 до 30 пар нуклеотидов, каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы в начале и в конце амплифицируемого участка. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы.

Ход реакции. Обычно при проведении ПЦР выполняется 30 и более циклов, на каждом из которых количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается. Каждый цикл состоит из трех стадий:

денатурация – двухцепочечную ДНК-матрицу нагревают до 94-96 °С в течение 0,5-2 мин, при этом разрушаются водородные связи между двумя цепями ДНК, и они расходятся;

отжиг – температуру понижают на несколько десятков градусов (конкретное значение температуры отжига зависит от нуклеотидной последовательности праймеров). Праймеры связываются с одноцепочечной матрицей. Продолжительность стадии составляет 0,5-2 мин. Неправильный выбор температуры отжига приводит к плохому связыванию праймеров с матрицей (завышенная температура) либо к связыванию в неверном месте и появлению неспецифических продуктов (заниженная температура);

элонгация (синтез) – на третьем этапе температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Taq-полимеразы (72 °С), которая начинает достраивать вторую цепь ДНК с 3'-конца праймера и движется вдоль матрицы. Продолжительность стадии составляет 3 мин.

Количество циклов в ПЦР зависит как от типа ДНК-полимеразы, так и от длины амплифицируемого фрагмента. По окончании всех циклов проводят дополнительную – финальную – стадию элонгации, чтобы достроить все одноцепочечные фрагменты. Эта стадия длится 7-10 мин.

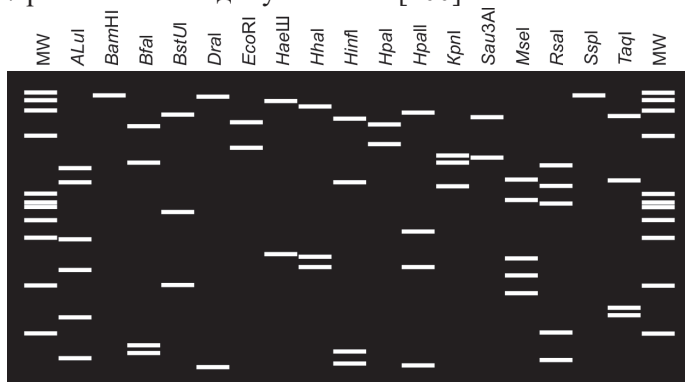
Кроме «классической» ПЦР применяют и ее многочисленные разновидности. Например, в случае низкого содержания патогена в растительном материале, что часто характерно для фитоплазменной инфекции, используют «вложенную», или «гнездовую» ПЦР (*от англ. Nested PCR*), которая позволяет увеличить чувствительность метода диагностики. Суть метода заключается в последовательном проведении двух амплификаций с двумя разными парами праймеров. ПЦР-продукт амплификации с первой парой праймеров используется в качестве матрицы для амплификации со второй парой праймеров, комплементарных последовательностям, расположенным внутри этого ПЦР-продукта, и, соответственно, более короткого.

Во ВНИИФ при прямом ПЦР для идентификации фитоплазм, поражающих овощные культуры применяют праймеры P1/P7 (P1 (forward): 5'-AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GAT T-3' и P7 (reverse): 5'-CGT CCT TCA TCG GCT CTT-3') или P1/16S-SR. Из листьев растений вырезают и замораживают жилки при температуре – 20 °С, 0,3 г ткани растирают в фарфоровой ступке с 3 мл СТАВ-буфера. ДНК экстрагируют в соответствии инструкцией Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). При прямом ПЦР в амплификаторе устанавливают следующий температурно-временной режим: 94 °С – 5 мин, 38 циклов (при температуре 94 °С – 1 мин, 55 °С – 2 мин, 72 °С – 3 мин) и 72 °С – 8 мин. При идентификации фитоплазм кроме прямого ПЦР 16Sr РНК фитоплазм (в случае неоднозначных результатов при прямом ПЦР), используется дополнительно вложенный ПЦР с использованием праймеров R16F2п/R16R2: (R16F2п: 5'-GAA ACGACTGCTAAGACTGG-3'; R16R2: 5'-TGACGGGCGGTGTGTTACA AAC CCC G-3'; R16R2п 5'-TGACGGGCGGTGTACAAAC-3'). Для этого продукты после прямого ПЦР разводят ddH₂O в соотношении 1:30, и этот раствор используют как матрицу. Реакционная смесь и условия ПЦР такие же, как и при проведении прямого ПЦР. Каче-

ство и количество ПЦР-продуктов после амплификации проверяют методом электрофореза в агарозном геле.

Для визуализации ПЦР-продуктов гель агарозы окрашивают красителями: GelRed, SYBR Safe DNA Gel stain или после электрофореза бромистым этидием. После электрофореза окрашенный гель просматривают в трансиллюминаторе под УФ или, используя любую гель-документирующую систему, позволяющую просматривать гель в УФ и сохранять изображение геля. ПЦР-продукты нужного размера в дальнейшем используют для проведения ПДРФ-анализа. При этом каждый ПЦР-продукт отдельно обрабатывают эндонуклеазами рестрикции AluI, HhaI, HpaII, VseI (TruII), RsaI, TaqI. Электрофорез проводят в полиакриламидном геле и после визуализации в УФ полученные снимки сравнивают с опубликованными реальными или виртуальными картами рестрикции [98, 99].

На рис. 25 представлена виртуальная «электрофореграмма» фрагментов 16S рДНК фитоплазмы ‘*Ca. phytoplasma solani*’, полученная *in silico*, т.е. с помощью компьютерного моделирования рестрикции ДНК 17 различными эндонуклеазами [100].



16SrXII-A 'Ca. Phytoplasma solani'
(AJ964960)

Рис. 25. Виртуальная карта полиморфизма длины рестрикционных фрагментов 16S рДНК ‘*Ca. Phytoplasma solani*’ (https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/vgel/virtualgel_group12.html)

Нуклеотидная последовательность этой 16S рДНК (фитоплазмы столбура картофеля) была получена из базы данных GenBank (регистрационный номер GenBank AJ964960). На основании анализа

полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ – англ. *Restriction fragment length polymorphism*) и реальных электрофореграмм, полученных в результате ферментативного расщепления 16S рДНК, амплифицированной в ПЦР, эта фитоплазма была первоначально отнесена к группе/подгруппе 16SrXII-A. Классификация, основанная на представленных здесь виртуальных «электрофореграммах», полностью согласуется с исходной классификацией. Подобные карты составлены для 28 групп и множества известных подгрупп в этих группах.

На 2018 г. установлено разделение фитоплазм на 36 (16Sr) рибосомальных групп и более 150 подгрупп. Для отдельных видов фитоплазм созданы специфические праймеры, например, для определения фитоплазм столбура Maixner и др. (1995) рекомендуют использовать следующие праймеры: rStol: 5-AGA TGT GAC CTA TTT TGG TGG-3 и fStol: GCC ATC ATT AAG TTG GGG A. Для выявления штаммовых различий в пределах подгрупп анализируют также рибосомные (*trpV* и *gpcC*) и экстрарибосомных гены (*secY*, *map*, *uvrB*, *degV* и *tuf*). Продукты ПЦР секвенируют либо напрямую, либо путем их предварительного клонирования в вектор для клонирования ПЦР. Данные последовательности можно проанализировать с помощью инструмента поиска базового локального выравнивания, BLASTN, доступного по адресу Национального центра биотехнологической информации [101].

Если последовательность имеет менее 97,5 % идентичности со своим ближайшим родственником, фитоплазма считается новым 'Са. видом фитоплазмы. В этом случае следует секвенировать весь ген 16S рРНК и провести филогенетический анализ. Секвенируют также отдельные области генома, такие как 16S/23S, а также спейсерные области рРНК, ген *secY*, гены рибосомного белка или ген *tuf* [102-105]. Для идентификации большинства фитовирусов и вироидов применяется разновидность ПЦР — метод обратной транскрипции ОТ-ПЦР.

● *ПЦР с обратной транскрипцией,
ОТ-ПЦР (Reverse Transcription PCR, RT-PCR)*

Как известно, у большинства растительных вирусов геном представлен одноцепочечной РНК, вироид также состоит из одноце-

почечной ковалентнозамкнутой РНК, но из-за высокого процента спаренных оснований, обладает упорядоченной структурой. Однако ПЦР может быть использована и для диагностики РНК-содержащих вирусов и вириодов, поскольку еще в 1970 г. был открыт фермент – обратная транскриптаза (она же ревертаза, или РНК-зависимая ДНК-полимераза), который синтезирует ДНК на матрице РНК. Эта кДНК затем используется в качестве матрицы для ПЦР.

Метод ОТ-ПЦР является чувствительной методикой, с помощью которой может быть обнаружено малое количество молекул РНК вириода и РНК-содержащих вирусов и фитоплазм. Со времени открытия обратной транскриптазы ОТ-ПЦР стала эталонной технологией для обнаружения и/или сравнения уровней РНК по нескольким причинам: не требует обработки после ПЦР, широкий диапазон (> 107-кратного) содержания РНК может быть измерен, и это дает представление как о качественных, так и количественных данных. Благодаря своей простоте, специфичности и чувствительности ОТ-ПЦР используется в широком спектре приложений – от простых экспериментов, таких как количественное определение клеток микроорганизмов в объекте, до более сложных методов диагностики для обнаружения инфекционных агентов заболеваний растений.

Так, основой диагностики вириода веретеновидности клубней картофеля ВВКК (PSTVd), поражающего и овощные культуры, методом ПЦР является построение на матрице вириодной РНК, комплементарной ДНК, а затем регистрации продуктов амплификации.

Специалистами ВИЗР и Института ядерной физики РАН для ПЦР при диагностике ВВКК были синтезированы три праймера, один со стороны 3» конца (праймер 285), другой — со стороны 5» конца (праймер 2), третий (праймер 260) представлял средний участок цепи. Праймер 285 был использован для синтеза к-ДНК, праймеры 2 и 260 — для амплификации и контроля синтеза минус-цепи, которая была образована с помощью фермента ДНК-полимеразы или обратной транскриптазы [48, 49].

В МГУ для амплификации ВВКК применяются праймеры PSTV-rev (GAAAAAGAAGGCGGCTCGGAGGA), внутренние праймеры BamHI (GGATCC), PSTV-forward (GCCGACAGGAGTATTTC) и HpaII (CCGG), имею-

щие аналогичные последовательности в РНК вириона при участии фермента обратной транскриптазы AMV [46].

Во ВНИИФ для идентификации ВВКК применяются праймеры: PSTVd180F (5'-TCACCCTTCCTTCTTCGGGTGTC-3') + PSTVd179R (5'-AAACCCTGTTTC-GCGCGGAATTAC-3') и PSTVd112F (5'-ACTGGCAAAAAAGGACGGTGGGGA-3') + PSTVd359R (5'-AGGAACCAACTGCGGTTCCAAGGG-3') [106].

ПЦР в модификации FLASH – метод ПЦР с детекцией по «конечной точке» позволяет учитывать результаты ПЦР не открывая пробирки, непосредственно после проведения ПЦР, что исключает возможность загрязнения ПЦР-лаборатории ампликонами. ПЦР в модификации FLASH исключает стадии анализа продуктов ПЦР методом электрофореза и гель-документации результатов электрофореза, что позволяет сократить время полного ПЦР-анализа до 2-3 ч и снизить стоимость комплекта оборудования для ПЦР-лаборатории. Регистрация флуоресценции при FLASH-детекции происходит по окончании реакции ПЦР (по «конечной точке» – «end-point detection») на детекторе флуоресценции, который регистрирует флуоресцентное свечение реакционной смеси в пробирках непосредственно после проведения ПЦР.

