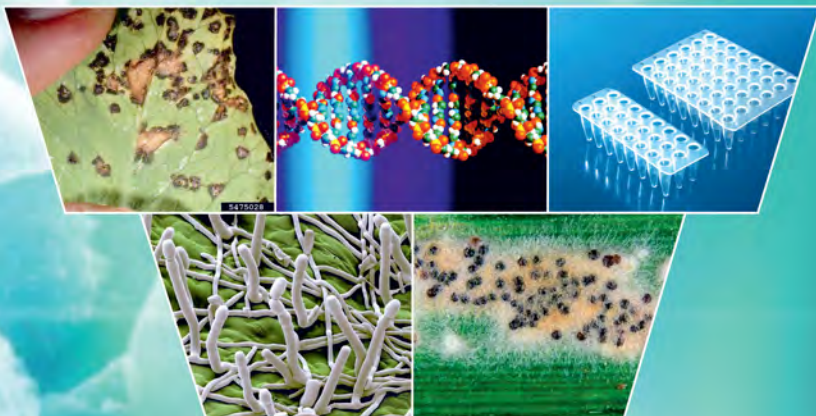


МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ ПАТОГЕНОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Научный аналитический обзор



Москва 2018

Техника и оборудование для села

Сельхозпроизводство • Переработка • Агротехсервис • Агробизнес

ЖУРНАЛ

«ТЕХНИКА И ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ СЕЛА» –

ВАШ ПОМОЩНИК В НАУЧНОЙ, ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ, УПРАВЛЕНЧЕСКОЙ И УЧЕБНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ!



Ежемесячный полнокрасочный научно-производственный и информационно-аналитический журнал «Техника и оборудование для села», учредителем и издателем которого является ФГБНУ «Росинформагротех», выпускается с 1997 г. при поддержке Минсельхоза России и Россельхозакадемии. За это время журнал стал одним из ведущих изданий в отрасли и как качественное и общественно значимое периодическое средство массовой информации в 2008, 2009 и 2011 гг. удостоен знака отличия «Золотой фонд прессы». В редакционный совет журнала входят 7 академиков РАН.

В журнале освещаются актуальные проблемы технической и технологической модернизации АПК: инновационные проекты, технологии и оборудование, энергосбережение и энергоэффективность; механизация, электрификация и автоматизация производства и переработки сельхозпродукции; агротехсервис; аграрная экономика; информатизация в АПК; развитие сельских территорий; технический уровень сельскохозяйственной техники; возобновляемая энергетика и др.

Журнал является постоянным участником большинства международных и российских выставок, конференций и других крупных мероприятий в области АПК, проходящих в России, неоднократно отмечался почетными грамотами, дипломами и медалями (более 10).

Журнал включен в международную базу данных AGRIS ФАО ООН, Российский индекс научного цитирования (РИНЦ).

Регионы распространения журнала: Центральный, Центральнo-Черноземный, Поволжский, Северо-Кавказский, Уральский, Западно-Сибирский, Восточно-Сибирский, Северный, Северо-Западный, Калининградская область, а также государства СНГ (Украина, Беларусь, Казахстан).

Индекс в каталоге агентства – 72493, в объединенном каталоге «Пресса России» – 42285.

Стоимость подписки на 2018 г. с доставкой по Российской Федерации – 7524 руб. с учетом НДС (10%), по СНГ и странам Балтии – 8580 руб. (НДС – 0%).

Приглашаем разместить в журнале «Техника и оборудование для села» информационные (рекламные) материалы, соответствующие целям и профилю журнала.

Подписку и размещение рекламы можно оформить через ФГБНУ «Росинформагротех» с любого месяца, на любой период, перечислив деньги на наш расчетный счет.

Банковские реквизиты: УФК по Московской области
(Отдел № 28 Управления Федерального казначейства по МО)
ИНН 5038001475/КПП 503801001

ФГБНУ «Росинформагротех», л/с 20486Х71280,
р/с 40501810545252000104 в ГУ Банка России по ЦФО, БИК 044525000
В назначении платежа указать код КБК (000 0000 0000000 000 440), ОКТМО 46647158.

Адрес редакции: 141261, Московская обл., пос. Правдинский, ул. Лесная, 60,
Росинформагротех, журнал «Техника и оборудование для села».
Справки по телефонам: (495), 993-44-04, (496) 531-19-92;
E-mail: r_technica@mail.ru, fgnu@rosinformagrotech.ru



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»)

**ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
ДИАГНОСТИКИ ПАТОГЕНОВ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

Научный аналитический обзор

Москва 2018

УДК 632.1/.4+632.93

ББК 44.9

Ф 33

Рецензенты:

А.А. Манохина, д-р с.-х. наук, доц. (ФГОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева); **С.Н. Сапожников**, канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр. (ВНИИ агрохимии имени Д.Н. Прянишникова).

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

ISBN 978-5-7367-1438-4

Рассмотрены современное состояние и основные направления развития защиты растений от болезней в Российской Федерации. Особое внимание уделено преимуществам и недостаткам наиболее распространённых методов диагностики фитопатогенов. Обозначены перспективные технологии выявления и идентификации болезней растений, 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.

Fedorenko V.F., Mishurov N.P., Nemenushchaya L.A. Promising technologies for diagnostics of pathogens of agricultural plants: scientific ed. – М: Rosinformagrotekh, 2018. – 68 pp.

The current state and the main directions of development of plant protection against diseases in the Russian Federation are discussed. Particular attention is paid to the advantages and disadvantages of the most common methods for diagnosing phytopathogens. Promising technologies for finding and identification of plant diseases, including those at early pre-visual stages of infection and latent form, have been identified.

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

УДК 632.1/.4+632.93

ББК 44.9

ISBN 978-5-7367-1438-4

© ФГБНУ «Росинформагротех», 2018

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема защиты растений от болезней по-прежнему актуальна. По данным ФАО и ООН, потери от воздействия фитопатогенов составляют в развитых странах 10%, в развивающихся – 20-50%. В России потери до 25% зерновых культур вызывают ржавчина, септориозы, мучнистая роса, фузариоз, корневые гнили, болезни зимней гибели. Фитофтороз, альтернариоз, вирусные и бактериальные болезни уничтожают 20-30% урожая картофеля. Значительны потери урожая риса от пирикулярриоза; подсолнечника – от серой и белой гнилей; сахарной свеклы – от церкоспороза, ложной мучнистой росы; яблоневых садов – от парши и мучнистой росы; косточковых культур – от монилиоза [1-3].

Пагубное влияние на фитосанитарное состояние сельскохозяйственных растений оказывают многие факторы (рис. 1).

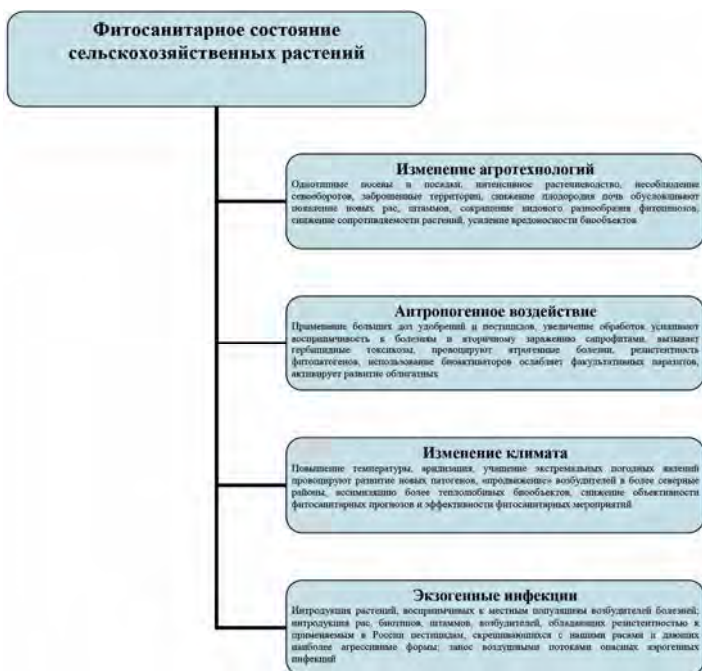


Рис. 1. Факторы, влияющие на фитосанитарное состояние сельскохозяйственных растений

Чтобы не допустить или существенно снизить развитие опасных фитосанитарных ситуаций, необходимы: изучение формирования патогенных комплексов, влияния антропогенных и климатических воздействий при новых технологиях растениеводства, исследование их действия на иммунные статусы фитоценозов и эпидемической опасности новых видов, ввозимых или заносимых из-за рубежа; разработка и внедрение современных технологий мониторинга, прогноза и диагностики болезней растений с использованием достижений научно-технического прогресса; разработка эффективных методов профилактики и защиты сельскохозяйственных растений от эпидемий: новые пестициды, иммунномодуляторы, регуляторы роста растений, программы принятия решений по защите растений, технологии применения средств защиты, управления защитой растений и др.

Требуется организация системы защиты растений, основанная на сотрудничестве всех заинтересованных сторон, включающих в себя научные учреждения, региональные станции защиты растений, сельских производителей, для жизнеспособности которой необходимы организационная и финансовая поддержка государства, квалифицированные кадры во всех ее составляющих [4].

В представленном научно-аналитическом обзоре проанализированы характеристики и практические примеры применения технологий диагностики патогенов сельскохозяйственных 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 растениеводства, уровня конкурентоспособности отрасли и качества сельскохозяйственной продукции.

Отзывы и замечания по изданию просьба направлять в ФГБНУ «Росинформагротех» по адресу: 141261, Московская обл., Пушкинский р-н, пос. Правдинский, ул. Лесная, 60. Тел.: (495) 993-44-04, 993-42-92. Факс (496) 531-64-90. E-mail: fgnu@rosinformagrotech.ru

1. ОСНОВНЫЕ ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

Болезни сельскохозяйственных растений возникают из-за воздействия на них различных микроорганизмов: грибов, бактерий, актиномицетов, вирусов, виридов, фитоплазм. Знание особенностей и оптимальных условий для развития возбудителя болезни позволяет своевременно диагностировать возможность его появления, провести профилактические мероприятия и предотвратить опасное распространение.

Грибы не имеют хлорофилла и требуют для своего питания готовые органические вещества, не могут активно поглощать пищу и питаются, всасывая питательные вещества из окружающей среды. Тело большинства грибов представлено мицелием, состоящим из тонких, сильно разветвленных гиф.

Число видов грибов огромно – по некоторым оценкам, может достигать 1,5 млн, подавляющее большинство из них паразитирует на растениях. Грибы подразделяются на облигатных паразитов (способны жить только на растении, питаясь его соками), факультативных (живут на мертвом органическом субстрате, но способны паразитировать и на растениях), сапротрофов (питаются только мертвой органикой) и симбиотрофов (образуют на корнях растений микоризу).

Различаются два способа размножения грибов – вегетативное и репродуктивное. Последнее происходит спорами, образующимися бесполым и половым путем. Все споры грибов можно разделить на две группы – покоящиеся и propagативные (споры распространения). К спорам размножения относятся конидии, пикноспоры, зооспоры, базидиоспоры, аскоспоры и другие, именно они вызывают распространение и развитие болезни.

Вегетативное размножение патогенов часто происходит при неблагоприятных условиях развития. Так, при недостатке влаги, питательных веществ или воздействии других неблагоприятных факторов гриб может образовывать хламидоспоры, геммы, склеротии, ризоморфы и иные формы для своего сохранения, размножения или распространения.

Чаще всего наличие капельножидкой влаги или относительно высокой влажности воздуха является определяющим условием для прорастания спор и заражения растений. Оптимальными условия-

ми 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. При наступлении неблагоприятных условий некоторые переходят к образованию спор (по одной в бактериальной клетке). Споры выдерживают действие высоких и низких температур, кислот, щелочей. По способу питания большинство фитопатогенных бактерий относятся к гетеротрофным организмам. Рост бактерий обычно начинается при 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, насекомые. От растения к растению они передаются ветром, дождями, насекомыми, нематодами, человеком.

Актиномицеты 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 кусочками мицелия или спорами, формирующимися на специальных органах – спораносцах.

Вирусы – неклеточные живые организмы, отличающиеся наличием только одного типа нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК),

отсутствием собственной белоксинтезирующей системы (рибосом) и ферментов энергетического обмена. Полностью зависят от хозяина: все вирусы – облигатные паразиты бактерий, растений или животных.

Вирусные частицы (вирионы) состоят из нуклеиновой кислоты и белковой оболочки. Нуклеиновая кислота – носитель наследственности и инфекционности. Белковая оболочка защищает нуклеиновую кислоту. Все вирусы не могут размножаться, а большинство – и длительно сохраняться вне живых клеток. Лучший источник их сохранения в зимний период – зимующие вегетативные части зараженных растений.

Вириоды – особый класс патогенов. Это вирусоподобные инфекционные агенты, не имеющие, в отличие от вирусов, характерных нуклеопротеидных частиц. Представляют собой низкомолекулярную одноцепочную РНК, не обладают антигенной активностью, высокоустойчивы к различным химическим и физическим факторам.

Фитоплазмы – полиморфные прокариотные организмы, содержащие два типа нуклеиновых кислот (РНК и ДНК). Характеризуются высокой чувствительностью к антибиотикам тетрациклиновой группы, культивируются на искусственных питательных средах. Клетки фитоплазм окружены трехслойной элементарной мембраной, чем и отличаются от бактерий. Фитоплазмы нарушают функцию сосудистой системы растений, что проявляется в задержке оттока пластических веществ из мест синтеза и в накоплении зерен крахмала в хлоропластах. Это приводит к проявлению одного из характерных признаков желтух – хлоротичности растений.

Для фитоплазменных заболеваний также характерно патологическое развитие генеративных органов. Патогенные фитоплазмы сохраняются только в живых тканях растений: клубнях, клубнеплодах, луковицах, корнях, корневищах. Резерваторами фитоплазм могут быть многие сорные растения, например, вьюнок, молочай, бодяк. В дикой сорной растительности фитоплазмы могут длительно сохраняться и размножаться. Их переносчиками чаще служат цикады, реже – листоблошки. Активные миграции их из природных очагов на культурные растения способствуют интенсивному распространению фитоплазменных инфекций [5].

2. ДИАГНОСТИКА ПАТОГЕНОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Выбор технологий для диагностики и идентификации фитопатогенных микроорганизмов зависит от конечной цели исследования (определение возбудителя заболевания при поражении растения или выявление определенного фитопатогенного объекта в растительном материале, воздухе, воде или почве), уровня оснащения лаборатории исследователя, скорости проведения анализа, его стоимости и эффективности (очень важна возможность количественного анализа патогенов в растительных тканях).

2.1. Технологии на основе визуального осмотра

Визуальный осмотр является необходимым и предварительным методом диагностики растений, проводится обычно в местах их выращивания и иногда позволяет сразу определить фитопатоген. Однако чаще всего для точной установки возбудителя болезни требуются дальнейшие лабораторные исследования. К технологиям на основе визуального осмотра относятся метод растений индикаторов (использование растений, дающих очень четкую реакцию, строго специфичную только по отношению к определенному виду патогена. Так, для вируса табачной мозаики хорошим индикаторным растением является *Nicotiana glutinosa*).

Первый этап визуальной диагностики включает в себя сравнение внешнего вида пораженного растения с другими растениями, любые выделенные нетипичные признаки могут указывать на его болезнь (табл. 1, рис. 2-5).

Почти все эти симптомы могут наблюдаться при физиологических расстройствах: нарушении питания растения, отравлении пестицидами, негативном влиянии окружающей среды, поэтому для точного установления причины поражения требуется проведение дальнейших диагностических мероприятий [4, 6]. То есть технологии, основанные на визуальном осмотре, отличаются недостаточной надежностью для точной диагностики и малоприменимы для ранней диагностики или при наличии скрытой инфекции.

**Внешние признаки заболевания растений,
вызванных различными группами патогенов**

Название симптома	Внешний вид поражения	Возможные причины
Пятна, некрозы на листьях или стеблях	 <i>Рис. 2. Пример пятнистости листьев</i> Материалы сайта: https://www.dacha.help/wp-content/uploads/2017/08/buraya-pyatnistost-pomidor.jpg	Если с какой-нибудь стороны есть мицелий, спорангиеносцы, склеротии, то это поражение грибом (по спороношению иногда можно сразу точно определить вид возбудителя)
Скрученность, морщинистость листьев, отставание в росте, меньшая облиственность	 <i>Рис. 3. Пример морщинистости листьев</i> Материалы сайта https://sveklon.ru/wp-content/uploads/2018/01/DarkRedNorland_O2_gallery.2613.jpg	Вирусное или виroidное поражение

Название симптома	Внешний вид поражения	Возможные причины
«Ведьмины метлы»	 <i>Рис. 4. Пример «ведьминой метлы»</i> Материалы сайта http://4.bp.blogspot.com/-EQLwsiTZeWg/TzFn8wAMp4I/AAAAAAAAACfA/oxcMaYOCMKA/s1600/witches-broom-1.jpg	Поражение фитоплазмами
Увядание растения	 <i>Рис. 5. Пример увядания</i> Материалы сайта https://grounde.ru/wp-content/uploads/2014/05/vyrashhivanie-ogurcov-v-otkrytom-grunte10.jpg	Сосудистые микозы или сосудистые бактериозы, поражение грибом, отличаются от бактериального отсутствием слизи

2.2. Технологии с использованием микроскопирования

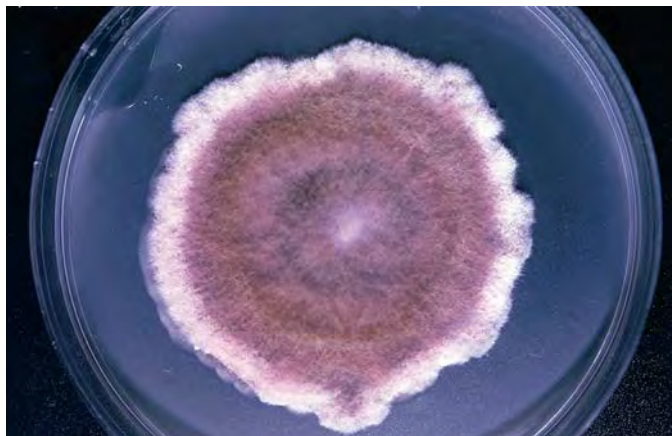
После визуального осмотра пораженные части растения изучаются с помощью микроскопа. Если при определенных условиях развитие мицелия слабое, то для выявления и определения возбудителя применяют закладку растений или их частей во «влажные

камеры» для интенсификации прорастания мицелия и определения патогена по характерным морфологическим признакам.

С помощью перечисленных методов не всегда можно точно выявить возбудителя заболевания растения. Многие патогены находятся в растительном организме в латентной форме или дают сходные симптомы поражения, развивают однотипный мицелий, в таких случаях необходимо использование инструментальных серологических или молекулярных методов, дополненных выделением подозреваемого возбудителя в чистую культуру, и подтверждение патогенности исследуемых микроорганизмов правилами Роберта Коха (Триада Коха). Первичный патоген обнаруживается в растительной ткани только на начальных этапах патогенеза, полностью исчезая позднее из-за гибели инфицированных тканей и развития вторичных патогенов и сапрофитов [4, 6].

Выделение чистых культур

Для выделения чистой культуры (рис. 6) обычно берут субстрат после инкубации во влажной камере.



*Рис. 6. Чистая культура Фузариум
(Материалы сайта*

*[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/29/
Fusarium_poeae.jpg/1200px-Fusarium_poeae.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/29/Fusarium_poeae.jpg/1200px-Fusarium_poeae.jpg)*

При выделении чистых культур из воды, почвы, гнилой сельскохозяйственной продукции часто используют *метод приманок*. Он заключается в том, что на поверхность хорошо увлажненного субстрата (или воды) помещают орган растения, наиболее часто поражаемый этим организмом.

Чистую культуру используют для идентификации с помощью определителей и микроскопа, выделения из нее ДНК и анализа с помощью ПЦР, секвенирования участков генома, выявления ее вирулентности к выращиваемым или планируемым к введению в севооборот сортам, устойчивости к фунгицидам.

Секвенирование (определения последовательности нуклеотидов) участков генома

Если у выделенных и чистых культур организмов не удаётся получить структуры, позволяющие определять объект до вида, то применяют метод секвенирования (обычно для выделения ДНК из общей массы и размножения используется ПЦР (полимеразная цепная реакция)).

Если полученная последовательность уже секвенировалась у известного живого организма, то высокое сходство с ней (близкое к 100%) позволит определить исследуемый объект. Популярен при сравнении последовательностей поисковик Blast базы данных Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (рис. 7) [4, 6].

Трудности при определении с помощью секвенирования могут возникнуть, если культура не является микробиологически чистой, т.е. в ней присутствуют сопутствующие микроорганизмы. Отделить ДНК целевого фитопатогена от сопутствующих можно с помощью клонирования в клетках бактерии *Escherichia coli*. В сложном случае при контаминации не одним патогеном необходимо проводить диагностику с тест-системами на все предполагаемые патогены.

Необходимыми при использовании молекулярных методов диагностики являются процедуры отбора проб, консервирования образца и выделения ДНК. При отборе проб основными моментами являются выбор органа или части растения, в котором находится максимальное количество искомого организма (лучше ткани с гра-

ниции пораженной и здоровой частей растения) и временной фактор (нескольких часов после взятия пробы).

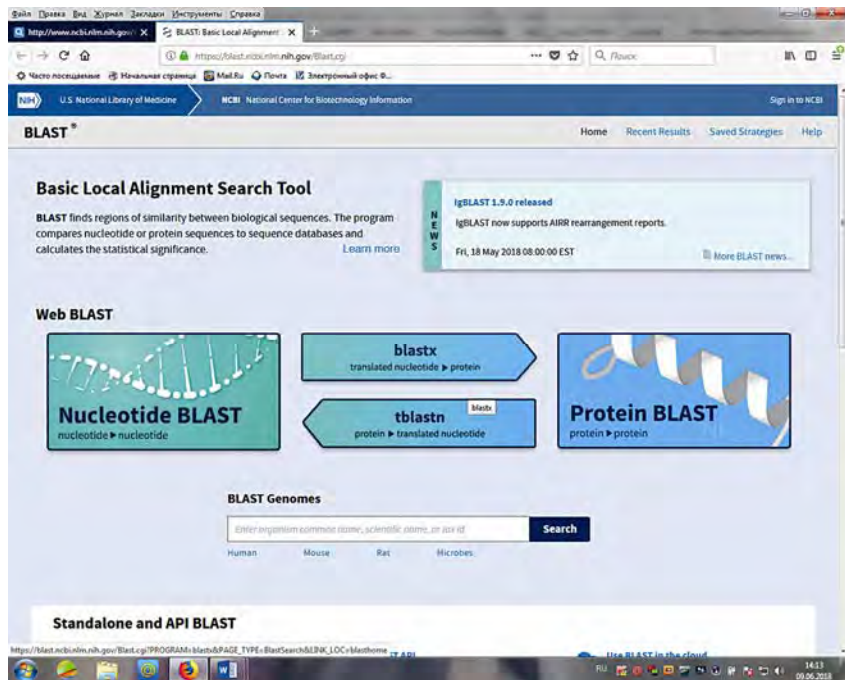


Рис. 7. Вид главной страницы базы данных Genbank

Если быстро выделить ДНК невозможно, то образец консервируется (заморозка при -20°C , помещение в специальный раствор (например, 70%-ный этиловый спирт). Законсервированный образец можно хранить продолжительное время до начала лабораторных исследований [4, 6].

Существует много методов выделения ДНК (при анализе материала на присутствие вирусов РНК), имеются наборы для выделения из различных субстратов (рис. 8), специальные автоматические станции выделения ДНК.



Рис. 8. Набор реагентов для выделения ДНК
(Материалы сайта <http://www.syntol.ru/upload/medialibrary/6c2/6c2cd33ab5f43d59f292dbdf2f04ab5b.jpg>)

Суть всех методов выделения заключается в экстракции ДНК из образца и удалении или инактивации посторонних примесей. Выделение ДНК обычно проводят в лаборатории, однако при необходимости его можно проводить практически в любом помещении или в мобильной лаборатории (портативные лаборатории, упакованные в переносной кейс, компания «ДНК-Технология») [4,6].

Диагностика возбудителей болезней с помощью выделения в чистую культуру с последующим исследованием микробиологическими методами является дешевым, но трудоемким методом, занимает много времени, имеет низкую производительность и ее практически невозможно автоматизировать. При хранении жизнеспособность патогенов падает, а спустя определенный промежуток времени их невозможно выявить, выделяя в культуру. Зависимость от морфологического определения требует от исследователя точных знаний характерных признаков фитопатогенов. Технологии с использованием микроскопирования не подходят для патогенов, которых трудно или невозможно культивировать *in vitro*.

2.3. Технологии с использованием ПЦР

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) основана на обнаружении и многократном увеличении (амплификации) определенных участков генома, даже если искомый фрагмент присутствует в очень малых концентрациях среди огромного количества других фрагментов ДНК. Проведение ПЦР обеспечивается работой всего одного фермента – ДНК-полимеразы. При ПЦР каждая построенная цепочка ДНК, называемая ампликон, или ПЦР-продукт, ограничена прямым и обратным праймерами. В качестве праймеров используют короткие (около 20 нуклеотидов) фрагменты ДНК. ПЦР обеспечивает чрезвычайно высокий уровень чувствительности при обнаружении и идентификации целевого фитопатогена в составе сложных биологических матриц или объектов окружающей среды (табл. 2) [4, 6].

Регистрацию или визуализацию ПЦР-продукта можно вести на протяжении всей реакции («ПЦР в режиме реального времени») и только после ее завершения (метод FLASH-PCR – детекция «по конечной точке» или визуализации в геле) (рис. 9) [4, 6].

Исследования и разработки молекулярных технологий диагностики с использованием ПЦР проводятся многими отраслевыми научными, образовательными и производственными организациями. Одним из перспективных направлений их применения можно считать диагностику зараженности семенного и посадочного материала. Семена являются полноценной питательной средой для развития патогенных и сапрофитных микроорганизмов. Более 50% видов фитопатогенов передаются через семена. Посев зараженными семенами приводит к передаче болезней на вегетирующие растения и тем самым создает и поддерживает очаги инфекции в поле.

Важность фитоэкспертизы семян подтверждается результатами многолетнего мониторинга и фитосанитарной диагностики состояния посевов и семян ФГБНУ Поволжский НИИ селекции и семеноводства им. П.Н. Константинова (г. Кинель, Саратовская область) на примере сорго зернового и сахарного, которые выявили, что бактериальные инфекции ко времени образования и формирования семян уже проникают внутрь и при посеве происходит поражение растений нового урожая [7].