В Российской Федерации в настоящее время имеется надежная база для диагностики вирусов и вириона веретеновидности клубней картофеля – PSTVd, которые могут инфицировать и овощные паслёновые культуры. Диагностические наборы производят отечественные фирмы «АгроДиагностика» (в форматах FLASH-ПЦР и realtime ПЦР) и «Синтол» (в формате real-time ПЦР). В научно-методическом отделе фитопатологии ФГБУ «ВНИИКР» проведена отработка комплекса вопросов по выявлению PSTVd методами классической ПЦР, FLASH-ПЦР и ПЦР в режиме реального времени. При отработке диагностики PSTVd методом FLASH-ПЦР установлено, что при проведении тестов с набором для FLASH-ПЦР к PSTVd фирмы «АгроДиагностика» эффективная очистка РНК вириона достигается наборами для выделения нуклеиновых кислот отечественных фирм-производителей: «Проба-НК», «Проба-ГС» («АгроДиагностика») и «НК-М-Сорб» («Синтол») при проведении очистки вручную, а также набором «М-Сорб-Туб-Автомат» («Синтол») – на автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот Freedom Evo (Tecan, Швейцария).

Установлено также, что для FLASH-ПЦР синтез кДНК вириона может осуществляться набором реагентов для обратной транскрипции фирмы «АгроДиагностика», содержащим праймер Random, MMLV RT Kit («Евроген», Россия), содержащим праймеры Oligo (dT)17 и Random dN10 и набором Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, США), содержащим праймеры Oligo (dT)18 и Random (dN)6. Набор для FLASH-PCR к PSTVd фирмы «АгроДиагностика» позволяет выявлять все изоляты вириона в свежих и замороженных при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ листьях и клубнях растений картофеля и листьях томата. Ложноположительной реакции с аналогичными органами здоровых растений картофеля и томата не наблюдалось. Чувствительность данного метода является очень высокой.

В экспериментах выявление вириона достигалось при разведении инфекционного сока листьев томата до 10^6 степени. Аналитическая воспроизводимость и повторяемость результатов при проведении тестов набором для FLASH-PCR к PSTVd составляла 100%. Установлена возможность использования препаратов нуклеиновых кислот, подготовленных для бактериологической экспертизы (шейкирование образцов клубней в буфере, центрифугирование суспензии, выделение нуклеиновых кислот наборами «Проба-ГС» или «М-Сорб-Туб-Автомат»), также и для выявления PSTVd. В нескольких экспериментах выявление вириона было достигнуто без выделения нуклеиновых кислот непосредственно в отцентрифугированной суспензии, однако воспроизводимость этих результатов была недостаточно высокой.

Специалистами ВНИИКР проведена валидация диагностического набора к PSTVd для ПЦР в режиме реального времени фирмы «Синтол». В наборе фирмы «Синтол» обратная транскрипция совмещена в одной пробирке с ПЦР, что уменьшает возможность контаминации и сокращает продолжительность тестов. При проведении валидации не наблюдалось неспецифической реакции используемых в наборе праймеров с различными вирусами. Аналитическая чувствительность данного набора находится в пределах шестого разведения инфекционного сока растений томата и седьмого разведения очищенной РНК вириона. Аналитическая воспроизводимость и аналитическая повторяемость результатов при использовании испытуемого набора составили 100%. Установлено, что для проведения те-

стов с данным комплектом реагентов очистку РНК вириода возможно проводить с различными наборами для выделения нуклеиновых кислот: «Проба-НК», «Проба-ГС» («АгроДиагностика») «НК-М-Сорб», «М-Сорб-Туб-Автомат» («Синтол»), «RNAqueous Kit» (Life Technologies). Набор для real-time-PCR фирмы «Синтол» позволяет выявлять PSTVd в свежих и замороженных при температуре -80°C листьях растений томата и др. Ложноположительной реакции с аналогичными органами здоровых растений не наблюдалось. Набор позволяет также выявлять вириод в образцах сока, нанесенных на мембраны для архивирования нуклеиновых кислот.

По результатам отработки выделения РНК PSTVd констатируется преимущество наборов для выделения нуклеиновых кислот «НКМ-Сорб» фирмы «Синтол» и «Проба-НК» фирмы «АгроДиагностика» по сравнению с набором «RNAqueous Kit» фирмы Life Technologies (США). Это было установлено при последующей ОТ-ПЦР выделенной РНК с наборами для амплификации «MasDRtaqMix-2025» и «Tersus PCR Kit» («Евроген»).

По результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод, что праймеры PPSTV-1P/PPSTV-1M могут быть эффективно использованы для диагностики PSTVd. Для проведения ПЦР с данными праймерами возможно применение различных комплектов реагентов для обратной транскрипции и амплификации, а также препаратов РНК, выделенной с использованием различных методов. Валидность продуктов амплификации, полученных в тестах с праймерами PPSTV-1P/PPSTV-1M и 3Н1-Ф/2Н1-Р, была подтверждена их секвенированием [107].

В МГУ для экстракции вирусной РНК из зараженных растений разработан новый метод, основанный на выделении нуклеиновых кислот с помощью водорастворимого нетоксичного хаотропного трихлорацетата аммония и их очистке на целлюлозном сорбенте на основе хлопковой ваты. Разработан новый метод лабораторной диагностики вирусов растений, основанный на дот-гибридизации вирусной РНК или продукта ее амплификации с кДНК-зондом меченым хлордиэтилентриаминоплатиной [диен(Pt)] [94].

ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR) – технология получила широкое распространение в исследовательских и диагностиче-

ских лабораториях. Ее принципиальными особенностями являются мониторинг и количественный анализ накопления продуктов полимеразной цепной реакции, автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов (рис. 26).

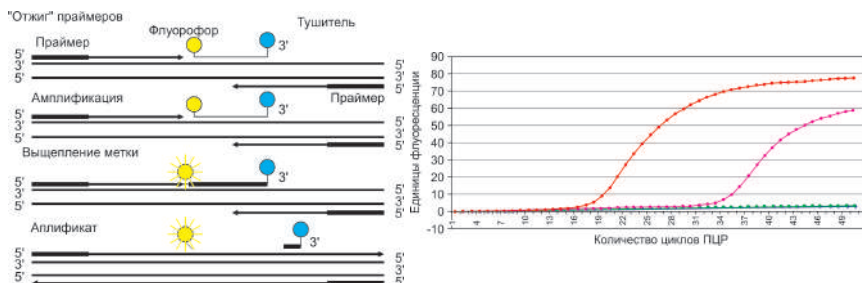


Рис. 26. Схема, представляющая систему использования флуорофоров при проведении ПЦР в реальном времени и кинетическая кривая и схема ПЦР в реальном времени
(<https://helpiks.org/4-9020.html>)

Основные преимущества ПЦР в реальном времени по сравнению с методом анализа по конечной точке:

- количественный анализ специфической ДНК в широком диапазоне концентраций;
- сравнительный количественный анализ нескольких типов ДНК в одной пробирке;
- повышение специфичности реакции за счет использования гибридационных зондов;
- обнаружение и определение процентного содержания ДНК с измененной последовательностью;
- исключение после амплификационных манипуляций с продуктом и, как следствие, снижение риска контаминации (загрязнения), экономия времени и сокращение затрат на поддержание ПЦР-лаборатории;
- автоматизация и стандартизация ПЦР-анализа.

Для ПЦР в реальном времени российская научно-производственная компания «Синтол» реализуют наборы реагентов «Фитоскрин» для обнаружения патогенов, способных заражать овощные культуры:

- «Acidovorax citrulli-PВ» – для выявления ДНК возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур (№ РН-006);

- «Beet necrotic yellow vein virus-PB» – для выявления РНК вируса некротического пожелтения жилок сахарной свеклы (ризомания сахарной свеклы) методом ОТ-ПЦР-РВ (№ РН-010);
- «Tomato yellow leaf curl disease-PB» – для выявления ДНК бегомовирусов, возбудителей болезни желтой курчавости листьев томата (№ РН-018 new);
- «Tomato ringspot virus-PB» – для выявления РНК вируса кольцевой пятнистости томата методом ОТ-ПЦР-РВ (№ РН-028);
- «Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis-PB» – для выявления ДНК возбудителя бактериального рака томата (№ РН-041new);
- «Tomato spotted wilt virus-PB» – для выявления РНК вируса бронзовости томата методом ОТПЦР-РВ (№РН-042new);
- «Tobacco ringspot virus-PB» – для выявления РНК вируса кольцевой пятнистости табака методом ОТ-ПЦР-РВ(№РН-040New);
- «Impatiens necrotic spot virus-PB» – для выявления РНК вируса некротической пятнистости бальзамина методом ОТ-ПЦР-РВ (№ РН-013);
- «Potato Virus X и Potato Virus Y-PB» – для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ (№ PV-001);
- «Potato Virus M и Potato Leafroll Virus-PB» – для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ (№ PV-002);
- «Potato Virus S и Potato Virus A-PB» – для дифференциальной диагностики и выявления РНК вирусов картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ (№PV-003);
- «Potato spindle tuber viroid-PB» – для выявления РНК вириода веретеновидности клубней картофеля методом ОТ-ПЦР-РВ (№ PV-004);
- «Potato Virus X, Y, M, L, S, A, PSTVd-PB» – для выявления РНК вирусов (PVX, PVY, PVM, PLRV, PVA, PVS и PSTVd) картофеля (состоит из комплекта наборов PV-001, PV-002, PV-003, PV-004) (№ PV-005);
- «Candidatus Phytoplasma solani-PB» – для выявления ДНК фитоплазмы почернения древесины или столбура паслёновых (№ РН-02);
- «Candidatus Liberibacter solanacearus-PB» – для выявления ДНК возбудителя заболевания картофеля «Зебра чипсов» (№ РН-019).

Наборы реагентов «Фитоскрин» для выявления фитопатогенов методом ПЦР в реальном времени разработаны совместно с Всероссийским центром карантина растений и утверждены Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору в 2013 г. Перечень наборов «Фитоскрин» постоянно пополняется новыми наборами на актуальные инфекции растений [108].

В ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» проведены исследования по выбору наиболее специфичных к объектам исследования праймеров и зондов для проведения ПЦР в режиме реального времени. Так, для достоверного (без ложноположительных реакций) выявления возбудителя почернения коры винограда BN или столбура паслёновых предлагаются пары праймеров и BNrtF/BNrtR и зонд BN-FAM (BNrtF: GGT TAA GTC CCG CAA CGAG; BNrtR: CCC ACC TTC CTC CAA TTT ATCA; BN-FAM AAC CCT TGT TAA TTG CCA TCA TTA AG). Реакционная смесь включает в себя 5 мкл мастермикса, по 0,75 мкл каждого праймера и зонда, 2,5 мкл ДНК и 15,25 мкл H₂O для доведения до общего объема в 25 мкл. Температурно-временные условия следующие: предварительная денатурация – 95 °С, денатурация 95 °С – 15 мин, элонгация 59 °С – 1 мин 30 с. Амплификации составляли 45 циклов. Дополнительно в режим был включен прогрев при температуре 50 °С на 2 мин, что заявлено в инструкции амплификатора для ПЦР-РВ StepOnePlus («Appliedbiosystems», США) [96, 97].