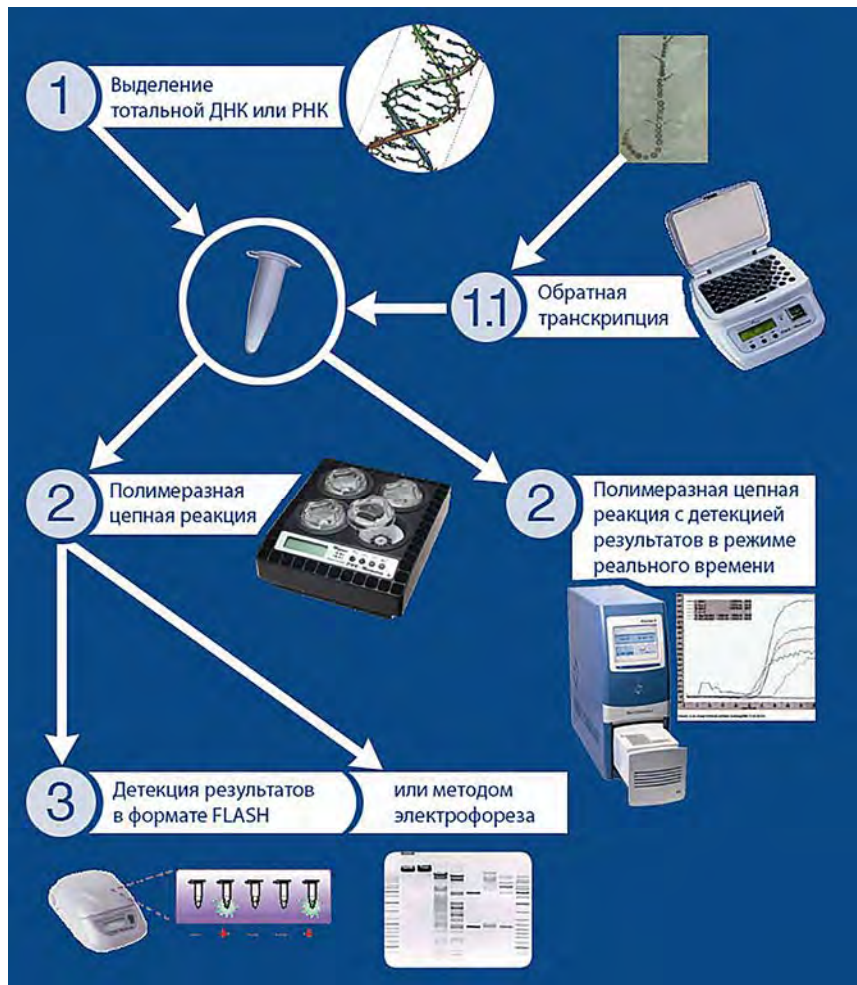


Рис. 9. Последовательность и способы проведения ПЦР
(Материалы сайта
http://agrodiagnostica.ru/netcat_files/Image/agrodiag_pcr_shema.jpg)

**Модификации метода ПЦР, используемые
при идентификации фитопатогенов**

Название	Характеристика	Особенности
ПЦР в реальном времени (Real-time PCR)	Основан на свойствах молекул – флуорофоров – поглощать свет одной длины волны испускать свет другой, большей длины волны. Измеряется флуоресценция реакционной смеси, интенсивность которой пропорциональна выработанной в ходе реакции ДНК. Проводят в ПЦР-амплификаторе, снабженном устройством для освещения пробирок светом с длиной волны, возбуждающим флуоресценцию, и многоканальным флуоресцентным детектором, позволяющим измерять уровень флуоресценции в каждой пробирке непосредственно в ходе реакции	Наиболее быстрый и удобный метод диагностики фитопатогенов по сравнению с классической ПЦР. Дает информацию о присутствии и количестве патогена непосредственно после этапа амплификации и не требует электрофоретического разделения продуктов, что снижает риск загрязнения проб ампликонами. Используется при диагностике в полевых условиях. Относительно прост и быстр в исполнении. Процесс анализа полностью автоматизирован
ПЦР детекции по «конечной точке» (FLASH-PCR)	В отличие от ПЦР в реальном времени, предполагает только одно измерение после завершения реакции с помощью специального детектора	Применяется в том числе в мобильных лабораториях, бюджетная альтернатива ПЦР «в реальном времени», нет необходимости в дорогостоящем детектирующем амплификаторе, отличается компактностью и низким энергопотреблением оборудования. Отсутствие электрофореза и непосредственного контакта

Название	Характеристика	Особенности
		с ПЦР-продуктом исключает загрязнение ампликонами. Сокращает время постановки диагноза до 2-3 ч. Достоинствами метода являются детекция результатов ПЦР, не открывая пробирки, и возможность использования тест-систем, разработанных для ПЦР в реальном времени
ПЦР с применением обратной транскрипции (ОТ-ПЦР)	Обычный метод ПЦР нельзя использовать для выявления РНК-содержащих организмов, среди которых встречаются высокопатогенные вирусы и вириды. Реакция с участием обратной транскриптазы приводит к образованию одноцепочечной кДНК комплементарной имеющейся РНК. В дальнейшем фрагмент кДНК амплифицируется с участием ДНК-полимеразы	Можно одновременно проводить идентификацию и оценку жизнеспособности патогенов в пробе, а также оценку экспрессии генов. Успешно применяется для детекции поражающих растения вирусов и виридов, а также наличия вирусов у тлей-переносчиков. Превосходит по чувствительности гибридационный анализ (фитоплазмы) или возвратный гель-электрофорез (вириды)
ПЦР с вложенной парой праймеров (гнездовая ПЦР)	В реакции последовательно участвуют две пары праймеров, при этом вторая пара праймеров участвует в амплификации фрагмента ДНК внутри продукта, полученного после завершения цикла реакций с парой внешних праймеров.	К достоинствам метода относятся высокая чувствительность и уменьшение числа побочных продуктов реакции, усиление специфичности при амплификации целевого фрагмента. Недостаток – вероятность получения ложноположительных результатов из-за

Название	Характеристика	Особенности
	Предпочтительно использование варианта с проведением обеих стадий анализа в одной и той же пробирке	возможного загрязнения пробы. Метод успешно используется для идентификации фитоплазм, а также других фитопатогенов, включая бактерии в растениях до появления симптомов бактериоза
ПЦР с иммунным захватом	Совместное использование иммунохимических и основанных на ПЦР методов. Использование специфически связывающих искомые вирусные частицы антител, позволяет захватить из раствора нужные вирусные частицы и увеличить концентрацию ДНК-матрицы. На следующей стадии из этих частиц освобождают вирусную ДНК или РНК и проводят, соответственно ПЦР или ОТ-ПЦР	Снижает или устраняет влияние ингибиторов полимеразной реакции. Усиливает специфичность и чувствительность диагностики. Успешно применяется для диагностики выявления гриба <i>Didymella bryonia</i> среди других возбудителей аскохитоза огурца, детекции бактерии <i>E. amylovora</i> в плодах груши при их естественном заражении
Мультиплексная ПЦР (Multiplex PCR)	В одной и той же реакционной среде происходит процесс коампликации нескольких ДНК-матриц с участием нескольких пар праймеров. Праймеры для мультиплекс-ПЦР не должны быть комплементарны друг другу. При анализе результатов методом электрофореза необходимо, чтобы ПЦР-продукты,	Позволяет одновременно диагностировать несколько патогенов в одном эксперименте. Наиболее часто применяют в фитопатологии при мультиплексной диагностике фитоплазм, нематод, а также вирусов и виридов

Название	Характеристика	Особенности
	образующиеся при амплификации ДНК из разных патогенов, имели различный размер	
Метод БИО-ПЦР	Исследуемый образец помещают на агаризованную или в жидкую селективную среду и инкубируют в оптимальных для выявляемого организма условиях, при накоплении в достаточном количестве его выделяют и проводят ПЦР	Широко применяется для обнаружения бактерий, подходит и для грибов. Позволяет выявить даже единичные экземпляры искомого фитопатогена в пробе. Отличается высокой чувствительностью и особенно подходит для быстрорастущих видов патогенов
Изотермальная петлевая амплификация (LAMP)	Проходит при температуре 60-65°C. Участие от четырех до шести праймеров (прямых и обратных внутренних, а также прямых и обратных внешних), которые распознают соответственно от шести до восьми различных комплементарных участков на анализируемой ДНК. После нескольких циклов конечные продукты LAMP представляют собой фрагменты ДНК, которые имеют несколько инвертированных повторов целевого фрагмента и несут многочисленные петли. Разработаны варианты с привлечением	По сравнению с классическим вариантом ПЦР, LAMP является более быстрым, простым и высокоспецифичным методом. Позволяет амплифицировать целевые последовательности ДНК в изотермальных условиях. Из-за большого количества амплифицированные продукты легко обнаружить невооруженным глазом без их предварительного электрофореза. Используется для быстрой одностадийной идентификации Y-вируса картофеля, а также бактерии <i>Ralstonia solanacearum</i> , поражающей более 200 видов растений

Название	Характеристика	Особенности
	обратной транскрипции (RT-LAMP) и проведением в реальном времени (real time LAMP)	
ПЦР с произвольной амплификацией полиморфной ДНК (RAPD-ПЦР)	ПЦР-диагностика осуществляется на основе анализа амплификации случайно выбранного региона. Требует проведения тщательной очистки, анализируемой ДНК. Происходит отжиг одного праймера небольшого размера, который комплементарен случайным участкам ДНК исследуемых патогенов	Используют, когда необходимо обнаружить последовательности, специфичные для близкородственных видов, штаммов, рас и изолятов, чтобы различить их

Во ВНИИ защиты растений (г. Санкт-Петербург) разрабатываются методики фитопатологической экспертизы семян, которая имеет немаловажное значение для борьбы с внутренней семенной инфекцией, передающейся с посевным материалом. Данные о составе возбудителей, степени зараженности семян позволяют точно подобрать фунгицид для каждой партии семян, подойти к протравливанию дифференцированно, т.е. при недостатке средств защиты перераспределить их, обратив внимание на наиболее сильно зараженные партии семян [8].

Специалисты АО «Щелково Агрохим» (г. Щелково, Московская область) обосновали перспективность применения для контроля зараженности семян злаковых культур молекулярную диагностику с помощью косвенной полимеразной цепной реакции с регистрацией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ) [9].

Для улучшения качества посадочного материала картофеля в лаборатории энзимного анализа ДНК технологий и испытательном лабораторном комплексе НГАУ (г. Новосибирск) проводились исследования по эффективности применения высокочувствительных

и специфичных методов детекции, позволяющих диагностировать заболевания картофеля на начальных этапах и создавать оздоровленный посадочный материал.

Для выявления фитопатогенов в растительном материале клубней картофеля предлагается использовать диагностические наборы ООО «АгроДиагностика» с детекцией в агаризном геле продуктов амплификации с помощью ПЦР, с некоторыми модификациями. При анализе на вирусы и вироиды применялась реакция обратной транскрипции с тотальной РНК (детекция результатов проводилась на амплификаторе «БИС»).

В результате подтверждена перспективность высокочувствительных методов фитодиагностики для отрасли семенного картофелеводства. Показано, что технологии с использованием ПЦР являются точными и чувствительными, выявляющими скрытую форму фитопатогенов, что очень важно при создании чистого семенного материала картофеля [10].

В РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (г. Москва) разработаны технологии высокоэффективного выявления фитопатогенов, передающихся семенами и посадочным материалом. Выделялись ДНК и РНК из коллекций сортов картофеля, земляники и огурца, имеющих признаки поражения фитопатогенами. В результате были созданы образцы ДНК и РНК, дающие возможность определения инфекционного начала растительного организма, установления устойчивости растений к фитопатогенам, постановки реакции ПЦР с целью клонирования нужной последовательности ДНК, использования в качестве эталонных, обладающих чистотой и стабильностью, контролей для ПЦР анализа.

Для детекции каждого вируса исследователями были оптимизированы условия ПЦР, разработана эффективная система по выявлению вирусной инфекции, включающая в себя этапы, приведенные на рис. 10 [11].

Оптимизация условий для обнаружения геномов целого спектра фитопатогенов в системе семенного и сортового материала, в том числе и карантинных, таких как, например, андийского латентного вируса картофеля (АЛВК), карлавирусов картофеля М и S, полевируса скручивания листьев картофеля, вироида веретеновидности клубней, бактерий возбудителя кольцевой гнили картофеля и ожога

плодовых посредством последовательных реакций обратной транскрипции и ПЦР изучалась в ФГБНУ ВНИИСБ (г. Москва). В результате были предложены универсальные технологии и экспресс методы ПЦР диагностики этих фитопатогенов [12].



Рис. 10. Технологическая схема проведения диагностики вирусной инфекции

Исследования в ФГБНУ ВНИИФ (Московская область) подтвердили действенность мониторинга фитоплазмозов плодовых и ягодных культур не только в системе карантина растений, но и на всех этапах питомниководства и промышленного садоводства. Для достижения необходимой эффективности выявления фитоплазмозов перспективно применение классических и современных технологий на основе молекулярно-генетических методов диагностики [13].

Еще одним перспективным направлением использования молекулярных технологий диагностики на основе ПЦР является фитосанитарная экспертиза с целью выявления и предотвращения распространения карантинных объектов, в случае которой необходи-

мы быстрые, высокотехнологичные методы лабораторной экспресс-диагностики подкарантинной продукции.

На основе ПЦР в формате FLASH в институте биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (г. Москва) и ЗАО НПФ «ДНК-Технология» разработаны специфичные и чувствительные диагностические системы для детекции карантинных фитопатогенов: возбудителей бурой бактериальной гнили картофеля и кольцевой гнили картофеля, бледной и золотистой картофельных цистообразующих нематод, вируса шарки сливы и возбудителя ожога плодовых. Тест-системы пригодны для рутинной диагностики и апробированы на широком спектре изолятов и рас фитопатогенов [14].

В этом же институте совместно с ООО «Агродиагностика», ФГБНУ «ВНИИКР» разработаны диагностические тест-системы с рефератными изолятами вирусов, относящихся к роду *Nepovirus*: мозаики резухи, черной кольчатости томата, скручивания листьев черешни, близкородственного вируса латентной кольцевой пятнистости земляники. Каждая из систем построена по принципу мультиплексной ПЦР. Для анализа результатов количественной ПЦР использовался пороговый метод.

Диагностические наборы, созданные на основе разработанных тест-систем, можно использовать в рутинных анализах, в частности, в практике карантинных лабораторий. Результаты исследований показывают, что применение наборов позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью детектировать четыре вируса, три из которых входят в Перечень карантинных объектов Российской Федерации.

Качество проведения технологии определения вируса некротического пожелтения жилок сахарной свеклы – возбудителя ризомании методом ПЦР в формате FLASH улучшает разработанный ООО «АгроДиагностика» набор с тест-системой на основе праймеров, рекомендованных Европейской и Средиземноморской организацией по карантину и защите растений (ЕОКЗР). При работе отслеживаются возможное ингибирование ПЦР и ошибки при постановке реакции, приводящие к ложноотрицательному результату. Система FLASH позволяет проводить детекцию результатов на флуориметре «Джин» без постановки электрофореза, что снижает риск контами-

нации рабочей зоны продуктами амплификации, уменьшает затраты времени и трудоемкость анализа при сохранении высокой чувствительности и специфичности. Апробация набора проводилась специалистами Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ФГБУ ВНИИКР, ООО «АгроДиагностика» [15, 16]. Там же проведены сравнительный анализ применявшихся ранее технологий диагностики карантинных вирусов картофеля АЛВК и АВКК и разработка новых. Метод использования растений-индикаторов требует высокой квалификации персонала и значительных затрат времени, серологические методы детекции – использования дорогостоящих высококачественных антител, к тому же чувствительность обоих методов невысока и ни один из них не может обеспечить контроль за постоянно растущими объемами ввозимой продукции. В качестве альтернативы специалисты института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова и ООО «АгроДиагностика» (г. Москва) предлагают использовать технологии детекции АЛВК и АВКК на основе ПЦР в реальном времени, которые очень эффективны для рутинных анализов большого объема исследуемого материала, в условиях карантинной лаборатории, а при минимальной доработке позволяют проводить и количественное определение патогена. Они быстро, с высокой чувствительностью и специфичностью определяют наличие анализируемого вируса даже при его низком содержании в образцах и при латентной инфекции.

Разработанные тест-системы для идентификации АЛВК и АВКК имеют ряд особенностей: для предотвращения неспецифического отжига праймеров при низкой температуре и обеспечения сохранности наборов смесь для проведения ПЦР разделена парафином разного цвета, что одновременно обеспечивает цветовую маркировку пробирок для разных тест-систем, каждая из которых снабжена внутренним контролем.

Тест-системы прошли испытания на образцах, полученных из ВНИИ картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха (Московская область) и подтвердили высокую чувствительность ПЦР-тестов по сравнению с серологическими. Разработанные наборы для проведения ПЦР идентификации АЛВК и АВКК в режиме реального времени производит ООО «АгроДиагностика» [17].

Кроме описанных выше, в ООО «АгроДиагностика» разработан и внедрен в практическую работу уникальный комплекс тест-систем на основе ПЦР для технологий диагностики и идентификации широкого спектра инфекционных заболеваний сельскохозяйственных культур. С целью проведения анализа отработаны системы выделения нуклеиновых кислот из растительного материала и подготовки проб для ПЦР. Наборы производятся в трех форматах – в электрофоретическом, на основе метода FLASH и в формате ПЦР в режиме реального времени. Тест-системы полностью ориентированы на отечественное оборудование, которое производит компания «ДНК-технологии» [18, 19, 20].

В РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева и Всероссийском центре карантина растений ФГБУ ВНИИКР (Московская область) изучались вопросы оптимизации технологии обнаружения и идентификации карантинного возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур. Особая опасность связана с тем, что патоген не вызывает симптомов на семенах, может находиться на поверхности семян и внутри, очень жизнеспособен.

Существующий диагностический протокол для данного патогена (особенно при тестировании семенной инфекции) требует значительных затрат средств как производителя, так и затрат труда и времени испытательной лаборатории. В качестве перспективных специалистами предложены методы, основанные на эффективном сочетании способа экстракции семян, методики выделения ДНК, а также ПЦР-анализе.

Пробоподготовка образцов оптимизирована до стандартного набора операций, которые несложно использовать, что также позволит минимизировать дальнейшее ингибирование при постановке ПЦР. ДНК рекомендуется выделять ручным методом коммерческим набором «Проба-ГС» (ОАО «АгроДиагностика») и ПЦР в режиме реального времени с праймерами и Мастер-миксом (ЗАО «Диалат») [21, 22].

Молекулярные методы с использованием ПЦР диагностики перспективны для идентификации и изучения генетического разнообразия фитопатогенов, а также дальнейшего упрощения их диагностики.

В институте биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова разработаны новые специфичные ДНК-маркеры для исследования генетического разнообразия российской популяции грибов рода *Fusarium* и их видоспецифичной идентификации. Диагностические системы адаптированы в формат ПЦР в режиме реального времени, на их основе созданы уже внедренные в производство универсальные диагностические наборы, доказавшие свою эффективность на практике [23].

Специалистами ФГБНУ ВНИИО (Московская область) и РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева проведены предварительная идентификация по культурально-морфологическим признакам, оценка патогенности и агрессивности части изолятов на культурах томата и моркови, а также видовая идентификация с использованием видоспецифичных маркеров 63 образцов моноспоровых культур грибов рода *Fusarium*, собранных в Ростовской и Московской областях с растений различных овощных культур с симптомами заболеваний. При сравнении результатов диагностики была подтверждена перспективность молекулярного метода ПЦР для точной идентификации [24].

Для упрощения массового скрининга возбудителей болезней картофеля в ООО «ГенБит» (г. Москва) разработаны технологии с использованием ПЦР/ОТ-ПЦР микроматрицы с открытыми микрореакторами для диагностики вирусных, виroidных, бактериальных и грибных патогенов картофеля. Система включает в себя портативный амплификатор нуклеиновых кислот и совместимые с ним микроматрицы, содержащие 30 или 48 ячеек для проведения независимых ПЦР. Важная особенность ПЦР-матриц – нанесение в ячейки всех компонентов ПЦР-смеси (включая ДНК-полимеразу и обратную транскриптазу) с последующей их лиофилизацией уже на этапе производства, что значительно упрощает процедуру проведения анализа. ПЦР-матрицы «Фитопатогены картофеля. ДНК», ОТ-ПЦР-матрицы «Фитопатогены картофеля. РНК» обладают открытой конфигурацией, т.е. существует возможность формирования набора тест-систем в их составе в соответствии с конкретной целью работы [25].

ВНИИ защиты растений для выявления патогенов зерновых культур рода *Fusarium Link* предлагается использовать технологию,

в основе которой – новый метод диагностики цифровой ПЦР, позволяющий определить количество целевого объекта подсчетом абсолютного числа принадлежащих ему копий ДНК-мишени в исследуемой пробе. При сравнительных исследованиях метод цПЦР показал большую чувствительность, чем ПЦР в реальном времени. Эти методы позволяют одновременно амплифицировать и измерять количество целевой ДНК в образце и получать результаты анализа сразу после проведения ПЦР. Только в случае ПЦР-РВ определение содержания ДНК проводят относительно внесенной специфической последовательности ДНК гриба (стандарта), а при использовании цПЦР оценивают абсолютное число копий объекта в объеме ДНК, а не его относительное количество.

По сравнению с цПЦР использование ПЦР-РВ осложняется необходимостью постоянно поддерживать культуру целевого объекта, подготовки стандарта искомой ДНК с точно известной концентрацией. Отсутствие этого дополнительного этапа значительно упрощает процедуру анализа и расширяет круг испытательных лабораторий, в которых могут выполняться подобного рода исследования. Кроме того, на эффективность ПЦР-РВ может оказывать существенное влияние присутствие различных ингибиторов в пробах, таких как полисахариды, гуминовые кислоты, значительно снижающие чувствительность метода.

Результаты данного исследования являются первым в мире опытом применения метода цПЦР для выявления заражения зерна грибами. Это новая технология, позволяющая проводить абсолютную количественную оценку целевых генов без калибровочных стандартов [26].

В РГАУ-МСХА отработывались технологии диагностики особо опасных тосповирусов молекулярными методами с использованием ПЦР, в результате была подтверждена их перспективность для зараженных растений и насекомых-переносчиков [27].

Как показал анализ литературных источников, для технологий с использованием ПЦР характерны высокая чувствительность, возможность количественной оценки патогена, точность анализа, они подходят для определения любых патогенов и даже на этапе довизуального проявления болезни, что очень важно при диагностике заражения семян и посадочного материала, выявления карантин-

ных объектов. Протоколы ПЦР разработаны для детекции многих важных фитопатогенных бактерий, представителей наиболее вредоносных таксонов грибов (*Phytophthora*, *Pythium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Gaeumannomyces*, *Helminthosporium*, *Mycosphaerella*, *Phoma*, *Puceinia*, *Rhizoctonia*, *Septoria*, *Tilletia*, *Ustilago*, *Verticillium*). Технологии с использованием ПЦР успешно применяются также для обнаружения фитопатогенных нематод, в частности с целью контроля золотистой и бледной картофельных нематод, являющихся карантинными объектами.

К характеристикам, ограничивающим распространение данных технологий, относятся необходимость создания дорогостоящей приборно-лабораторной базы, высокая квалификация обслуживающего ее персонала, длительность процесса анализа.

2.4. Технология с использованием метода гибридизации нуклеиновых кислот

Данная технология диагностики использует гибридизацию – соединение одноцепочечных молекул нуклеиновых кислот в одну двунитевую молекулу. Применяется для выявления фитопатогенных бактерий, вирусов и виридов, экспрессии генов, идентификации и генотипирования грибов [4, 6].

В основе метода лежит свойство водного раствора ДНК при нагревании до 100°C и (или) повышении pH до 13 диссоциировать на две цепи (денатурировать), а выдерживание при 65°C приводит к восстановлению структуры двойной спирали (гибридизации). Процессы гибридизации происходят между любыми одинарными цепями нуклеотидов, если они комплементарны: ДНК-ДНК, ДНК-РНК, РНК-РНК.

Широко применяемый метод гибридизации ДНК-ДНК разработан Саузерном (рис. 11).

Он послужил основой самой современной технологии диагностики с использованием чипов. Чипы представляют собой пластинки с иммобилизованными мечеными одноцепочечными ДНК-зондами.

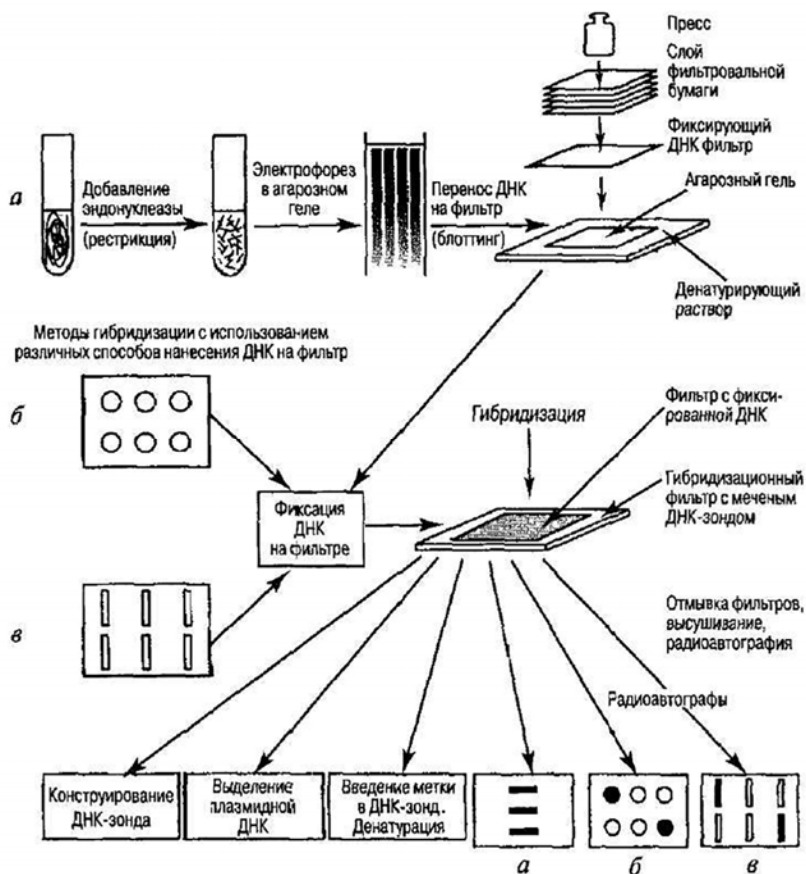


Рис. 11. Схема гибридизации ДНК по Э. Саутерну
(Материалы сайта http://mir.zavantag.com/pars_docs/refs/677/676748/676748_html_485d8da3.jpg)

Каждая пластинка может содержать несколько десятков тысяч зондов, расположенных в определенной последовательности. Метка проявляется только в спаренных двуцепочечных фрагментах. Если в исследуемом образце есть последовательности, комплементарные последовательностям ДНК зонда, то гибридизацию можно определить с помощью специальных приборов. Результаты гибридизации могут быть обнаружены различными способами, которые

определяются типом метки (радиоактивные изотопы, биотинилированные зонды, хемилюминесцентные или флуоресцентные зонды). Чипы дешевы, надежны, просты в обращении, могут использоваться многократно. Основные недостатки метода – дорогая аппаратура для работы с чипами, невозможность полной автоматизации, ограничения в отношении чувствительности (для ее проведения необходимо располагать достаточным количеством ДНК от 10 тыс. бактериальных клеток).