Матричный микрочиповый метод ПЦР в реальном времени. В ООО «Генбит» при участии учёных ВНИИФ разработаны тест-системы для ПЦР в реальном времени, работающие в едином режиме амплификации, для идентификации гриба – *Phytophthora infestans*, бактерий – *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dianthicola*, *Dickeya solani*, *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum*, *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*, Y-вирусы картофеля (обычные и некротические формы, а также система неизбирательного тестирования, обнаруживающая все формы), А-, X-, S-, М-, L-, Мор-Тор-вирусов картофеля и вириода – ВВКК. Тест-системы (включая полимеразу и ревертазу) были иммобилизованы и лиофилизированы в миниатюрные микрореакторы (1-2 мкл) на кремниевых микрочипах ДНК/РНК (микроматрицы) для использования с мобильным

усилителем AriaDNA. Предварительно загруженные микроматрицы с 30 реакциями, сроком хранения 3 и 6 месяцев (для возбудителей на основе РНК и ДНК) без особых условий хранения (при комнатной температуре) были успешно протестированы на эталонных и полевых образцах и продемонстрировали высокую чувствительность (1пг) по сравнению с традиционным ИФА и микробиологическими методами.

Миниатюризация и создание микрожидкостных или стационарных микрочиповых систем стало следующим шагом в развитии методов ПЦР, которые позволяют проводить ПЦР в микрореакторах объемом всего несколько десятков пиколитров [16, 17]. Помимо удешевления реагентов такой миниатюрный реакционный объем обеспечивает более быстрый и точный контроль температуры, что сокращает общее время анализа и повышает эффективность реакции. Обеспечить широкое применение микрочиповой ПЦР-системы для диагностических целей способны простота в использовании и низкая себестоимость микрочипов. Как правило, микрофлюидные микрочипы не соответствуют этим требованиям, а стационарные микрочипы с открытыми микрореакторами вполне подходят в качестве основы для создания диагностических систем (Сляднев, 2012).

Попытка разработать оптимизированные диагностические системы на основе стационарных микрочипов также была предпринята в России AriaDNA (Наволоцкий и др., 2010; Наволоцкий и др., 2011). Эта система основана на использовании одноразового микрочипа из кремния или алюминиевого сплава. Микрочип состоит из 48 микрореакторов/лунок и обеспечивает одновременную мультиплексную ПЦР в режиме реального времени. Высокая теплопроводность микрочипа сокращает время усиления до 20-30 мин. Специальная модификация поверхности стружки обеспечивает гидрофильную зону внутри лунки и гидрофобную зону за ними, что гарантирует надежное удерживание образцов в лунках во время термоциклирования и предотвращает перекрестное загрязнение и ингибирование реакции. Флуоресцентный сигнал регистрируется для каждой лунки индивидуально, поэтому вмешательство сигналов от соседних лунок устраняется. Еще одно важное преимущество системы: все компоненты реакционной смеси (включая полимеразу и обратную транскрипта-

зу) можно лиофилизировать в лунках, что сокращает время, необходимое для анализа, и упрощает процедуру, – оператор должен только подготовить ДНК или образцы РНК и добавить их в лунки под слой уплотнительного минерального масла [109].

Эксперименты показали отличную воспроизводимость и высокую эффективность систем: все искомые нуклеиновые кислоты были обнаружены и идентифицированы в образцах, содержащих ДНК/РНК одного патогена, а также в образцах, содержащих смесь ДНК/РНК несколько патогенов. Расход реагентов для ПЦР в 20 раз меньше по сравнению с классической пробиркой формата анализа ПЦР, а время амплификации составляет всего 33 мин на 45 циклов, что как минимум в 2 раза быстрее, чем классический ПЦР. К недостаткам систем следует отнести отсутствие единого метода, который бы обеспечивал оптимальное извлечение ДНК/РНК из любого типа образца, поэтому отбор проб и выбор метода экстракции может привести к ложным результатам (в основном отрицательным). Интерпретация результатов может быть сложной, особенно в случае вирусных патогенов [97].

В полевых условиях часто отмечается заражение растения комплексом патогенов. Всё это усложняет установление этиологии возбудителей. Для преодоления этих трудностей разработана мультиплексная ПЦР.

Мультиплексная ПЦР, мультипраймерная ПЦР, в которой одновременно используют более одной пары олигонуклеотидных праймеров, что приводит к коампликации нескольких ДНК-матриц. Такая реакция позволяет экономить время, она широко используется для экспресс-идентификации инфекционных агентов, скрининга сразу по нескольким инфекционным возбудителям или для исследования состояния нескольких аллельных генов у эукариотических организмов. Мультиплексная ПЦР – перспективная методика, которая требует более строгой оптимизации условий, чем стандартная ПЦР с одним ампликоном. При мультиплексной ПЦР необходим правильный подбор параметров реакции (концентрации реагентов и особенностей прохождения каждой стадии), позволяющий всем праймерам соединиться с комплементарными им матрицами и синхронно наращивать ампликоны. Подбор правильных праймеров, ферментов и

буфера также является важным фактором, определяющим эффективность мультиплексной ПЦР.

Практика лабораторных исследований показала, что мультиплексная ПЦР имеет ряд преимуществ перед стандартной ПЦР: снижение риска контаминации образца, возможность контроля ложноотрицательных результатов, уменьшение расхода реактивов, сокращение времени подготовки и более высокое качество эталона, количество которого можно определить в образце. В области диагностики инфекционных заболеваний технология показала свою ценность в идентификации бактерий, вирусов, паразитов и грибов [110].

Петлевая изотермическая амплификация – Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – метод изотермической амплификации нуклеиновых кислот. В отличие от технологии ПЦР, в которой реакция проводится с серией чередующихся температурных стадий или циклов, изотермическая амплификация проводится при постоянной температуре и не требует термоциклера.

В LAMP последовательность-мишень амплифицируется при постоянной температуре 60-65 °С с использованием двух или трех наборов праймеров и полимеразы с высокой активностью замещения цепи в дополнение к активности репликации. Обычно для амплификации шести отдельных областей гена-мишени используют четыре разных праймера, что увеличивает специфичность. Дополнительная пара «петлевых праймеров» может еще больше ускорить реакцию. Количество ДНК, продуцируемой в LAMP, значительно выше, чем при амплификации на основе ПЦР.

Продукт амплификации может быть обнаружен с помощью фотометрии, измерения мутности, вызванной осадком пирофосфата магния в растворе как побочным продуктом амплификации. Это позволяет легко визуализировать невооруженным глазом или с помощью простых фотометрических подходов к обнаружению небольших объемов. За реакцией можно следить в реальном времени путем измерения мутности или флуоресценции с использованием интеркалирующих красителей, таких как SYTO 9 [111-113].

Красители, такие как зеленый SYBR, можно использовать для создания видимого изменения цвета, которое можно увидеть невооруженным глазом без необходимости в дорогостоящем оборудовании.

довании, или для реакции, которую можно более точно измерить с помощью приборов. Молекулы красителя интеркалируют или непосредственно метят ДНК и, в свою очередь, могут коррелировать с количеством изначально присутствующих копий. Следовательно, LAMP также может быть количественным. Определение в пробирке амплификации ДНК LAMP возможно с использованием нагруженного марганцем кальцеина, который начинает флуоресцировать при комплексообразовании марганца с пирофосфатом во время синтеза ДНК *in vitro* [114].

Другой метод визуального обнаружения LAMP-ампликонов невооруженным глазом основан на их способности гибридизоваться с комплементарной ss-ДНК, связанной с золотом, и таким образом предотвращать нормальное изменение цвета с красного на пурпурно-синий, которое в противном случае произошло бы во время индуцированной солью агрегации золотых частиц. Таким образом, метод LAMP в сочетании с обнаружением ампликона с помощью AuNP может иметь преимущества по сравнению с другими методами с точки зрения сокращения времени анализа, подтверждения ампликона гибридизацией и использования более простого оборудования (например, отсутствие необходимости в термоциклере, оборудовании для электрофореза или ультрафиолетовом трансиллюминаторе) [115].

LAMP – относительно новый метод амплификации ДНК, который благодаря своей простоте, прочности и низкой стоимости может обеспечить значительные преимущества [116, 117]. Было обнаружено, что LAMP менее чувствителен (более устойчив), чем ПЦР, к ингибиторам в сложных образцах, вероятно, из-за использования другой ДНК-полимеразы (обычно Bst – *Bacillus stearothermophilus* – ДНК-полимеразы, а не Taq-полимеразы, как в ПЦР). В нескольких отчетах описывается успешное обнаружение патогенов в минимально обработанных образцах, таких как термически обработанная кровь или в присутствии матриц клинических образцов [118, 119]. Эта функция LAMP может быть полезна в условиях ограниченных ресурсов или в полевых условиях, где обычная экстракция ДНК или РНК до диагностического тестирования может быть непрактичной.

LAMP менее универсален, чем ПЦР. Поскольку LAMP использует четыре (или шесть) праймеров, нацеленных на шесть (или восемь)

областей в пределах довольно небольшого сегмента генома, и поскольку дизайн праймеров подвержен многочисленным ограничениям, сложно разработать наборы праймеров для LAMP «на глаз». Бесплатные пакеты программного обеспечения с открытым исходным кодом [120] или коммерческие обычно используются для помощи в разработке праймеров LAMP, хотя ограничения дизайна праймеров означают, что свобода выбора целевого сайта меньше, чем при ПЦР.

В диагностическом приложении это должно быть сбалансировано с необходимостью выбора подходящей мишени (например, консервативного сайта в очень вариабельном вирусном геноме или мишени, специфичной для определенного штамма патогена). Для покрытия различных вариантных штаммов одного и того же вида может потребоваться несколько вырожденных последовательностей. Следствием наличия такого набора праймеров может быть неспецифическая амплификация на поздней стадии амплификации.

Подходы к мультиплексированию для LAMP менее развиты, чем для ПЦР. Большое количество праймеров на мишень в LAMP увеличивает вероятность взаимодействий праймер-праймер для мультиплексированных наборов мишеней. Продукт LAMP представляет собой серию конкатемеров целевой области, приводящую к характерной «лестнице» или полосе на геле, а не к одной полосе, как в случае ПЦР. Хотя это не проблема при обнаружении одиночных мишеней с помощью LAMP, «традиционные» (конечные) приложения мультиплексной ПЦР, в которых идентичность цели подтверждается размером полосы на геле, невозможны с LAMP. Мультиплексирование в LAMP было достигнуто за счет выбора целевой области с сайтом рестрикции и переваривания перед запуском в гель, так что каждый продукт дает определенный размер фрагмента [121], хотя этот подход добавляет сложности к экспериментальной конструкции и протоколу.

Использование ДНК-полимеразы с замещением цепи в LAMP также исключает использование зондов гидролиза (зонды TaqMan, основанные на 5'-3'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы). Сообщалось об альтернативном подходе к мультиплексированию в реальном времени, основанном на тушителях флуоресценции [122]. Зеленый краситель SYBR может быть добавлен для просмотра

LAMP в режиме реального времени. Однако в поздней амплификации амплификация праймер-димер может способствовать ложноположительному сигналу. В отличие от традиционных ПЦР-тестов на основе SYBR-green, анализ кривой плавления не может быть проведен в LAMP для проверки наличия димеров праймеров.

2.7. Комбинирование методов

Очень часто для повышения эффективности диагностики соединяют несколько методов. Специалистами ЦКП «Орловский региональный центр сельскохозяйственной биотехнологии» была предложена подобная модель биомониторинга, направленная на профилактику развития фузариоза овощных культур на дальнейших этапах вегетации.

Модель биомониторинга довизуальных проявлений грибной инфекции методом ИФА и ПЦР-анализом.