Принципиально новое направление в развитии систем регистрации: *оптические биосенсоры*. Диагностика патогенов посредством данных устройств не требует модификации ПЦР-продуктов или введения зондов. Биосенсоры позволяют определять в режиме реального времени пикогаммы фрагментов нуклеиновых кислот, иммобилизованных на поверхности оптической ячейки. Конструкция ячейки дает возможность проводить ее регенерацию после каждого цикла определения и многократно использовать одну и ту же ячейку. Применение оптических биосенсоров может быть перспективным для количественной детекции фитопатогенов [4, 6].

2.5. Технологии с использованием иммунных методов

При анализе фитопатогенных объектов широко используются технологии идентификации, основанные на взаимодействии антигена и антитела. Антигены воспринимаются организмом как чужеродные и вызывают специфический иммунный ответ [4, 6]. Антитела образуются в организме высокоорганизованных животных под воздействием антигенов. Это гликопротеины, обладающие свойством специфично и с высоким сродством связываться с антигеном (рис. 12).

Это свойство успешно используется во многих технологиях диагностики патогенных микроорганизмов. После связывания антиген и антитело образуют прочный иммунохимический комплекс, который может регистрироваться визуально или под микроскопом (агглютинация и преципитация).

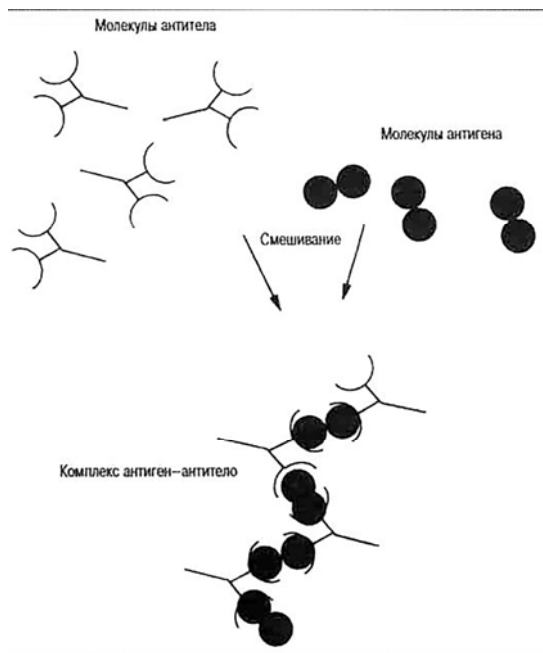


Рис. 12. Взаимодействие антигена с антителом
(Материалы сайта https://studfiles.net/html/5992/274/html_DKDSYk7Dm4.hcm5/htmlconvd-_gVITZ5x1.jpg)

Для любого иммунологического теста необходимы специфические *антитела*. Антитела синтезируются плазматическими клетками организма животных (плазмócитами), в которые превращается часть β -лимфоцитов в ответ на присутствие антигенов [4, 6].

Антитела распознают антигены, связываясь с определенным эпитопом, характерным фрагментом поверхности или линейной аминокислотной цепи антигена. Основным свойством специфических антител является их аффинность, которая характеризует прочность связывания антигена с антителом.

В иммунодиагностике используют поли- и моноклональные антитела. Поликлональные антитела получают из сыворотки крови иммунизированного животного (обычно кролика, барана или козы). Образуются они в результате функционирования многочисленных

клеточных клонов, гетерогенны как по своей природе, так и по специфичности к определяемому антигену.

В ряде случаев при диагностировании патогенов из природной популяции гетерогенность поликлональных антител является преимуществом, так как позволяет идентифицировать объекты, отличающиеся вариабельностью антигенной конфигурации. Однако присутствие среди поликлональных антител фракции с низкой специфичностью может привести к взаимодействию с нецелевыми антителами и ложноположительным результатам.

Моноклональные антитела продуцируются одним клоном плазмочитов и отличаются очень высокой специфичностью к антигенному эпитопу. Они идентичны по своему строению, имеют одинаковые активные центры, обладают одной и той же специфичностью, взаимодействуют с одним и тем же эпитопом антигена с одинаковой аффинностью.

В природных условиях микроорганизма получить моноклональные антитела практически невозможно, для этого используют гибридную технологию. Гибридомы (гибридные клетки) получают путем слияния нормальных плазмачитов иммунизированных мышей, продуцирующих антитела, с опухолевыми клетками – миелобластами, способными к неограниченному во времени росту.

На практике использование моноклональных антител при диагностике может привести к получению ложноотрицательных результатов, так как из-за узкой специфичности они могут не распознать некоторые природные штаммы идентифицируемых фитопатогенов [4, 6].

Иммунофлуоресценция

Технология диагностики основана на химическом мечении участвующих в реакции антител флуоресцентными красителями, в результате чего иммунохимический комплекс может быть обнаружен по флуоресценции при взаимодействии антител с антигеном (флуоресцентная микроскопия, флуоресцентная спектроскопия, поляризационная флуоресценция); при выявлении с помощью электронной микроскопии: антитела метятся коллоидными части-

цами окрашенного латекса, золота, серебра, квантовым точкам, после чего иммунохимический комплекс детектируется.

Прямой способ проводится с конъюгатами антиген-специфичных антител, непрямой – с использованием несущих флуоресцентную метку вторичных антител. Долгой и трудоемкой операцией является подсчет числа флуоресцирующих единиц, для чего применяются специальные приборы. К недостаткам метода следует отнести возможность блокировки иммунохимической реакции компонентами образца или искажения ее результатов. Растительные ткани и почва имеют собственную флуоресценцию, иногда происходит неспецифическая сорбция антител на частицах образца, наблюдаются перекрестные реакции с другими микроорганизмами. Эти ограничения следует учитывать при разработке диагностических методик на основе иммунофлуоресценции [4, 6].

На практике данный метод применяют для детекции обитающих в почве видов грибов из рода *Fusarium* и *Phytophthora* как один из способов определения локализации патогенов в растении и диагностики некоторых бактериальных болезней.

Иммуноблоттинг

При реализации технологии анализируемые белки разделяют с помощью методов электрофореза или электрофокусирования, после чего их переносят на нитроцеллюлозную мембрану, которую инкубируют в растворе меченых антител, выявляя связавшиеся антитела с помощью радиоизотопного или ферментного методов. Обеспечивает высокую разрешающую способность за счет электрофоретического разделения белков и обнаружения среди них антигена(ов) с помощью гомологичных антител или антисывороток. Если после электрофореза получают белки в денатурированном состоянии, которые не распознаются антителами, специфичными к нативным белкам, то применяют антисыворотки против входящих в состав белков пептидов. Заключительная стадия иммуноблоттинга фактически является вариантом твердофазного ИФА.

С помощью данного метода идентифицируют вирусы, содержащиеся в растительных экстрактах, и устанавливают их наличие в

клетках насекомых-переносчиков, выявляют серотипы у вирусов растений, устанавливают степень родства между их штаммами [4, 6].

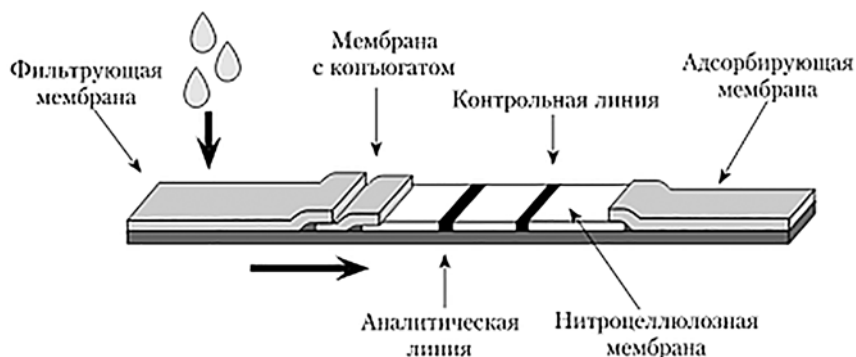
Иммунологический анализ в тканях растений

Технология иммунных отпечатков (ТВІ) позволяет с большой точностью локализовать антигены фитопатогенных организмов (главным образом, вирусов и в меньшей степени грибов, бактерий и фитоплазм) в растительных тканях. Тест представляет собой перенос антигенов исследуемого образца с поверхности среза растительной ткани на поверхность нитроцеллюлозной мембраны путем блоттинга с последующим выявлением иммобилизованных на мембране антигенов антителами, несущими ферментную метку. ТВІ может быть прямым или косвенным в зависимости от использования для локализации возбудителя вирус-специфичных или видоспецифичных антител конъюгатов (или протеина А). Щелочная фосфатаза – более подходящий фермент при использовании данной технологии. Конечный окрашенный продукт ферментативной реакции должен быть нерастворимым и оставаться на мембране, в том месте, где произошло иммунохимическое взаимодействие. Для того чтобы ТВІ была применима для тканей, содержащих большие количества эндогенных пигментов, мешающих локализации антигенов, используют хемилюминесцентные субстраты и рентгеновскую пленку [4, 6].

Иммунохроматография

Для экспресс-анализа наличия фитопатогенов используют технологии с использованием методов иммуно-хроматографического анализа, или устройства с «латеральным потоком». Часто их называют тест-полоски. На тест-полоске последовательно расположены зона нанесения образца (фильтрующая мембрана); мембрана с антителами (специфичными к определяемому антигену), мечеными частицами окрашенного латекса или коллоидного золота (мембрана с конъюгатом); нитроцеллюлозная мембрана с участком специ-

фичных к определяемому антигену антител (аналитическая линия) и участком антивидовых антител, которые связываются с участками меченых антител, характерными для того животного, в котором они были получены (контрольная линия); поглощающая зона из впитывающего материала (рис. 13).



*Рис. 13. Устройство тест-полоски
(по А.Н. Блинцову, Ю.Ф. Дрыгину)*

Исследуемый образец растирают в специальном буферном растворе, твердым частицам дают осесть в течение нескольких минут. Надосадочную жидкость наносят на фильтрующую мембрану, после чего на мембране она смешивается в определенной пропорции с конъюгатом – специфичными к определяемому антигену антителами, связанными с окрашенными частицами латекса или коллоидного золота. Частицы образовавшегося комплекса передвигаются с током жидкости к нитроцеллюлозной мембране, в определенном месте которой («аналитическая линия») находятся другие антитела, также специфичные к антигену. Молекулы этих антител связывают частицы движущегося комплекса, в результате чего в тестовой зоне концентрируются окрашенные частицы и образуется видимая глазом полоса, свидетельствующая о наличии определяемого возбудителя в образце. Когда комплекс достигает «контрольной линии», на ней происходит связывание всех достигших ее меченых антител. Появление видимой полосы около «контрольной линии» свидетельствует о том, что миграция образца вдоль мембраны прошла

нормально, следовательно, анализ выполнен правильно и его результаты достоверны [4, 6].

На мембране комбинированных тест-полосок, предназначенных для определения нескольких возбудителей одновременно, антигены разной специфичности присутствуют в нескольких тестовых зонах (присутствуют несколько «аналитических линий»), соответственно в результате анализа может окраситься несколько тестовых полос, обычно разного цвета, соответствующего присутствующим в образце возбудителям.

Иммуноферментный анализ

Технология включает в себя иммунохимическую и ферментативную реакции. В процессе иммунохимической реакции происходит связывание антитела с обнаруживаемым антигеном, в то время как ферментная реакция (химическая реакция, при которой одно вещество под действием фермента превращается в другое) позволяет увидеть и измерить результат иммунологической реакции (рис. 14).

Вещество, на которое действует фермент, называется субстратом, а вещество, которое получается при воздействии ферментом, – продуктом ферментативной реакции. Наиболее широко используются антитела, химически связанные (конъюгированные) с молекулами ферментов пероксидазы хрена, бета-галактозидазы, щелочной фосфатазы. После образования комплекса антигена с ферментом и мечеными антителами проводят разделение компонентов иммунохимической системы, затем добавляют субстрат. В ходе ферментативной реакции идет образование окрашенного продукта; интенсивность окрашивания прямо пропорциональна количеству связавшихся молекул антигена и антител [4, 6].

Возможность иммобилизации антигена и антитела на различных носителях с сохранением их связывающей активности позволила создать самый популярный в настоящее время твердофазный ИФА (один из компонентов иммунной реакции сорбирован на твердом носителе, например, на лунках планшета из полистирола). Такую технологию проведения анализа, при которой на полистироле сорбируют антитела, называют сэндвич-ИФА.