Применяемый биомониторинг включает в себя комплексный контроль скрытого (довизуального) проявления болезней овощных культур защищенного грунта в течение всего вегетационного периода методами биоиндикации (по морфологическим характеристикам овощных культур) и биотестирования (иммуноферментный анализ на наличие инфекции и ПЦР-анализ количественной нагрузки возбудителем) с целью корректировки интегрированной защиты культур биопрепаратами. Модель применяемого метода мониторинга представлена в табл. 7.

Таблица 7

Модель метода биомониторинга заражения возбудителями болезней овощных культур защищённого грунта

Период вегетации культуры	ИФА (D450-620)		ПЦР (lg C)
	растение интактно*	наличие скрытой инфекции	количественная нагрузка инфекции**
<i>Томаты, перец, огурцы</i>			
Всходы (пятые-седьмые сутки)	0,57-0,74	>1,31	5,43
При высадке рассады в теплицы	0,69-0,97	>1,31	6,12
Цветение	0,54-0,75	>1,31	6,21

Период вегетации культуры	ИФА (D450-620)		ПЦР (lg C)
	растение интактно*	наличие скрытой инфекции	количественная нагрузка инфекции**
Первый сбор	0,27-0,77	>1,31	5,85
Каждые 10-14 суток после цветения	0,35-0,95	>1,31	7,23
<i>Зелень (петрушка, укроп, лук)</i>			
Всходы (пятые-седьмые сутки)	0,27-0,94	>1,58	8,14
Каждые 10-14 суток после всходов	0,35-0,98	>1,58	8,14

* Растение здорово.

** Требуется корректировка интегрированной защиты.

В результате методом ИФА качественно подтверждается наличие или отсутствие инфекции в культурах в указанные периоды вегетации. При превышении показателя оптической плотности >1 , необходимо дополнительно проведение количественной нагрузки методом ПЦР для корректировки интегрированной защиты овощных культур [92].

В ФГБУ ВНИИКР проводили исследования по одновременной диагностике патогенных вирусов овощных культур и их насекомых переносчиков с помощью комбинированного анализа ИФА и ПЦР. На первом этапе лабораторных исследований происходит тестирование образцов с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) коммерческими наборами к INSV и TSWV производства фирмы Adgen (Шотландия), устанавливаются пораженные вирусом растения. Для подтверждения результатов ИФА применяются праймеры INSV S1/S2 для классической ОТ-ПЦР с детекцией электрофорезом, описанные в Диагностическом протоколе ЕОКЗР 7/034 (ОЕПР/ЕРРО (2004)), с помощью коммерческих наборов для выявления INSV методом ПЦР в реальном времени, производимых фирмой ЗАО «Синтол» (Россия), а также с праймерами и зондом INSV F/R/P (Chenetal, 2013). Все положительные образцы, выявленные методом ИФА, подтверждаются ПЦР. На следующем этапе проводится оценка возможности использования праймеров и зонда для ПЦР в реальном времени для иден-

тификации распространителя инфекции трипса в подкарантинном материале. Такой подход должен повысить точность исследований, а также сократить сроки их проведения. В случае наличия в выявленных векторах вируса, можно рекомендовать проведение фитосанитарных мероприятий одновременно и по отношению к карантинным вирусам в местах выявления насекомых-переносчиков [123].

Для отработки способов устранения влияния вирусной инфекции на урожайность и качество плодов на ОПБ ВНИИССОК в условиях малообъемной гидропоники на растениях перца сладкого проводилась диагностика вирусной инфекции очагового характера. Было выявлено два типа проявления симптомов. Результаты иммуноферментного анализа и экспресс-метода с использованием иммунострипов позволили идентифицировать вирус табачной мозаики (ВТМ). Проведенная в условиях открытого грунта иммунологическая оценка показала смешанную вирусную инфекцию ВТМ+ВОМ, степень развития болезни доходила до 37,5 %. При электронной микроскопии в соке инфицированных растений перца с симптомами зеленой и желтой мозаики обнаружены палочковидные частицы вируса табачной мозаики размером 30 нм [124, 125].

2.8. Фитомониторинг

Нельзя не отметить в качестве способа борьбы с распространением инфекционных заболеваний овощных культур фитосанитарный мониторинг в сочетании с диагностикой, прогнозом развития и распространения вредных организмов в агроэкосистемах. Его перспективность подтверждается многочисленными исследованиями и практическими разработками.

Фитомониторинг позволил установить эпифитотии фитоплазмы в Среднем и Нижнем Поволжье и Ростовской области на томатах, перцах, баклажанах, моркови и свекле. В 2006-2014 гг. фитоплазма группы 16SrI обнаружена в образцах эстрагона *Artemisia dracunculus L.*; фитоплазма группы 16SrIII – в перце сладком *Capsicum annuum L.*; фитоплазма подгруппы 16SrVI-A выделена из перца сладкого, тыквы

обыкновенной, томата, моркови, эстрагона; фитопlasма подгруппы 16SrXII-A – из перца сладкого, томата, моркови, сахарной свеклы, хрена обыкновенного и кориандра посевного [126].

Разработаны технические и программные средства, позволяющие непосредственно в поле проводить сбор фитосанитарной информации, ее автоматическую обработку, передачу и представление потребителю соответствующих рекомендаций по защите растений.

Для практического использования составлены базы данных по фитосанитарии. К перспективным отечественным проектам в области защиты растений относится программа «КОРАЛЛ – Вредители и болезни сельскохозяйственных культур» [127], информационная система поддержки принятия решений по борьбе с заболеваниями растений «АГРОДОЗОР» (<http://agrodozor.ru>) (ООО «Агродозор» (г. Белгород) совместно с сотрудниками ФГБНУ ВНИИФ); методология картирования и проведения анализа ареалов и зон вредоносности патогенов культурных растений и сорняков, распространенных на территории Российской Федерации (ФГБНУ ВИЗР); методы анализа фитосанитарной ситуации на основе глобальных позиционных систем (ГПС), картирование распространения вредных организмов и вызывающих их ЧС с использованием ГИС (Московский НИИ сельского хозяйства «Немчиновка») [128].

Также можно воспользоваться системами многофакторного фитосанитарного анализа для управления защитой агроценозов от вредных организмов и поддержки правильных решений (СП-PP-DSS) система PRO PLANT EXPERT (Германия); PLANT-PLUS (фирма Dacom, Нидерланды), LANDBRUGS INFO (Дания), DESSAS (Англия). Немецкая компания разработала приложение Plantix, существует американская программа Simplot Spray Guide, мобильное приложение seeCrop (Великобритания).

В России формирование системы Agro IoT находится на ранней стадии. В 2016 г. был запущен продукт «Газпромэнергохолдинга» – пилотный проект сервис «АНТ» на базе предприятия холдинга «Агрокомплекс имени Н.И. Ткачёва». Приложение сервиса «Снимки» предназначено для выявления зон неоднородности (гиперспектральные снимки NDVI), программа позволяет заблаговременно идентифицировать болезни, вредителей и сорняки. Приложение

«БПЛА» загружает в систему снимки с коптеров и с их помощью вовремя фиксирует распространение заболеваний растений для целенаправленного внесения фунгицидов. В «Сколково» разработан сервис ExactFarming, с удобным для пользователя интерфейсом и бесплатным базовым уровнем до 500 га, которым уже пользуются более 4000 хозяйств в десяти странах мира.

Существует методика проведения фитомониторинга, предлагаемая ФГНУ «Россельхозцентр», которая включает в себя рандомный выбор и наблюдение за определенным количеством исследуемых площадок на поле либо определение вредных организмов на всей площади поля дистанционно с помощью приборов, установленных на летательных аппаратах, а в перспективе – при дистанционном сплошном зондировании территории со спутников. Подобные технологии являются перспективным направлением повышения эффективности защиты растений от патогенных организмов [129-131].

По оценке Агрофизического НИИ (Санкт-Петербург), российские аграрии только начинают внедрять технологии точного земледелия, сейчас те или иные элементы цифровых технологий используют около 5-10 % производителей. В странах Евросоюза их применяют примерно 80 % фермеров, в США – 60 % [132].

3. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ПАТОГЕНОВ В СЕЛЕКЦИИ И СЕМЕНОВОДСТВЕ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР

Для повышения эффективности овощеводства важно совершенствовать селекцию и семеноводство, так как сорт и высококачественные семена – главные элементы конкурентоспособных технологий возделывания сельскохозяйственных культур. Одним из элементов ускорения селекционного процесса, обеспечения отрасли чистосортным качественным посевным материалом и повышения продуктивности посевов за счет полного использования потенциальных возможностей сорта являются современные методы диагностики устойчивости к патогенам [133].

Селекция на устойчивость к патогенам – наиболее перспективный способ защиты растений. Она позволяет получить сорта и гибриды сельскохозяйственных культур с комплексной устойчивостью. Эффективность селекционного процесса можно повысить и ускорить за счет использования экспресс-методов, основанных на отборе в лабораторных условиях образцов, устойчивых к селективному фактору. Исследования в данном направлении проводились в лаборатории иммунитета ВНИИО – филиала ФГБНУ ФНЦО в Московской области. Образцами исходного материала служили три сорта моркови селекции ВНИИО, характеризующиеся различной устойчивостью к фузариозу и альтернариозу. Опыты были направлены на подбор оптимальной концентрации фильтрата культуральной жидкости (ф.к.ж.) и оценку растений на устойчивость к фузариозу и альтернариозу для разработки элемента методики экспресс-оценки моркови, основанный на проращивании семян на ф.к.ж. гриба *F. oxysporum* и *A. Radicina*. Результаты экспериментальной работы показали перспективность данного направления в селекции овощных культур, также была подобрана оптимальная концентрация фильтрата культуральной жидкости, составляющая 50 %. Разработанная специалистами технология обеспечивает возможность в лабораторных условиях в короткие сроки оценить большое количество селекционных образцов, в 3,4 раза сократить время, необходимое для оценки селекционного материала, и снизить расход семян, предназначенных для аналитических исследований [2].

В данном направлении проводилось диссертационное исследование Н.В. Ипатовой, в результате которого с использованием молекулярных методов диагностики патогенов была усовершенствована методика применения искусственного инфекционного фона для отбора устойчивых образцов моркови к фузариозу в период вегетации [134]. Подобраны ускоренные методы оценки коллекционного материала моркови первого года жизни на устойчивость к *Fusarium avenaceum* при искусственном заражении. В результате применения этих методов из 50 изученных образцов выделено 5 источников признака устойчивости к фузариозу. Разработаны элементы методики проведения клеточной селекции моркови на устойчивость к грибу *Fusarium avenaceum* и получены растения-регенеранты, устойчивые к этому патогену.

По данным материалов диссертационного исследования А.Н. Самохвалова, для повышения эффективности селекционной работы были экспериментально подобраны новые растения-индикаторы, обеспечивающие быструю диагностику и определение патогенности возбудителей сосудистого бактериоза капусты и угловатой бактериальной пятнистости огурца по реакции сверхчувствительности. Разработаны методические основы ускорения селекции белокочанной капусты, моркови, столовой свеклы и огурца на устойчивость к бактериальным и грибным болезням с учетом состава популяции патогенов в условиях Нечерноземной зоны и Западной Сибири.

Выделены новые источники устойчивости к отдельной и комплексу болезней овощей (капусты – к слизистому, сосудистому бактериозам и киле; моркови – бактериозу, фомозу и альтернариозу; столовой свеклы – фомозу и фузариозу; огурца – к угловатой бактериальной и оливковой пятнистостям).

Разработаны методы определения поверхностной и внутренней инфекции семян овощной фасоли и капусты с применением эффективных стерилизаторов и метода электронного парамагнитного резонанса [135].

Во ВНИИССОК на основе иммунологических, молекулярно-генетических и морфофизиологических методов диагностики коллекционного и селекционного материала овощных культур в условиях искусственного заражения, провокационного и естественного инфекционного фонов выделены источники резистентности основных овощных культур к экономически значимым болезням: капусты – к киле, свеклы столовой – церкоспорозу, фасоли овощной – вирусным болезням, лука – пероноспорозу. Скрининг селекционного материала, проводимый с целью выделения источников устойчивости и толерантности, способствовал созданию целого ряда сортов и гибридов овощных культур с групповой устойчивостью к болезням [4, 136].

Молекулярные методы выявления устойчивости к патогенам, основанные на ДНК-маркировании, могут использоваться в селекции генотипов с количественной устойчивостью к патогенам. Например, для фасоли МАС стал рутинным методом в селекционных программах на устойчивость к ржавчине, антракнозу, общим бактериальным гнилям и белой гнили [137-139].

Не менее важным элементом эффективного овощеводства является обеспечение чистоты посевного материала. При обязательной диагностике зараженности семян патогенами устанавливается наличие или отсутствие грибных и бактериальных возбудителей, их видовой состав и степень поражения. Согласно ГОСТ 12044-93 для визуального обнаружения в семенах головневых образований, склероциев спорыньи и других грибов, а также галлов пшеничной нематоды применяют макроскопический метод. Метод обмывки семян (суспензии спор) и центрифугирования подходит для определения наличия спор головни на поверхности семян злаковых культур и лука; спор возбудителей болезни пасмо на семенах льна; спор рамуляриоза на семенах кориандра; спор ржавчины на клубочках свеклы и семенах аниса; спор и мицелий церкоспороза на семенах фенхеля. Биологический метод используется для выявления внешней и внутренней зараженности семян болезнями. Он основан на стимуляции развития и роста микроорганизмов в зараженных семенах во влажной камере, на питательных средах, песке или в рулонах фильтровальной бумаги. Люминесцентный метод применяется для предварительного анализа зараженности семян болезнями.

В Агрофизическом НИИ совместно с ФНЦ овощеводства и Санкт-Петербургского электротехнического университета были предложены и проведены исследования качества семян, основанные на рентгенографии. С помощью визуального анализа рентгенограмм группы поврежденных семян была рассчитана их всхожесть без предварительного проращивания. Данный метод был апробирован на семенах томата и перца селекционерами ВНИИ овощеводства (Гущин, 2001) с целью выявления труднопрорастающих семян. В результате достоверность оценки посевных качеств семян перца сладкого составила около 80 %.

Был разработан метод микрофокусной мягколучевой рентгенографии семян овощных культур, он характеризуется быстротой и легкостью исполнения. Это полный автоматический анализ качества семян, апробирована первая версия программы под рабочим названием «Сортсемконтроль-1,0». К недостаткам метода следует отнести необходимость участия квалифицированного оператора для

оценки полученных рентгеновских изображений; наличие фактора субъективизма; отсутствие четких количественных показателей и характеристик качества семян на базе простого визуального анализа получаемых снимков [140].

В ФНЦ овощеводства зараженность семян патогенными микроорганизмами на примере вигны устанавливали по ГОСТ 12044-93 (аналогично фасоли) методами микологического анализа и «влажной камеры» [79].

Использование метода молекулярной диагностики фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma solani* перспективно для сравнения степени заражения некоторых сортов томата на разных стадиях развития растений и в процессе селекции устойчивых генотипов [141].

Оценку и отбор коллекционного и селекционного материала в лаборатории селекции и семеноводства бобовых культур ФГБНУ ФНЦО на устойчивость к вирусу желтой мозаики фасоли – ВЖМФ на культуре фасоли проводили методами визуальной диагностики, серологической диагностики, биотестирования и электронной микроскопии. Отобранные в результате исследований образцы включены в селекционную программу ФГБНУ ФНЦО по созданию высокопродуктивных сортов фасоли овощной, отвечающих требованиям современного рынка. Методы визуальной диагностики и микроскопирования позволили выявить сорта и гибриды свеклы столовой, устойчивые к церкоспорозу [142-144].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Эффективная защита овощных растений от патогенных микроорганизмов включает в себя их изучение, дающее научную основу для выработки профилактических мероприятий, к которым относятся фитопрочистка; пространственная изоляция культивируемых растений от источников инфекции; использование для посадки здорового семенного материала; посев в почву, свободную от инфекции; уничтожение сорняков-резервуаров инфекции; соблюдение оптимальных сроков, норм посева и густоты посадок; применение химических и биологических средств в борьбе с переносчиками и использование устойчивых сортов.

Подходы, применяемые в защите растений от инфекций, определяются также особенностями взаимоотношений в системе патоген-растение, ее исследование имеет практическое значение для решения вопросов повышения иммунитета растений. Если перечисленных профилактических мероприятий и повышения иммунитета культурного растения оказалось недостаточно, в технологиях его защиты от патогенов прибегают к современным методам диагностики.

В фитосанитарных мероприятиях по обеспечению здоровья овощных растений сохраняется важная роль визуальных и микроскопических методов для определения возбудителей болезней. Они отличаются дешевизной, доступностью и применяются практически всеми специалистами агрономами и фитопатолагами, особенно на первых этапах диагностики.

Серологические методы диагностики на основе иммунохроматографии, представленные ИХА тест-системами, позволяют проводить анализ непосредственно в поле за 10-15 мин. Однако технологии на основе метода иммунохроматографии обладают низкой, по сравнению с иммуноферментным анализом (ИФА), а также молекулярными методами на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), чувствительностью и специфичностью, и в большинстве случаев коммерчески доступны только в формате «один тест – один патоген».

ИФА высокочувствителен, точен, позволяет количественно определять до 1 нг/мл патогена в экстрактах. Его применение обеспечивает выявление довизуальных признаков проявления болезней растений, но для его реализации необходим квалифицированный персонал и требуется дорогостоящее оборудование, что, несмотря на большую перспективность, ограничивает область применения ИФА специализированными лабораториями. Наибольшую практическую доступность получил вариант твёрдофазного ИФА-ELISA, имеются коммерческие диагностические системы, основанные на ИФА в форме ELISA, но количество определяемых с их помощью патогенов ограничено.

Молекулярные методы диагностики, основанные на ПЦР, могут выявлять в растительной ткани присутствие минимального количества ДНК и РНК патогенного организма, отличаются высокой чувствительностью и специфичностью, наличием количественной

оценки присутствия объекта. Они подходят для определения патогенов на этапе довизуального проявления болезни, что перспективно при диагностике заражения посадочного и посевного материала, выявления карантинных объектов, идентификации патогенов. Многие научные, образовательные и производственные организации (ФГБНУ ВНИИФ, ФГБНУ ВНИИКХ имени Лорха, ФГБУ ВНИИКР, ООО «АгроДиагностика», ООО ГенБит) имеют разработки в области оптимизации процесса проведения ПЦР, протестированные в практических условиях. На российском рынке наиболее широкий ассортимент диагностических наборов для определения фитопатогенов предлагает ООО «АгроДиагностика».

На основе молекулярного метода гибридизации разработаны микрочипы для одновременного обнаружения более чем 40 грибов и 10 почвенных бактерий патогенов растений.

Широкое использование молекулярных методов сдерживается дороговизной приборов и реактивов, строгими требованиями к организации помещений лаборатории и квалификации персонала. Еще одним ограничением для диагностики с использованием ПЦР является отсутствие коммерческих тест-систем для многих патогенов.

Для сохранения необходимой фитосанитарной ситуации в качестве обязательного элемента диагностики можно рекомендовать мониторинг посевов и посадок, проводимый с использованием последних достижений в области интеллектуальных и цифровых технологий. На основании проведенного анализа для эффективной диагностики патогенов овощных культур, особенно для определения вирусных патогенов, предлагается использовать метод растений-индикаторов, позволяющий достаточно быстро оценить фитопатологическую ситуацию и принять необходимые защитные меры. Как наиболее точные и эффективные методы диагностики возбудителей болезней овощных культур рекомендуются молекулярные и серологические методы, а также их комбинации.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Прозина Т.С., Федоскина И.В.** Состояние и перспективы развития рынка овощей в России // Юность и знания. Гарантия успеха. – 2019. – Т. 4. – С. 216-218.

2. **Соколова Л.М., Егорова А.А.** Экспресс-оценка устойчивости моркови столовой к грибным болезням pp. *Alternaria* и *Fusarium* на фильтрат культуральной жидкости // Вестник Алтайского ГАУ. – 2019. – № 3 (173). – С. 36-42.

3. **Фоминых Т.С.** Диагностика вирусных заболеваний овощных культур защищенного грунта и меры борьбы с ними: учеб.-метод. пособие. – СПб: ВИЗР, 2006. – 20 с.

4. **Солдатенко А.В., Пивоваров В.Ф., Пышная О.Н., Гуркина Л.К.** Патриарху отечественного овощеводства – вековой юбилей // Овощи России. – 2020; (4):3-11. <http://doi.org/10.18619/2072-9146-2020-4-3-11>.

5. **Алексеева К.Л., Иванова М.И.** Болезни зеленных овощных культур (диагностика, профилактика, защита). – М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2015. – 188 с.

6. **Соколова Л.М., Иванова М.И.** Грибковые болезни на пастернаке посевном (*Pastinaca sativa* L.) // Агропромышленные технологии Центральной России. – 2018. – Вып. 2 (№8). – С.48-55. DOI 10.24888/2541-7835-2018-8-48-55.

7. **Соколова Л.М., Иванова М.И.** *Pythium spp.* на петрушке корневой в условиях Московской области // Вестник Алтайского ГАУ. – 2018. – № 4 (162). – С. 75-80.

8. **Richard N. Strange, Peter R. Scott.** Plant Disease / A Threat to Global Food Security / Annu. Rev. Phytopathol. 2005. – 43: P.83-11649.

9. **Фундаментальная фиопатология / под ред. Ю.Т. Дьякова.** – М.: Кранд, 2012. – 512 с.

10. **Scholthof, K. B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., et al.** (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology, 12, 938-954. DOI:10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x.

11. **Antignus Y., Lachman O., Pearlsmand M., Gofman R., Bar-Joseph M.** A new disease of greenhouse tomatoes in Israel caused by a distinct strain to Tomato apical stunt viroid (TASVd) // Phytoparasitica, 2002. 30(5): 502-510.

12. **Ха Тхи Куинь Чанг.** Распространение и патогенез вирусных заболеваний томата в условиях Вьетнама и России: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2013. – 20 с.

13. **Фоминых Т.С.** Рекомендации по защите томата и перца от вирусных и фитоплазменных болезней: учеб. пособие / Т.С. Фоминых, Д.З. Богоутдинов, Е.Б. Белых и др. – М.: Россельхозцентр, 2010. – 56 с.

14. **Келдыш М.А., Червякова О.Н., Помазков Ю.И.** Новые вирусы овощных культур // Защита и карантин растений. – 2016. – №11. – С. 29-31.

15. **Келдыш М.А., Червякова О.Н.** Особенности мониторинга вирусных инфекций в экосистемах овощных культур // Гавриш. – 2004. – №2. – С. 22-24.

16. **Леонтьева Ю.А., Марковская Г.К., Можяева К.А.** и др. Методические указания по диагностике вириода веретеновидности клубней картофеля (ВВКК) и карликовости хризантем (ВКХр): метод. пособие – М.: ВАСХНИЛ, 1988. – 43 с.

17. **Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T.** (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28(12): 63e-63. DOI:10.1093/nar/28.12. e63. PMC102748. PMID10871386.