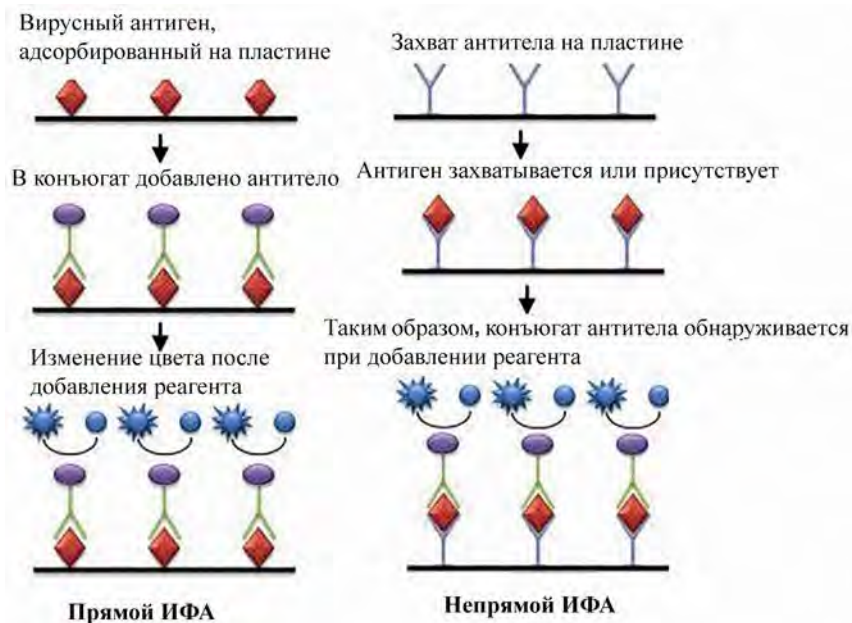


Рис. 14. Виды ИФА

(Материалы сайта <http://andrologmed.ru/wp-content/uploads/2017/09/princip-provedeniya-ifa.jpg>)

Другой вариант твердофазного ИФА-анализа – РТА-ИФА.

При идентификации фитопатогенных организмов наибольшее распространение из иммунных получили технологии, основанные на методе иммуноферментного анализа, среди десятков вариантов которого в диагностике инфекционных заболеваний наиболее популярна одна из его разновидностей – гетерогенный твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Диагностические наборы, оборудование и материалы для ELISA продаются компаниями «Agdia», «Elkhardt», «ADGEN Phytodiagnostic» и др. [6].

Иммуноферментный сорбционный анализ – ELISA

Является рутинным лабораторным методом диагностики фитоплазм, бактерий, грибов, особенно вирусов в лаборатор-

ных условиях, широко используется для обнаружения этих патогенов в растениях, почве, воздухе, в других биологических образцах и объектах окружающей среды. Простота и высокая производительность ELISA делают его удобным для выявления как заболеваний растений, так и границ распространения их возбудителей. Данный метод широко используется для диагностики вирусов в семенах и посевном материале. Коммерческие реагенты и диагностические наборы разработаны для идентификации более 100 вирусов культурных растений. Среди них, включая изоляты и серотипы, около 25 вирусов зерновых злаков (ячменя, кукурузы, риса, сорго, пшеницы, овса) и 3 вируса злаковых трав (костра, травы Джонсона); 7 вирусов зернобобовых и фуражных бобовых растений (фасоли, гороха, сои, вигны, красного клевера); 17 вирусов фруктовых (яблони, банана, вишни, цитрусов, сливы, папайи, персика, ананаса) и 20 вирусов ягодных (голубики, винограда, малины, клубники) культур; 51 вирус овощей, бахчевых и корнеплодов (свеклы, цветной капусты, сельдерея, огурца, хмеля, лука-порея, латука, перца, лука, картофеля, редиса, лука-шалота, кабачка, томата, турнепса и цуккини), 8 вирусов табака, 2 вируса арахиса и 2 вируса сахарного тростника. ELISA успешно используют для фитопатогенных бактерий, принадлежащих к родам *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Peetobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Xylophilus* [6].

Технология, основанная на методе ELISA, дает возможность обнаруживать латентную инфекцию и выявлять фитопатогенные грибы на ранних стадиях развития заболевания до появления его симптомов. С ее помощью определяют содержание биомассы патогенов в тканях зараженных растений. ELISA также используют для диагностики фитоплазм, но антитысыворотки удалось получить для сравнительно небольшого их числа [6].

Для своевременной диагностики заболеваний сельскохозяйственных растений крайне важно экспрессное тестирование в полевых условиях с чувствительностью, выявляющей латентные инфекции. В институте биохимии им. А.Н. Баха, Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН предложены методы амплификации сигнала в технологиях иммунохроматографического анализа, позволяющие повысить чувствительность

тест-систем, апробированные на примерах основных патогенов картофеля.

Методы обеспечивают выявление патогенов в низких концентрациях, не вызывающих симптомов у пораженных растений (для вирусов <10 нг/мл, для бактерий <10⁴ кл/мл).

Сочетание функционализированных магнитных наночастиц (МНЧ) и золотых наночастиц (НЧЗ) в первом методе позволяет снизить предел обнаружения в 32 раза по сравнению с традиционным ИХА, в котором используются только НЧЗ.

Второй метод амплификации, основанный на накоплении продуктов ферментативной реакции, реализован с использованием щелочной фосфатазы. Для введения фермента применена схема с двумя конъюгатами: НЧЗ-фермент – антивидовые антитела и НЧЗ-антитела, специфичные к патогену. Предел обнаружения данного ИХА после добавления субстратной смеси в 27 раз ниже по сравнению с традиционным ИХА. Разработанные методы не требуют много времени (менее 10 мин), выполняются без использования дополнительного оборудования [28].

Специалистами ЗАО НВП «Иммунотех» МГУ имени М.В. Ломоносова в сотрудничестве с ВНИИКХ имени А.Г. Лорха предложена эффективная технология проведения анализа семенного материала на вирусную инфекцию.

Для массового анализа вирусных заболеваний исходного семенного материала экономически целесообразно использовать двухэтапный подход. На первом этапе применяют доступный даже в полевых условиях экспресс-метод диагностики (иммунохроматографический метод на тест-полосках в формате «да-нет», с помощью которого отбраковывается явно зараженный материал. Это простой, надежный, высокоспецифичный и высокочувствительный экспресс-метод для широкого круга вирусов, позволяющий проводить экспресс-диагностику в полевых условиях без специальных навыков и оборудования. Использование меток (окрашенные латексы, красители, коллоидное золото, липосомы с красителем, углеродные частицы и т.д.) позволяет проводить анализ путем простого визуального считывания, при этом чувствительность диагностики достаточно высока (определение вируса табачной мозаики в неосветленном соке листьев табака, разбавленном в 10 раз, состав-

ляет 1 нг/мл, а полное время анализа – 2 мин; вирусов Y, S и M картофеля – в пределах 10-50 нг/мл). Для количественной оценки результатов можно использовать лабораторные и полевые рефлектометры, разработанные в лаборатории Б.Б. Дзантиева (ИНБИ имени А.Н. Баха РАН).

На втором этапе для анализа оставшихся растений надо применять технологии с использованием ИФА или ПЦР. Прошедший двухэтапный отбор семенной материал подлежит размножению и гарантирует высокий урожай в поле при подходящих климатических условиях.

Дальнейшее развитие иммунохроматографического анализа как метода диагностики патогенов возможно путем создания иммуночипов как для определения круга вирусов отдельных районированных культур растений (овощные, ягодные, косточковые и др.), так и для наиболее экономически опасных представителей фитопатогенов, наносящих ущерб в данном регионе [29].

Актуальным является выявление довизуальных признаков проявления болезней растений, обеспечивающееся высокочувствительными и специфичными методами анализа растительного материала, зараженного фитопатогенами, основанными на технологии с использованием *ELISA-мет.* Данный метод позволяет повысить чувствительность анализа и сократить время тестирования до нескольких часов.

В Орловском ГАУ (г. Орел) была разработана тест-система с использованием метода иммуноферментного анализа на наличие фитопатогена *Fusarium oxysporum* в овощных и зеленных культурах, обработанных различными препаратами. В результате исследований была доказана эффективность тест-системы на основе иммуноферментного анализа для определения фитопатогена *Fusarium oxysporum*, вызывающего корневые гнили овощных культур в условиях закрытого грунта [30, 31].

Как показал анализ литературных источников, технологии диагностики, основанные на методе иммунохроматографии, очень перспективны для экспресс-диагностики, поскольку позволяют проводить анализ в полевых условиях в течение 10-15 мин без использования специального оборудования. Однако они обладают низкой, по сравнению с ИФА и ПЦР, чувствительностью и специ-

фичностью по отношению к некоторым грибным и бактериальным патогенам и в большинстве случаев доступны только в формате «один тест – один патоген». Такие особенности не позволяют адаптировать данную технологию для надежного анализа на присутствие спектра целевых патогенов и их комбинаций.

Технологии, основанные на методах иммуноферментного анализа (ИФА), высокочувствительны, точны, позволяют количественно определять до 1 нг/мл патогена. Но для их применения необходимы квалифицированный персонал и дорогостоящее оборудование, что ограничивает область их применения специализированными лабораториями.

2.6. Технология на основе метода диагностики по составу жирных кислот

Тип продуцируемых жирных кислот и относительные концентрации индивидуальных жирных кислот строго зависят от генотипа и являются характерными для того или иного микроорганизма или даже его штамма. На композицию жирных кислот влияют условия культивирования, состав сред, температура и время инкубации. Если обеспечить их постоянство, то количественный и качественный состав жирных кислот становится хорошо воспроизводимым и стабильным [4, 6].

Компания «MIDI» (США) предлагает технологию диагностики, реализуемую с помощью метода идентификации бактерий по составу жирных кислот с помощью газожидкостной хроматографии. Чтобы стандартизировать условия выращивания, специалисты компании используют автоматизацию процесса, специальное программное обеспечение (Microbial Identification System; Microbial ID, Inc., [MIDI], Newark, DE). Система хроматографии определяет состав комплекса жирных кислот в клетках микроорганизмов, затем сравнивает его с профилями жирных кислот, хранящихся в базе данных (MIDI Sherlock). Отличительные особенности базы: извлечение образца для идентификации менее чем за 15 мин; автоматизированный анализ, прямая пробоподготовка, не требуются опыт работы в проведении генетического анализа и использование тест-

систем; одна процедура для всех; при пробоподготовке убивается микроорганизм, что обеспечивает безопасность работы.

Фирма предлагает две системы идентификации: одну для бактерий и дрожжей с базой данных, содержащей информацию о более чем 1500 видах, другую – для микобактерий, позволяющую определять 25 видов микобактерий и 35 видов других организмов. В базы данных включены сведения о составе комплекса жирных кислот при разных условиях выращивания [4, 6]. Несмотря на эффективность диагностики, применение данной технологии ограничено необходимостью приобретения дорогостоящего оборудования и документации.

3. ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАТОГЕНОВ

Растениеводство выходит на новый уровень развития, основанный на применении интеллектуальных технологий. Для принятия решений и устранения проблем специалисты используют интегрированные компьютерные системы с введенными результатами непосредственных измерений и наблюдений на полях, выполненных бесконтактными и контактными датчиками; изображениями, получаемыми с летательных аппаратов и спутников; материалы многолетних наблюдений и измерений из хранилища данных.

Для защиты растений к основным составляющим интеллектуального сельского хозяйства относятся полная оценка фитосанитарных и иных рисков; технологическая реализуемость принимаемых решений с учетом пространственного распределения фитосанитарной ситуации в пределах одного поля.

Можно выделить следующие виды оцифровки данных, их последующей цифровой обработки и применения для защиты растений: цифровая диагностика, цифровой фитосанитарный мониторинг, компьютерные системы поддержки принятия решений управления, роботизированные системы защиты растений. Основными методами технологий интеллектуального анализа являются нейронные сети, деревья решений, ассоциации, кластеризация, генетические алгоритмы, многомерная визуализация и др.

В ВНИИ биологической защиты растений (г. Краснодар) изучается возможность дистанционной диагностики очагов грибных болезней зерновых культур (по количеству спор фитопатогенных грибов, обнаруживаемых в воздухе над пораженными посевами) с помощью беспилотных летательных аппаратов.

Применение прибора «Определитель заспорошенности растений» (ОЗР 1мп) значительно упрощает технологию диагностики, но требует значительных затрат труда и времени. Специалистами ВНИИ биологической защиты растений предлагается технология обнаружения очагов поражения посевов грибными болезнями с помощью мультикоптера, оснащенного пробоотборником воздуха. Мультикоптер грузоподъемностью до 1 кг управляется дистанционно оператором и с использованием программного обеспечения, установ-

ленного на мобильном компьютерном устройстве. Оснащен видеокамерой и датчиком позиционирования GPS, обеспечивающими ориентированное управление полетом.

Основным устройством, предназначенным для отбора проб воздуха над посевами и в травостое, служит миниатюрный пробоотборник (рис. 15).

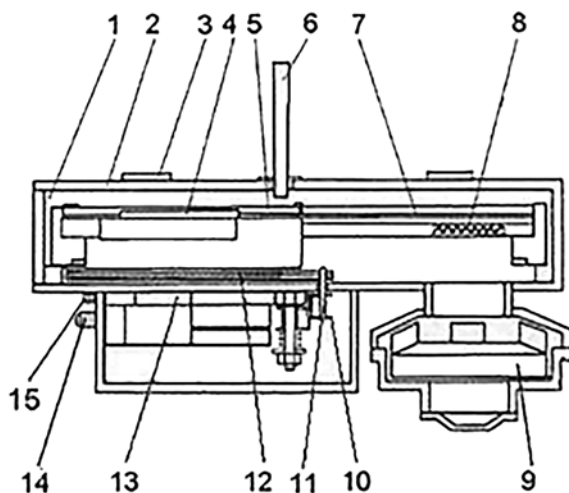


Рис. 15. Принципиальная схема устройства пробоотборника ПСЛ-2:

- 1 – корпус; 2 – крышка; 3 – шарнир; 4 – стеклодержатель;*
- 5 – стекло предметное; 6 – всасывающий патрубок; 7 – направляющие;*
- 8 – пружина толкателя; 9 – аспиратор; 10 – рычаг шагового двигателя;*
- 11 – шток; 12 – планка зубчатая; 13 – электромагнит;*
- 14 – рычаг разблокировки привода стеклодержателя;*
- 15 – электрический разъем*

Предлагаемая технология отличается высокой оперативностью и низкой трудоемкостью. В пробах, отбираемых пробоотборником ПСЛ-2, установленном на БПЛА, обнаруживалось в среднем в 1,3 раза больше спор, чем в пробах контрольного прибора ОЗР-1мп [32].