18. US patent 6410278, Notomi T., Hase T. Process for synthesizing nucleic acid, published 2002-06-25, assigned to Eiken Kagaku Kabushiki Kaisha.

19. **Самсонова Л.Н., Власов Ю.И., Богоутдинов Д.З., Расулова М., Сакалиева Д., Беседина В.А., Медведская И.Г., Макарова О.О.** Методические указания по комплексному изучению микоплазмозов растений на примере столбура томатов. – СПб: ВИЗР, 1991. – 40 с.

20. PM 7/2 (2) Tobacco ringspot virus // Bulletin OEPP/EPPO, 2017. v. 47 (2). p. 135-145 DOI: 10.1111/epp.12376.

21. **Келдыш М.А., Помазков Ю.И.** Вирусы, вириоды и микоплазмы растений: учеб. пособие (краткий курс). – М.: РУДН, 2003. – 157 с.

22. Материалы сайтов [Электронный ресурс]. Режим доступа свободный: <https://web.archive.org/web/20060908014250/>; [/http://phene.cpmc.columbia.edu](http://phene.cpmc.columbia.edu) (дата обращения: 16.08.2020).

23. OEPP/EPPO Bulletin 35, 313-318 © 2005 OEPP/EPPO [Электронный ресурс]. Режим доступа свободный: <https://gd.eppo.int/taxon/TORSV0/documents> (дата обращения: 13.10.2020).

24. **Keldish, M.; Pomazkov, Y.; Arushanova, E.; Chervyakova, O.** (1998) *Acta Horticulturae* 472, 147-152. Moscow.

25. **Munyanzeza J.E., Lemmetty A., Nissinen A.I., Sengoda V.G., Fisher T.W.** Molecular detection of aster yellows phytoplasma and “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” in carrots affected by the psyllid *Triozia apicalis* (Hemiptera: Triozidae) in Finland. *Journal of Plant Pathology*, 2011. 93(3): 697-700. <http://sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/1237>.

26. **Дунин М. С., Попова Н.И.** Капельный метод анализа вирусов в растениеводстве. – М.: Сельхозгиз, 1937. – С. 64-67.

27. **Gordeichuk, O.G.** (1975) *Trudy Biologo-Pochvennogo Instituta* 28 (2). 171-173. In *Rubus and Ribes in the Primorsk region*.

28. **Gordejchuk, O.G.; Krylov, A.V.; Samonina, I.N.** (1977) *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, 2 132 (8), 686-707. – In *Rubus and Ribes in Primorye Territory, Far East*.

29. **Prikhodko Y.N., Shneider Y.A., Zhivaeva T.S.** (2013) Tomato ringspot virus (ToRSV) – a dangerous pathogen of agricultural crops. *Plant Health Research and Practice* 4(6), 51-57.

30. **Romanenko, N.D.; Nasrollanejad, S.; Beloshapkina, O.O.** (2004) In: *Parasitic Nematodes of Plants and Insects* (Ed. by Sonin, M.D.), 171-182, 313. Nauka, Moscow, Russia. – Moscow. On potato (*Solanum tuberosum*).

31. Материалы сайта [Электронный ресурс]. Режим доступа свободный: <https://core.ac.uk/download/pdf/194727804.pdf> (дата обращения: 10.07.2020).

32. Материалы сайта [Электронный ресурс]. Режим доступа свободный: <https://www.researchgate.net/publication/257801648> (дата обращения: 16.03.2020).

33. **Lisovskaya A.V.** (1989) *Byulleten' Glavnogo Botanicheskogo Sada* 153, 74-76.

34. **Kastalyeva T.B.** Molecular Properties of Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) Isolates of the Russian Research Institute of Phytopathology // T. B. Kastalyeva, N. V. Girsova, K.A. Mozhaeva, Ing Ming Lee, and R. A. Owens. ISSN 0026 8933 // *Molecular Biology*, 2013, Vol. 47, №1, pp. 85-96.

35. Материалы сайта [Электронный ресурс]. Режим доступа свободный: [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00418-9](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00418-9) (дата обращения: 16.03.2020).

36. **Hanssen I. M., Lapidot M., and Thomma B. P. H. J.** Emerging Viral Diseases of Tomato Crops // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2010. Vol. 23, №5, pp. 539-548. DOI:10.1094/MPMI-23-5-0539.

37. **Антонова В.В., Ларина Э.И., Лещева О.М.** Методы выявления очагов вируса (Rattle virus) и нематод – его переносчиков // *Биологические*

основы борьбы с нематодами / Тр. ВИЗР (ред. Новожилов К.В.). – Л.: ВИЗР, 1982. – С. 82.

38. **Ахатов А.К.** Огурцы и томаты в теплицах // Защита и карантин растений: приложение. – 2011. – №2. – 144 с.

39. **Богоутдинов Д.З.** Фитоплазмы картофеля и методы их изучения: науч.-метод. пособие. – Самара, 2000. – 34 с.

40. **Богоутдинов Д.З.** Фитоплазмы картофеля // Агро XXI. – 2001. – №7. – С. 10.

41. **Богоутдинов Д.З., Паршин В.Г., Барбарицкий А.Ю.** и др. Рекомендации по защите овощных культур и картофеля от столбура. – Ростов-на-Дону, 2004. – 15 с.

42. **Богоутдинов Д.З.** Эволюционные аспекты природной очаговости фитоплазмозов // Совещание по вирусным болезням растений, посвященное 75-летию Ю.И. Власова: сб. науч. трудов. СПб-Пушкин, 2005. – С. 44-51.

43. **Богоутдинов Д.З., Валюнас Д., Навалинскене М., Самуйтене М.** О видовой идентификации возбудителей фитоплазмозов паслёновых культур // С.-х. биология. – 2008. – №1. – С. 77-80.

44. **Богоутдинов Д.З.** Вироидные, вирусные и фитоплазменные болезни хмеля // АгроXXI. – 2014. – №7-9. – С. 20-23.

45. Детекция вирусов [Электронный ресурс]. Режим доступа свободный: https://www.researchgate.net/publication/257801648_Detection_of_five_viruses_infecting_dormant_bulbs_by_TaqMan-based_real-time_RT-PCR (дата обращения: 03.03.2020).

46. **Атабеков И.Г., Морозов С.Ю., Дрыгин Ю.Ф., Кондакова О.А., Савенков Е.И., Можаяева К.А., Васильева Т.Я., Кастальева Т.Б.** Методические указания по диагностике ВВКК. – М., 1999. – 24 с.

47. Occurrence of Alfalfa Mosaic Virus AMV Diseases on Potato Crops in Northern Cyprus [Электронный ресурс]. Режим доступа свободный: http://www.researchgate.net/publication/262841245_Occurrence_of_Alfalfa_Mosaic_Virus_AMV_Diseases_on_Potato_Crops_in_Northern_Cyprus (дата обращения: 20.09.2020).

48. **Фоминых Т.С.** Система мероприятий по защите овощных культур от вирусных и фитоплазменных болезней в условиях Астраханской области РФ / Т. С. Фоминых, Д.З. Богоутдинов, Г. П. Иванова и др. – Астрахань, 2012. – 116 с.

49. **Фоминых Т.С., Зорина Е.А.** Вирусные болезни пасленовых культур на юге России // Картофель и овощи. – №7. – 2014. – С. 28-29.

50. **Иорданова Н.Д.** Диагностика вирусов в плодах томатов и огурцов методом включений: автореф. канд. биол. наук. (540) / Всесоюз. акад. с.-х. наук им. В.И. Ленина. Всесоюз. науч.-исслед. ин-т защиты растений. – Ленинград: [б.и.], 1972. – 24 с.

51. **Гнутова Р.В., Золотарева Е.В.** Болезни овощных культур и картофеля на Дальнем Востоке России. – Владивосток: Дальнаука, 2011. – 172 с.

52. **Гнутова Р.В.** Идентификация дальневосточного изолята вируса желтой мозаики фасоли на растениях тыквы / Гнутова Р.В., Толкач В.Ф. // С.-х. биология. – 2007. – № 3. – С. 34.

53. **Гнутова Р.В.** Таксономия вирусов растений Дальнего Востока России. – Владивосток: Дальнаука, 2009. – 468 с.

54. **Zakubanskiy A.V., Mitrofanova I.V., Chirkov S.N.** First report of moroccan pepper virus on clematis in russia and worldwide // Plant Disease. – 2018. – Vol. 102, № 7. – P. 1469. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-10-17-1646-PDN>.

55. **Енгальчева И.А., Козарь Е.Г.** Основные направления исследований вирусных болезней овощных культур в ФГБНУ ФНЦО (Мониторинг, иммунитет, источники устойчивости) // Аграрная наука. – 2019. – № 3. – С. 79-85. <http://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-3-79-85>

56. **Игнатов А.Н., Челидзе Г.Г., Воробьева К.С.** Риски распространения в РФ новых вирусных и бактериальных болезней овощных культур через предприятия защищенного грунта // Главный сайт для агрономов России <http://glavagronom.ru/articles/riski-rasprostraneniya-v-rf-novyh-virusnyh-i-bakterialnyh-bolezney-ovoshchnyh-kultur-cherez-predpriyatiya-zashchishchennogo-grunta>

57. Вирусы овощных культур и картофеля [Электронный ресурс]. Режим доступа свободный: <http://rosselhoscenter.com/otdel-zashchity-rastenij-28/5954-virusy-ovoshchnykh-kultur-i-kartofelya> (дата обращения: 16.03.2020).

58. **Енгальчева И.А., Козарь Е.Г., Антошкин А.А., Пронина Е.П., Волков Ю.Г., Какарека Н.Н., Щелканов М.Ю., Гапека А.В.** Перспективы селекции овощных культур семейства FABACEAE на устойчивость к вирусу жёлтой мозаики фасоли (*Potyvirus, Potyviridae*) в условиях Московской области // Овощи России. – 2018; (6): 77-83. DOI:10.18619/2072-9146-2018-6-77-83.

59. Толкач В.Ф., Какарека Н.Н., Волков Ю.Г., Козловская З.Н., Сапоцкий М.В., Плешакова Т.И., Дьяконов К.П., Щелканов М.Ю. Вирусные болезни овощных и бахчевых сельскохозяйственных культур на юге Дальнего Востока // Юг России: экология, развитие. – 2019. – Т. 14. – №4. – С. 121-133. DOI: 10.18470/1992-1098-2019-4-121-133.

60. Гнутова Р.В. Вирусные инфекции овощных бобовых культур и сои на Дальнем Востоке // Защита и карантин растений. – 2013. – №1. – С. 14-18; <http://cyberleninka.ru/article/n/virusnye-infektsii-ovoschnyh-bobovyh-kultur-i-soi-na-dalnem-vostoke>

61. Гнутова Р.В. Возбудители вирусных заболеваний овощных культур в Дальневосточном регионе // С.-х. биология. – 2007. – № 1. – С. 56-73. <http://new.z-pdf.ru/33biologiya/2785-1-udk-6351-8-57885-86-vozbuditeli-virusnih-zabolevaniy-ovoschnih-kultur-dalnevostochnom-r.php>

62. Шнейдер Ю.А. Приходько Ю.Н. Живаева Т.С. Белошапкина О.О. Госповирусы на декоративных культурах // Защита и карантин растений. – 2010. – №5. – С. 32-34.

63. Гнутова Р.В. разнообразие вирусов растений в Восточноазиатском регионе России: итоги 50-летнего изучения // С.-х. биология. – 2014. – № 5. – С. 16-27.

64. Фоминых Т.С., Богоудинов Д.З. Диагностика вирусных, виroidных и фитоплазменных болезней овощных культур и картофеля. – ВИЗР, 2017. – 96 с.

65. Богоудинов Д. З., Гирсова Н. В., Кастальева Т. Б. Анализ видового состава растений, поражаемых фитоплазмой группы столбура // Таврический вестник аграрной науки. – 2020. – №3(23). – С. 26-42. http://tvan.niishk.ru/data/documents/TVAN_323_2020_Final.pdf

66. Гирсова Н.В, Кастальева Т.Б., Можаева К.А. Методика определения фитоплазм с использованием молекулярных методов диагностики: ПЦР и ПДРФ. – М.: Россельхозакадемия, 2013. – 23 с.

67. Цыпленков А.Е., Федотина В.Л. О природе и классификации двух форм столбура томатов // Биологические науки. – 1973. – № 5. – С. 100-106.

68. Цыпленков А.Е., Паршин В.Г. Идентификация штаммов вируса огуречной мозаики различных сельскохозяйственных культур // С.х. биол. – 1993. – № 5. – С. 115-121.

69. Богоудинов Д.З., Кинчарова М.Н., Леонтьева Ю.А. Некоторые результаты изучения вируса мозаики томата, виroidа веретеновид-

ности клубней картофеля, возбудителя столбура в условиях Самарской области // Защита растений в условиях реформирования АПК: тез. докл. Всеросс. съезда по защите растений. – СПб, 1995. – С. 162-163.

70. **Самсонова Л.Н., Богоутдинов Д.З.** Роль смешанных инфекций при заболевании томатов столбуром // Вирусные эпифитотии и пути их предупреждения: сб. науч. трудов / ВИЗР. – СПб, 1993. – С. 49-54.

71. **Власов Ю.И.** Природная очаговость вирусных и фитоплазменных болезней растений: учеб.-метод. пособие. – СПб, 1999. – 33 с.

72. **Можаева К.А., Кастальева Т.Б., Гирсова Н.В.** Вироид веретеновидности клубней картофеля в России: распространение, диагностика, элиминирование из семенного материала // Научное обеспечение и инновационное развитие картофелеводства: матер. конф. / РАСХН: ВНИИКХ; ред. Е.А. Симакова. – М., 2008. – Т. 2. – С. 48-58.

73. **Герасимов Б.С.** Энтомофауна картофельного поля // Известия Куйбышевского СХИ. – 1971. – Т. 29. – Вып. 1. – С. 207-214.

74. **Гирсова Н.В.** Вироид веретеновидности клубней картофеля: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М.: Б. Вязёмы, 2003. – 22 с.

75. **Matsushita Y., Yanagisawa H., Khiutti A., Mironenko N., Ohto Y., Afanasenko O.** First report of chrysanthemum stunt viroid isolated from potato (*Solanum tuberosum*) plants in Russia // Journal of General Plant Pathology, 2019. Vol. 85. P. 311-313. <http://doi.org/10.1007/s10327-019-00851-z>.

76. **Романова С.А., Леднёва В.А., Бровко Г.А.** Новая болезнь томатов в Приморском крае // Картофель и овощи. – 2001. – № 2. – С.46.

77. **Шелудько Ю.М.** Вироиды – новый класс патогенов / Ю.М. Шелудько, В. Г. Рейфман. – М.: Наука, 1978. – 86 с.

78. **Дьяков Ю.Т., Еланский С.Н.** Общая фитопатология: учеб. пособ. для академического бакалавриата. – М.: Юрайт, 2018. – 230 с.

79. **Фотев Ю.В., Казакова О.А.** Грибные заболевания спаржевой вигны на юге Западной Сибири // Овощи России. – 2019; (2):97-105. <http://DOI.org/10.18619/2072-9146-2019-2-97-105>.

80. **Bonantz, P.J.M., Shoen, C.D., Szemes, M., Speksnijder, A., Klerks, M.M., van den Boogert, P.H.J.F., Waalwijk, C., van der Wolf, J.M. et al.** (2005) From single to multiple detection of plant pathogens: pUMA, a new concept of multiplex detection using microarrays. *Phytopathol* Pol35, 29-47.

81. **Власов Ю. И.** Сельскохозяйственная вирусология / Ю. И. Власов, Э. И. Ларина. – М.: Колос, 1982. – 238 с.

82. **Geojith G., Dhanasekaran S., Chandran S.P., Kenneth J.** (2011). Efficacy of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the laboratory identification of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a resource limited setting. *J. Microbiol. Methods*. 84 (1): 71-3. DOI: 10.1016/j.mimet.2010.10.015. PMID 21047534.

83. **Нетесова И.Г., Бобкова М.Р.** Внутривлабораторный контроль качества неколичественных методов ИФА: информ.-метод. пособие. – Новосибирск: Вектор-Бест, 2011. – 20 с.

84. **Павловская Н.Е.** Создание тест-систем для идентификации фитопатогенов методом твердофазного иммуноферментного анализа /Н.Е. Павловская, И.Ю. Солохина, А.В. Лушников // *Биология в сел. хоз-ве.* – Орел ГАУ. – 2015. – №4(9). – С. 5.

85. **Гришечкина Л.Д.** Проблемы защиты овощных культур от болезней в теплицах. – Л.: ВИЗР, 1990. – 28 с.

86. **Blokhina, O.** Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress/ O. Blokhina, E. Virolainen, K.V. Fagerstedt // *Ann. Bot.* 2003. V. 91. P. 179-194.

87. **Clark M.F. and Adams A.N.** 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immuno-sorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol* 34: 475-483.

88. **Kaminska-Rozek, E., Pukacki, P.** Effect of water deficit on oxidative stress and degradation of cell membranes in needles of Norway spruce (*Picea abies*) // *Acta physiol. plant.* 26: 2004. P. 431-442.

89. **Palatnik, J. F., Carrillo, N., Valle, E.M.** The role of photosynthetic electron transport in the oxidative degradation of chloroplastic glutamine synthetase // *Plant Physiol.* 121: 1999. P.471-478.

90. **Белик В.Ф.** Методика физиологических исследований в овощеводстве и бахчеводстве. – М.: Колос, 1982. – 388 с.

91. **Боос Г.В.** Овощные культуры в закрытом грунте. – Л.: Колос, 1968. – 272 с.

92. Практические рекомендации по использованию методов довизуальной диагностики вирусных заболеваний овощной продукции: / Составители Павловская Н.Е., Гнеушева И.А., Солохина И.Ю. – Орел: Орловский ГАУ, 2017. – 40 с.

93. Агдия [Электронный ресурс]. Режим доступа свободный: https://www.agdia-emea.com/en/product_category/corn?page=2 (дата обращения: 10.08.2020).

94. **Чирков С.Н.** Иммунохимическая и молекулярная диагностика вирусных инфекций растений: автореф. дис. ... д-ра биол.наук (03.00.06, 03.00.23). – М., 2009. – 51 с.

95. **Усков А.И.** Биотехнологические основы повышения эффективности воспроизводства исходного материала в оригинальном семеноводстве картофеля: дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.05 // Всерос. науч.-исслед. ин-т овощеводства. – М., 2013. – 314 с.: ил.

96. **Матяшова Г.Н., Заец В.Г.** Исследование метода ПЦР в режиме «реального времени» для обнаружения и идентификации возбудителей фитоплазмозов винограда // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. – 2015. – №4. – С. 7-14. <http://cyberleninka.ru/article/n/issledovanie-metoda-ptsr-v-rezhime-realnogo-vremeni-dlya-obnaruzheniya-i-identifikatsii-vozbuditeley-fitoplazmozov-vinograda><https://cyberleninka.ru/article/n/issledovanie-metoda-ptsr-v-rezhime-realnogo-vremeni-dlya-obnaruzheniya-i-identifikatsii-vozbuditeley-fitoplazmozov>

97. **Nikitin M.M., Statsyuk N.V., Frantsuzov P.A., Dzhavakhiya V.G., Golikov A.G.** Matrix approach to the simultaneous detection of multiple potato pathogens by real-time PCR *Journal of Applied Microbiology* DOI:10.1111/jam.13686.

98. **Lee I.-M., Zhao Y., Davis R.E., Wei W., Martini M.** Prospects of DNA-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas // *Bulletin of insectology*. 2007. V. 60 (2). P. 239-244. [Электронный ресурс]. Режим доступа: URL: <http://www.journals4free.com/link.jsp?l=6690999> (дата обращения: 27.01.2020).

99. **Wei W., Davis R. E., Lee I.-M., Zhao Y.** Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2007. Vol. 57. P. 1855–1867. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/57/8/1855.pdf?expires=1487267339&id=id&accname=guest&checksum=A96EEDA3619BFD6CEEEE551F942335F7>

100. Фитопатология [Электронный ресурс]. Режим доступа свободный: <http://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi> (дата обращения: 16.03.2020).

101. NCBI [Электронный ресурс]. Режим доступа свободный: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (дата обращения: 21.10.2020).

102. **Martini, M., Bottner-Parker, K.D., Lee, I.** (2018). PCR-based sequence analysis on multiple genes other than 16S rRNA gene for differentiation of phytoplasmas. In: Musetti, R., Pagliari, L. *Phytoplasmas: Methods and Protocols*. Basel, Switzerland: Springer. 1875: 97-115.

103. **Park, Gun-Soo; Ku, Keunbon; Baek, Seung-Hwa; Kim, Seong-Jun; Kim, Seung Il; Kim, Bum-Tae; Maeng, Jin-Soo** (2020). Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *The Journal of Molecular Diagnostics*. 22 (6): 729-735. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2020.03.006. PMC 7144851. PMID 32276051.

104. **Curtis K.A., Rudolph D.L., Owen S.M.** (2008). Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J. Virol. Methods*. 151(2): 264-70. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.04.011. PMID 18524393.

105. **Ponaka, Reddy V.** et al. AMP 2015 [http:// www.ilmars.org.il/diasorin/MBI_AMP2015_MalariaPoster102715.pdf](http://www.ilmars.org.il/diasorin/MBI_AMP2015_MalariaPoster102715.pdf) Archived2016-11-20 at the Wayback Machine.

106. **Girsova N., Kromina K., Kastalyeva T., Mozhaeva K., Owens R.** Mlecular structure of Russian isolates of potato spindle tuber viroid // *Zemdirbyste-Agriculture*, 2008. Vol. 95. № 3. P. 266-269. [http://193.219.178.8/tomai/95\(3\)tomas/95\(3\)tomas_266_269.pdf](http://193.219.178.8/tomai/95(3)tomas/95(3)tomas_266_269.pdf).

107. **Абросимова С.Б., Приходько Ю.Н.** Диагностика вириода веретеновидности клубней картофеля // *Карантин растений*. 2015. № 4 (14). С. 30-37; <http://rsn-msk.ru/files/karantin-14-2015.pdf>.

108. Синтол [Электронный ресурс]. Режим доступа свободный: <http://www.syntol.ru/syntolprice110920.pdf?v=1> (дата обращения: 05.07.2020).

109. **Nelson W.R., Fisher T.W., Munyaneza J.E.,** 2011. Haplotypes of “*Candidatus Liberibacter solanacearum*” suggest long-standing separation. *European Journal of Plant Pathology*, 130(1): 5-12.

110. **Барейко А.А., Потуремский Д.С., Купцов В.Н., Валентович Л.Н., Сидоренко А.В., Титок М.А., Коломиец Э.И.** Молекулярно-генетическая диагностика грибных и бактериальных заболеваний овощных культур // *Матер. VI Междунар. конф. молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов: сб. тезисов.* – 2019. – С. 26-29.