Фитосанитарная диагностика с использованием средств вычислительной техники позволяет собрать и проанализировать инфор-

мацию, которая дает четкое представление о состоянии посевов и насаждений, экологической обстановке, состоянии и диагностике популяций вредных и полезных организмов.

Одним из направлений фитосанитарной информатики, интенсивно разрабатываемых в научных учреждениях, является автоматизация получения, обработки и передачи данных, необходимых для комплексного мониторинга и прогноза. Разработаны технические и программные средства, позволяющие непосредственно в поле проводить сбор метеорологической, фитосанитарной и иной агроэкологической информации, ее автоматическую обработку, передачу и представление потребителю соответствующих рекомендаций по защите растений.

В результате компьютерной фитосанитарной диагностики определяют пространственную структуру популяций по видам вредных организмов, градации их заселения по типам сельскохозяйственных угодий, культурам, полям (земельным участкам). Определяют также площади, подлежащие интегрированной защите растений, с учетом фактической заселенности вредными организмами, общей экологической обстановки и экономических порогов вредоносности.

Специалистам и практикам по защите растений требуются фитосанитарные базы данных (БД), совмещенные с прогностическими и информационными системами. К наиболее заметным проектам относится интерактивный «Атлас сорных растений, вредителей и болезней сельскохозяйственных культур» как составная часть Агроатласа. Основные его достоинства: обновленные справочные материалы по 640 видам вредителей, сорняков и возбудителей болезней и подготовка для них карт распространения и вредоносности.

Специалистами ФГБНУ ВИЗР разработана в среде SQL-сервер – диалоговая БД по вредителям сельскохозяйственных культур. Новая «База данных фитосанитарного мониторинга агроэкосистем в Российской Федерации» предназначена для специалистов всей страны, работающих как в производственных (государственные и частные), так и научно-исследовательских, учебных учреждениях сельскохозяйственного профиля, проводящих фитосанитарный мониторинг.



Рис. 16. Схема проведения фитосанитарной диагностики

В области защиты растений можно выделить программу «КО-РАЛЛ – Вредители и болезни сельскохозяйственных культур». Она способна диагностировать и определить источники повреждения и поражения растений путем ввода в систему внешних признаков вредителей, поражений и болезней. В процессе работы с программой система задает пользователю (агроному, фермеру, специалисту станции по защите растений, садоводу или огороднику) уточняющие вопросы и выдает подсказки. Пользователю программы также доступны необходимые информационные материалы (характеристики повреждений растения, методики обследования поражений и др.). По завершении диагностики пользователю выдается информация о необходимых мерах борьбы с вредителями или болезнями сельскохозяйственных растений и технологии проведения этих мер. Примерная технологическая схема действия системы представлена на рис. 16 [33].

Основная задача системы защиты растений – не допустить снижения количества и качества урожая сельскохозяйственных растений из-за повреждения болезнями, а значит – массового заражения растений. В этой связи актуальными технологиями противостояния фитопатогенам становятся ранняя диагностика и *прогнозирование*.

Прогнозирование наиболее перспективно для болезней, которые связаны с переносчиком фитофагом или опылителем; группы заболеваний, вызываемых семенной инфекцией, сохраняющихся на сорных растениях, в почве или на культурах-предшественниках. В настоящее время прогноз развития болезней остается нерешенной задачей.

Система прогнозирования может использовать один или несколько параметров, влияющих на жизнедеятельность патогена, чтобы оценить вероятность заболевания. Так, для болезни Стюарта на кукурузе в модели учитывается индекс зимней температуры, так как низкая температура убивает переносчика этого патогена. По данным ООО ИЦ, для прогнозирования заболевания бактериальным ожогом в современных моделях прогнозирования (MARY-BLYTTM, Billings Integrated System, «Cougar blight») в качестве главного фактора учитывают дождь или росу для определения дней инфекционного риска, потому что заражение цветов плодовых розоцветных происходит при наличии капельной влаги.

Модель MARYBLYTTM построена на предположении, что есть избыток инокулюма и для заражения цветков необходимо сочетание определенных условий.

Когда все эти условия встречаются в указанной последовательности, то происходит заражение и можно ожидать появления первых симптомов бактериального ожога, если при температуре выше 12,7°C накапливаются дополнительно 57 градусо-дней.

Модель Cougar blight оценивает темп роста бактерий в градусо-часах, основываясь на кривой скорости роста бактерий. Значения градусо-часа складываются каждый час дня, когда температура выше 15°C. Значение увеличивается, если температура повышается от 15 до 29°C, уменьшается при температуре выше и достигает 0 при температуре выше 40°C.

Роса измеряется датчиками влажности листьев, установленными в тени садов. Увлажнение листьев, продолжающееся более 2 ч, принимается как интенсивная роса [34].

Актуальными технологиями защиты растений становятся прогнозирование и системы поддержки правильных решений для сельскохозяйственных производителей. Научные исследования в данной области ведутся во многих научных и производственных организациях в России и за рубежом, обобщенные данные о них представлены в табл. 3.

Таблица 3

Примеры разработанных моделей прогнозирования и диагностики
[35-42]

Название разработки, разработчик	Краткая характеристика	Возможности использования
Методика прогнозирования крупномасштабного распространения эпидемий на примере бурой ржавчины и модель прогнозирования заражения для пшеницы разных сортов с учётом концентрации уредоспор ржавчины в атмосфере (ФГБНУ ВНИИФ)	Получены на основе экспериментов по заражению растений от «воздушного» инокулюма с применением метода наименьших квадратов	Позволяет получить данные о количестве инокулюма над посевами зерновых, потоке примесей над посевами, агрессивности патогена – его инфекционности. Является хорошей основой для дальнейшего использования при прогнозе развития ржавчинных заболеваний и определения

Название разработки, разработчик	Краткая характеристика	Возможности использования
		затрат на борьбу с ними как внутри отдельного хозяйства, района, области, так и для России в целом
Математические модели и компьютерные программы, система адаптации (адресной оптимизации) защитных мероприятий на основе фитосанитарной и агроэкологической экспертизы защищаемых полей (ФГБНУ ВНИИФ совместно с Московским НИИ сельского хозяйства (лаборатория академика Б.И. Сандухадзе)	Основаны на взаимосвязи сортовых особенностей растения, агрофона, погодных факторов, инфекционных потенциалов болезней и эпифитотических процессов заболеваний	Применение обеспечивает экономии пестицидов в 1,0-1,5 раза, повышение эффективности защиты на 20-30%, увеличение чистой прибыли в 1,5-2,0 раза по сравнению с традиционными технологиями. Компьютерный вариант находится в свободном доступе на сайте института http:// www.vniif.ru/ и может быть использован при планировании и проведении мероприятий по защите озимой пшеницы от комплекса болезней
Дерево решений (ДР), система интеллектуального анализа для прогнозирования заболеваний (Отдел эпидемиологии и фитосанитарии болезней зерновых культур ФГБНУ ВНИИФ)	Для моделирования был использован пакет KNIME (http://www.knime.org)	После создания ДР можно построить прогнозные правила на естественном языке, наглядно интерпретировать полученные результаты разделить набор данных на основе их однородности. ДР применяется для количественной оценки однородности данных, принадлежащих к определенному классу, расчёта энтропии

Название разработки, разработчик	Краткая характеристика	Возможности использования
Системы многофакторного фитосанитарного анализа для управления защитой агроценозов от вредных организмов, системы поддержки правильных решений (СППР-DSS)		
Система PRO PLANT EXPERТ (Германия)	На базе Интернета	Предоставляет сельхоз-производителю (фермеру) данные о необходимых действиях в случае возникновения опасных фитопатогенных ситуаций
Система PLANT-PLUS (фирма «Dacom», Нидерланды)	То же	Учитывает информацию о состоянии растений разных сельскохозяйственных культур, развитии болезней, погоде, предшественниках и др. Рекомендует, когда и как обрабатывать посевы фунгицидами.
Система LANDBRUGS INFO (Дания)	-//-	Разработана и эксплуатируется: издана в помощь консультантам и фермерам при принятии оперативных решений по возделыванию ряда полевых культур с учетом агрометеорологической и фитосанитарной ситуации, для поддержки принятия решений по защите зерновых культур от болезней. Система учитывает метеоусловия (фактические и прогнозируемые), агроэкологические
Система DESSAS (Англия)	Устанавливается на компьютер пользователя	

Название разработки, разработчик	Краткая характеристика	Возможности использования
		условия, распространение болезни и др. Рекомендует такие элементы управления, как выбор сорта, дата опрыскиваний, фунгицид, его доза
Фитосанитарные экспертные системы (математические, логические, сценарные) (ФГБНУ ВНИИФ)	Прошли государственную регистрацию, опубликованы, доступны для широкого круга пользователей	Моделируют развитие эпидемически опасных болезней озимой и яровой пшеницы с учетом складывающихся условий. На их основе разработаны консультативные компьютерные программы: «Защита пшеницы от ржавчины», «Защита пшеницы от септориоза», «Защита пшеницы от мучнистой росы»
Информационная система поддержки принятия решений по борьбе с заболеваниями растений «АГРОДОЗОР» (http://agrodozor.ru) (ООО «Агродозор» (г. Белгород) совместно с сотрудниками ФГБНУ ВНИИФ)	В автоматическом режиме обрабатывает внесённую пользователем информацию, а также метеорологические данные и данные дистанционного зондирования земли	При подключении в систему вводятся координаты и контур обрабатываемых полей, производится регистрация пользователей организации. Затем обеспечивается доступ к личному кабинету, в котором для каждого поля можно внести данные, необходимые для формирования рекомендаций по проведению защитных мероприятий. В случае изменения фитопатогенной обстановки и появления необходимости в проведении защитных мероприятий система

Название разработки, разработчик	Краткая характеристика	Возможности использования
		автоматически оповестит об этом пользователей организации по электронной почте и уведомлением в мобильном приложении, а также изменит статус пол-лей
Методология картирования и проведения анализа ареалов и зон вредоносности патогенов культурных растений и сорняков, распространенных на территории РФ (ФГБНУ ВИЗР)	Характеризует особенности пространственного распределения и градации зон вредоносности 636 вредных объектов (в том числе 193 болезни)	Комплексное фитосанитарное районирование территории. Формирует обобщенное представление об ареале и вредоносности в многолетнем плане. Данные могут служить основой для дальнейших научных исследований как в плане совершенствования уже существующих композиций, так и детализации их для отдельных регионов и построения крупномасштабных карт. Для развития этого направления особенно перспективны материалы дистанционного зондирования, получаемые с беспилотных летательных аппаратов, спутников и пилотируемых орбитальных станций и использование навигационной аппаратуры для точного определения мест обнаружения объектов во время полевых обследований сельскохозяйственных угодий

Название разработки, разработчик	Краткая характеристика	Возможности использования
Приложение с обобщенными спектрами классов пораженных сетчатой пятнистостью листьев озимого ячменя сорта Павел (ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилына»)	Измерены спектры графических изображений с помощью системы «Эйдос»	Установка системы «Эйдос» с разработанным приложением на планшет, оснащенный фотокамерой, превращает его в мобильную информационно-измерительную систему, которую можно использовать в полевых условиях для автоматизированного определения степени поражения озимого ячменя пятнистостью. Использование этой системы нетрудоемко, она обеспечивает высокую точность, объективность и сопоставимость фитопатологических измерений
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» и отделение защиты растений Россельхозакадемии)	На основе дистанционного зондирования, точечного учета распространения вредных организмов с пространственной привязкой	Передача организацией определённых видов или функций различных видов деятельности другим организациям в области фитосанитарии по направлению мониторинга и практического использования управления фитосанитарным состоянием для использования. С использованием «облака» – Яндекс

Название разработки, разработчик	Краткая характеристика	Возможности использования
Универсальные формулы прогноза для бурой ржавчины озимой пшеницы, применимые на территории Тамбовской области (Среднерусский филиал ФГБНУ «ФНЦ имени И.В. Мичурина», пос. Новая Жизнь, Тамбовская область; ФГБОУ ВО «Тамбовский ГУ имени Г.Р. Державина»; ФГБНУ «НИИ сельского хозяйства Юго-Востока», г. Саратов; ФГБОУ ВО «Тамбовский ГТУ», г. Тамбов)	Составлены на основе граничных факторов погоды, могут использоваться в отношении других болезней растений	Позволили выявить определенные закономерности развития возбудителя в зависимости от погодных условий. Могут стать основой нового направления исследований в рамках метеобиологического метода прогноза

В мире интенсивно ведутся разработка и внедрение информационных технологий в сельском хозяйстве, в том числе и в растениеводстве. Проанализировав представленные выше материалы научных исследований, модели и системы, можно сделать вывод, что источниками исходной информации служат результаты измерений и наблюдений на полях (данные с бесконтактных датчиков, установленных на сельскохозяйственной технике и с контактных – прикрепленных к растениям, с автоматических метеорологических станций, расположенных непосредственно на полях, изображений, получаемых с летательных аппаратов и спутников и др.), а также хранилища данных с материалами многолетних наблюдений и измерений. Информация, модели и технологические решения интегрируются в компьютеризированную систему, что делает их удобными для пользователя. Перспективность применения информационно-управляющих систем в защите растений подтверждается приведенными результатами научных исследований и разработками научных и производственных компаний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диагностика болезней и их возбудителей – важное звено в системе защиты растений. При определении патогена в диагностике используется спектр методов, с присущими им преимуществами и недостатками.