111. **Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T.** (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from mag-

nesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289 (1): 150-4. DOI: 10.1006. PMID 11708792.

112. **Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T.** (2004). Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 59 (2): 145-57. DOI: 10.1016/j.jbbm.2003.12.005. PMID 15163526.

113. **Njiru Z.K., Mikosza A.S., Armstrong T., Enyaru J.C., Ndung'u J.M., Thompson A.R.** (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLOS Negl Trop Dis.* 2 (1): e147. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000147. PMC 2238707. PMID 18253475.

114. **Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T.** (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc.* 3 (5): 877-82. DOI:10.1038/nprot.2008.57. PMID 18451795.

115. **Arunrut, Narong; Kampeera, Jantana; Sirithammajak, Sarawut; Sanguanrut, Piyachat; Proespraiwong, Porranee; Suebsing, Rungkarn; Kitathomchai, Wansika** (2016). Sensitive Visual Detection of AHPND Bacteria Using Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with DNA-Functionalized Gold Nanoparticles as Probes. *PLOS ONE.* 11 (3): e0151769. Bibcode: 2016PLoSO.1151769A. DOI: 10.1371/journal.pone.0151769. PMC 4803327. PMID 27003504.

116. Jump up to: ab Sen K, Ashbolt NJ (2011). *Environmental microbiology: current technology and water application.* Norfolk, UK: Caister Academic Press.

117. **Macarthur G.** (2009). *Global health diagnostics: research, development and regulation.* Academy of Medical Sciences Workshop Report (PDF). Academy of Medical Sciences (Great Britain). ISBN 978-1-903401-20-0. Archived from the original (PDF) on 2018-05-16. Retrieved 2014-05-05.

118. **Sattabongkot J., Tsuboi T., Han E.T., Bantuchai S., Buates S.** (2014). Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of malaria infections in an area of endemicity in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 52 (5): 1471-7. DOI:10.1128/JCM.03313-13. PMC 3993686. PMID 24574279.

119. **Francois P., Tangomo M., Hibbs J., Bonetti E.J., Boehme C.C., Notomi T., Perkins M.D., Schrenzel J.** (2011). Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62 (1): 41-8. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2011.00785. x. PMID 21276085.

120. **Torres C., Vitalis E.A., Baker B.R., Gardner S.N., Torres M.W., Dzenitis J.M.** (2011). LAVA: an open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures. *BMC Bioinformatics*. 12: 240. DOI: 10.1186/1471-2105-12-240. PMC 3213686. PMID 21679460.

121. **Iseki, Hiroshi; Alhassan, Andy; Ohta, Naomi; Thekiso, Oriol M.M.; Yokoyama, Naoaki; Inoue, Noboru; Nambota, Andrew; Yasuda, Jun; Igarashi, Ikuo** (December 2007). Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *Journal of Microbiological Methods*. 71 (3): 281-7. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.09.019. PMID 18029039.

122. **Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C.** (August 2012). Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *BioTechniques*. 53 (2): 81-9. DOI: 10.2144/0000113902. PMID 23030060.

123. **Морозова О.Н., Шнейдер Ю.А., Приходько Ю.Н., Белошапкина О.О.** Обработка методов диагностики вирусов некротической пятнистости бальзамина и бронзовости томата в растениях-хозяевах и насекомых-переносчиках // Карантин растений. Наука и практика. – 2017. – № 4 (22). – С. 25-28.

124. **Мамедов М.И., Пышная О.Н., Джос Е.А., Енгальчева И.А., Козловская Е.А.** Мониторинг вирусной инфекции на растениях перца в условиях защищенного и открытого грунта различных климатических зон // Овощи России. – 2017. – № 3 (36). – С. 86-92.

125. **Богоутдинов Д.З., Кастальева Т.Б., Гирсова Н.В., Самсонова Л.Н.** Фитоплазменные болезни: исторический обзор к 50-летию открытия фитоплазмозов // С.-х. биология. – 2019. – Т. 54. – С. 3-18. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.1.3rus.

126. **Богоутдинов Д.З., Кастальева Т.Б., Гирсова Н.В.** Фитоплазменные болезни – серьезная опасность для растениеводства России // Таврический вестник аграрной науки. – 2018. – №2 (14). – С. 34. DOI: 10.25637/TVAN.2018.02.02.

127. **Мироненко Л., Тайлакова В., Калягина Е.И.** Фитосанитарная информатика // Актуальные проблемы агропромышленного комплекса: сб. тр. науч.-практ. конф. преподавателей, студентов, магистрантов и аспирантов, посвящ. 80-летию Новосибирского ГАУ (г. Новосибирск, 7-11 ноября 2016 г.). – Т. Экономические науки / Новосибирский ГАУ. – Новосибирск: ИЦ «Золотой колос», 2016. – С. 216-220.

128. **Ибрагимов Т.З., Рулева О.М., Карлова Л.В.** Интеллектуальный анализ данных в защите растений // Эпидемии болезней растений: мониторинг, прогноз, контроль: матер. Междунар. конф. (Большие Вяземы, Московская обл., 13-17 ноября 2017 г.). – Вып. 8. – С. 220-224.

129. **Захаренко В.А.** Мониторинг фитосанитарного состояния агроэкосистем как инструмент повышения эффективности защиты растений // Защита и карантин растений. – 2018. – № 6. – С. 14-17.

130. Россельхозцентр [Электронный ресурс]. Режим доступа свободный: <http://rosselkhozcenter.com/index.php/regions/central/875-moskva/novosti/23660-informsistema-o-zemlyakh-selkhoznaznacheniya-i-kompleks-tsifrovoj-fitomonitoring-budut-integrirovany> (дата обращения: 16.03.2020).

131. **Прошкин Ю.А.** Применение технологий компьютерного зрения и спектрального анализа для неинвазивных методов исследования растений // Электротехнологии и электрооборудование в АПК. – 2020. – Т. 67. – № 2 (39). – С. 107-114. DOI: 10.22314/2658-4859-2020-67-2-107-114.

132. **Васильченко А.В.** Инновации и цифровизация в защите растений // Плодоводство и виноградарство юга России. – 2020. – № 61 (1). – С. 161-172. DOI: 10.30679/2219-5335-2020-1-61-161-172.

133. **Пивоваров В.Ф., Солдатенко А.В., Пышная О.Н., Надежкин С.М., Гуркина Л.К.** Овощеводство – одно из приоритетных направлений сельскохозяйственного производства // Овощи России. – 2020; (1):3-15. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2020-1-3-15>.

134. **Ипатов Н.В.** Оценка исходного материала столовой моркови на устойчивость к фузариозу и альтернариозу с использованием методов традиционной и клеточной селекции: дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.05. – М., 2004. – 133 с. РГБ ОД, 61:04-6/465.

135. **Самохвалов А.Н.** Научное обоснование методов оценки исходного селекционного материала овощных культур на устойчивость к бактериальным и грибным болезням (роды *Brassica* L., *Raphanus* L., *Daucus* L., *Beta Tourn* (L.) *Cucumis* L.): автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук: 06.01.05. – М., 1992. – 38 с.: ил.

136. **Пашкевич А.М., Чайковский А.И., Медведь Н.В.** Определение устойчивости фасоли к возбудителю антракноза – *Colletotrichum lindemuthianum* Br. et Cav. // Овощи России. – 2020; (4): 93-97. <http://doi.org/10.18619/2072-9146-2020-4-93-97>.

137. **Huang X.Q., Roder M.S.** Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: a review. *Euphytica*. 2004. 137 (2). p. 203-223.

138. **Kelly J.D., Gepts P., Miklas P.N., Coyne D.P.** 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Res.* 82: 135-54.44.

139. **Хлесткина Е.К.** Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 1. – № 4/2. – С. 1044-1054.

140. **Мусаев Ф.Б., Харченко В.А., Антошкина М.С.** Инструментально-биофизический метод оценки качества семян зеленных овощных культур // Овощи России. – 2019; (3): 40-44. [http:// doi.org/10.18619/2072-9146-2019-3-40-44](http://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-3-40-44).

141. **Бахшиев А.Г., Заморзаева И.А., Михня Н.И.** Молекулярная диагностика заражения некоторых молдавских сортов томата фитоплазмой // Овощи России. – 2020. – № 4. – С. 88-92. [http:// doi.org/10.18619/2072-9146-2020-4-88-92](http://doi.org/10.18619/2072-9146-2020-4-88-92).

142. **Козарь Е.Г., Ветрова С.А., Енгальчева И.А., Федорова М.И.** Оценка устойчивости селекционного материала свеклы столовой к церкоспорозу на фоне эпифитотии в условиях защищенного грунта Московской области // Овощи России. – 2019; (6): 124-132. [http:// doi.org/10.18619/2072-9146-2019-6-124-132](http://doi.org/10.18619/2072-9146-2019-6-124-132).

143. **Воротников И.Л., Муравьева М.В., Петров К.А.** Информационное обеспечение управления процессами регулирования зависимости сельского хозяйства России от импорта семян и семенного материала // Вестник Воронежского ГАУ. – 2019. – № 4 (63). – С. 228-234. DOI: 10.17238/issn2071-2243.2019.4.228.

144. **Федоренко В.Ф., Мишуоров Н.П., Неменушая Л.А.** Перспективные технологии диагностики патогенов сельскохозяйственных растений: науч. аналит. обзор. – М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2018. – 68 с.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
1. ОСНОВНЫЕ БОЛЕЗНИ И ПАТОГЕНЫ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР	5
1.1. Болезни овощных культур, вызываемые грибами, бактериями, акти- номицетами	17
1.2. Болезни овощных культур, вызываемые вирусами	26
1.3. Болезни овощных культур, вызываемые фитоплазмами	43
1.4. Болезни овощных культур, вызываемые вириоидами	50
2. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ПАТОГЕНОВ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР	54
2.1. Визуальный метод	54
2.2. Метод растений-индикаторов.....	55
2.3. Метод включений	56
2.4. Методы электронно-микроскопического анализа	59
2.5. Методы серодиагностики	61
2.6. Молекулярно-генетические методы.....	71
2.7. Комбинирование методов	89
2.8. Фитомониторинг	91
3. МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ПАТОГЕНОВ В СЕЛЕКЦИИ И СЕМЕНОВОДСТВЕ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР	93
Заключение	97
Литература	100

Дамир Забихуллович Богоутдинов,
Татьяна Борисовна Кастальева,
Наталья Викторовна Гирсова,
(ФГБНУ ВНИИФ)
Татьяна Сергеевна Фоминых,
(ФГБНУ ВНИИЗР)
Нинель Ефимовна Павловская,
Ирина Николаевна Гагарина
(ЦКП «Орловский региональный центр
сельскохозяйственной биотехнологии»)
Николай Петрович Мишуров,
Людмила Алексеевна Неменушая
(ФГБНУ Росинформагротех)
Наталья Анатольевна Пискунова
(ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева)

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР

Аналитический обзор

Редактор *М.Н. Жукова*
Обложка художника *П.В. Жукова*
Компьютерная верстка *Т.П. Речкиной*
Корректоры: *И.С. Горячева, С.И. Ермакова*

fgnu@rosinformagrotech.ru

Подписано в печать 27.11.2020 Формат 60×84/16
Печать офсетная Бумага офсетная Гарнитура шрифта «Times New Roman»
Печ. л. 7,25 Тираж 500 экз. Изд. заказ 128 Тип. заказ 369

Отпечатано в типографии ФГБНУ «Росинформагротех»,
141261, пос. Правдинский Московской обл., ул. Лесная, 60

ISBN 978-5-7367-1609-8



9 785736 716098