Визуальная диагностика не теряет своей актуальности, так как часто является предварительной для других диагностических технологий. Основным недостатком визуального метода можно считать ненадежность, обусловленную множеством причин. Это совпадение внешних признаков инфекционного поражения растений у многих болезней и физиологических нарушений, вызванных неблагоприятными внешними воздействиями; способность некоторых фитопатогенов вызывать бессимптомные заболевания или заболевания со слабо выраженными симптомами; необходимость высокой квалификации эксперта.

Еще один существенный минус диагностики по внешним проявлениям – поздний факт обнаружения заболевания, когда заражение распространилось на значительную площадь посевов. Таким образом, этот метод малоприменим для ранней диагностики или при наличии скрытой инфекции.

Технология диагностики возбудителей болезней с помощью выделения в чистую культуру с последующим микробиологическим исследованием является дешевым, но трудоемким методом, занимает много времени, имеет низкую производительность, не подходит для патогенов, которых трудно или невозможно культивировать *in vitro* и его практически невозможно автоматизировать. Зависимость от морфологического определения требует от исследователя обширных знаний классической таксономии.

Технологии с использованием методов визуального осмотра и микроскопирования перспективны для предварительных предположений о возможных возбудителях и подбора дальнейших методов диагностики.

Стремление повысить качество и упростить процесс диагностики обусловили внедрение в фитопатологию более современных технологий. Усовершенствовались фитопатологические методы (культуральные, гистохимические или биохимические методики,

электронная микроскопия вирусов), внедрены методы, основанные на молекулярной биологии и иммунологии, но им также присущи определенные характеристики, ограничивающие широкое использование.

Технологии диагностики, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), могут выявлять в растительной ткани присутствие ДНК любого организма, даже если выделить его в культуру уже невозможно, отличаются высокой чувствительностью и специфичностью, наличием количественной оценки присутствия объекта. Они подходят для определения любых патогенов даже на этапе до-визуального проявления болезни, что перспективно при диагностике заражения семян и посадочного материала, выявления карантинных объектов, идентификации патогенов. Многие научные, образовательные и производственные организации (ФГБНУ ВИЗР, ФГБНУ ВНИИФ, ИБХ имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ФГБУ ВНИИКР, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, ООО «АгроДиагностика», ООО «ГенБит») имеют разработки в области оптимизации процесса проведения ПЦР протестированные в практических условиях.

Но методы, основанные на ПЦР, отличаются высокой стоимостью приборов и реактивов, повышенными требованиями к организации помещений лаборатории и квалификации персонала. Еще одним ограничением для диагностики с использованием ПЦР является отсутствие тест систем для многих фитопатогенов. Реализация данных технологий требует значительных временных затрат, связанных с необходимостью доставки отобранных образцов в диагностическую лабораторию, накоплением проб для постановки анализа и доведением результатов до производителя.

Этого недостатка лишены тест-системы для реализации технологии диагностики на основе метода иммунохроматографии, позволяющие проводить анализ непосредственно в поле в течение 10-15 мин без использования специального оборудования. Примером подобных перспективных технологий являются разработанные в институте биохимии им. А.Н. Баха, Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН и апробированные на диагностике основных патогенов картофеля. Использование при амплификации сочетания функционализиро-

ванных магнитных наночастиц и золотых наночастиц позволяет снизить предел обнаружения в 32 раза по сравнению с традиционным методом иммунохроматографии, в котором применяются только золотые наночастицы.

Однако технологии на основе метода иммунохроматографии обладают низкой, по сравнению с ПЦР и ИФА, чувствительностью и специфичностью по отношению к некоторым патогенам и в большинстве случаев коммерчески доступны только в формате «один тест – один патоген». Такие особенности иммунохроматографического метода не позволяют адаптировать его для надежного анализа на присутствие спектра патогенов и их комбинаций.

Способ нивелирования недостатков ИХА предложен в ЗАО НВП «Иммунотех» МГУ имени М.В. Ломоносова в сотрудничестве с ВНИИКХ имени А.Г. Лорха для проведения массового анализа семенного материала на вирусную инфекцию. На первом этапе в полевых условиях используется технология на основе ИХА, с помощью которого отбраковывается явно зараженный материал. На втором этапе для анализа оставшихся растений применяются технологии с использованием ИФА или ПЦР. Такое сочетание очень эффективно и обеспечивает высокое качество проверенного посадочного материала.

Технологии диагностики с применением иммуноферментного анализа (ИФА) высокочувствительны, точны – позволяют количественно определять до 1 нг/мл патогена в экстрактах. Их использование обеспечивает выявление довизуальных признаков проявления болезней растений. Подобная технология, представляющая собой ELISA-тест, разработана в Орловском ГАУ. Она позволяет повысить чувствительность анализа и сократить время тестирования на наличие фитопатогена *Fusarium oxysporum* в овощных и зеленых культурах на нескольких часах.

Для применения технологий ИФА требуются квалифицированный персонал, дорогостоящее оборудование, что несмотря на большую перспективность ограничивает область их применения специализированными лабораториями.

Те же ограничения характерны для технологий с использованием методов идентификации по видам жирных кислот и на основе

гибридизации нуклеиновых кислот, которые очень мало применяются на практике.

Расширяются перспективы применения в системе защиты растений от болезней интеллектуальных и интернет-технологий, включающих в себя качественное прогнозирование фитопатогенных ситуаций, системы моделирования и поддержки принятия решений профилактических и защитных мероприятий, базирующихся на технологиях, объединяющих последние достижения науки о защите растений, инфокоммуникационных технологий, дистанционного зонирования земли, метеорологического прогнозирования, селекции, химической промышленности и др.

В мировой практике данные технологии занимают основное место в консультационном обслуживании сельскохозяйственных товаропроизводителей. В Российской Федерации разработки в этой области ведут многие научные и производственные организации (ВНИИ биологической защиты растений, ФГБНУ ВИЗР, ФГБНУ ВНИИФ, ООО «Агродозор», ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина», Московский НИИ сельского хозяйства «Немчиновка» и отделение защиты растений Россельхозакадемии, Среднерусский филиал ФГБНУ «ФНЦ имени И.В. Мичурина», ФГБОУ ВО «Тамбовский ГУ имени Г.Р. Державина», ФГБНУ «НИИ сельского хозяйства Юго-Востока», ФГБОУ ВО «Тамбовский ГТУ» и др.).

На основании проведенного анализа можно сделать вывод, что наиболее перспективными технологиями для диагностики патогенов сельскохозяйственных растений являются технологии с использованием методов ПЦР, иммуноферментного и иммунохроматографического анализов. Огромный потенциал для совершенствования диагностики и профилактики болезней у интеллектуальных и интернет-технологий.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. **Иващенко В.Г., Павлюшин В.А.** Интенсификация растениеводства и эколого-продукционный баланс агроэкосистем: снижение плодородия почв и фитосанитарная дестабилизация // Вестн. защиты растений. – 2017. – № 3 (93). – С. 5-16.
2. **Санин С.С.** Эпидемии болезней растений в условиях современного земледелия // Эпидемии болезней растений: мониторинг, прогноз, контроль: матер. Междунар. конф. (Большие Вяземы, Московская обл., 13-17 ноября 2017 г.). – Вып. 8. – С. 5-17.
3. **Соколов М.С., Санин С.С., Долженко В.И., Спиридонов Ю.Я., Глинушкин А.П., Каракотов, С.Д., Надыкта В.Д.** Концепция фундаментально-прикладных исследований защиты растений и урожая // Агрохимия. – 2017. – № 4. – С. 3-9.
4. **Дьяков Ю.Т., Еланский С.Н.** Общая фитопатология: учеб. пособ. для академического бакалавриата. – М.: Юрайт, 2018. – 230 с.
5. **Анисимов Б.В., Белов Г.Л., Варицев Ю.А., Еланский С.Н., Журомский Г.К., Завриев С.К., Зейрук В.Н., Иванюк В.Г., Кузнецова М.А., Пляхневич М.П., Пшеченков К.А., Симаков Е.А., Склярова Н.П., Сташевски З., Усков А.И., Яшина И.М.** Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. – М.: Картофелевод, 2009. – 272 с.
6. Фундаментальная фитопатология [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://agro-portal.su/fundamentalnaya-fitopatologiya> (дата обращения: 20.06.2018).
7. **Матвиенко Е.В.** Полевая и лабораторная диагностика болезней сорго в условиях Самарской области // Эпидемии болезней растений: мониторинг, прогноз, контроль: матер. Междунар. конф. (Большие Вяземы, Московская обл., 13-17 ноября 2017 г.). – Вып. 8. – С. 263-268.
8. **Хилевский В.А.** Фитопатологическая экспертиза семян и защита озимой пшеницы от болезней в условиях Ростовской области как залог будущего урожая // Защита зерновых культур от болезней, вредителей, сорняков: достижения и проблемы: матер. Междунар. науч.-практ. конф. (Большие Вяземы, Московская область, 05-09 декабря 2016 г.). – С. 161-165.
9. **Каракотов С.Д., Аршава Н.В., Башкатова М.Б., Божко КН., Желтова Е.В.** Высотехнологичные методы проведения мониторинга микроорганизмов, входящих в фитопатогенный комплекс семян пшеницы // Эпидемии болезней растений: мониторинг, прогноз, контроль: матер. Междунар. конф. (Большие Вяземы, Московская обл., 13-17 ноября 2017 г.). – Вып. 8. – С. 239-247.

10. **Иванова Н.В.** Использование полимеразной цепной реакции в диагностике вирусных заболеваний картофеля // Актуальные проблемы агропромышленного комплекса: сб. тр. науч.-практ. конф. преподавателей, студентов, магистрантов и аспирантов, посвящ. 80-летию Новосибирского государственного аграрного ун-та (г. Новосибирск, 7-11 ноября 2016 г.). – Т. С.-х. науки. Биологические науки. Ветеринарные науки / Новосибирский гос. аграр. ун-т. – Новосибирск: ИЦ «Золотой колос», 2016. – С. 22-28.

11. **Карлов Г.И., Хрусталева Л.И., Андреева Г.Н., Скоробогатова И.В.** Разработка методов высокоэффективного выявления фитопатогенов передающихся семенами и посадочным материалом на основе ДНК технологий: отчет о выполнении научно-исследовательских работ по государственному контракту № ГК-769-1/А от 03 октября 2005 г. / Мин-во сел. хоз-ва Российской Федерации, ФГОУ ВПО РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева. Рук. работы Г.И. Карлов. – М., 2007. – 199 с.

12. Проведение исследований по разработке и применению в системе сортового и семенного контроля сельскохозяйственных растений универсального метода сортовой идентификации, диагностики вирусов и бактерий на основе ПЦР-анализа (опыты на картофеле, фитопатогенах картофеля и возбудителе бактериального ожога плодовых). Отчет (заключительный) о выполнении плана научно-исследовательских работ в соответствии с доп. соглашением № 1 от 08.01.03.; рег. № 09/26 к госконтракту от 15.11.02 № 1798/26/ Всерос. ин-т с.-х. биотехнологии, 2003. – 36 л.

13. **Богоутдинов Д.З., Гирсова Н.В., Кастальева Т.Б.** К мониторингу фитоплазмозов плодовых и ягодных культур // Эпидемии болезней растений: мониторинг, прогноз, контроль: матер. Междунар. конф. (Большие Вяземы, Московская обл., 13-17 ноября 2017 г.). – Вып. 8. – С. 57-64.

14. **Рязанцев Д.Ю., Абрамов Д.Д., Завриев С.К.** Диагностика карантинных фитопатогенов методом ПЦР в формате FLASH // С.-х. биология. – 2009. – № 3. – С. 114-117.

15. **Рязанцев Д.Ю., Живаева Т.С., Приходько Ю.Н., Завриев С.К.** Диагностика ризомании сахарной свеклы // Защита и карантин растений. – 2012. – № 8. – С. 29-31.

16. **Стахеев А.А., Кондратьев М.О., Приходько Ю.Н., Завриев С.К. Живаева Т.С.** Диагностика карантинных вирусов рода *Nepovirus* методом количественной ПЦР [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://agrodiagnostica.ru/docsandinstructions/articles/nepovirus.html> (дата обращения: 20.06.2018)

17. **Рязанцев Д.Ю., Дробязина П.Е., Завриев С.К.** ПЦР-Диагностика андийских вирусов картофеля // Защита и карантин растений. – 2015. – № 2. – С. 40-42.

18. Наборы для ПЦР. Тест-системы для диагностики инфекционных заболеваний растений методом ПЦР [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://www.agrodiagnostica.ru/pcr/> (дата обращения: 20.06.2018).

19. **Теплов В.** Здоровье растений обеспечит «АгроДиагностика» // Актуальные агросистемы. – 2018. – Май. – С. 36-38. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://www.agrodiagnostica.ru/pcr/> (дата обращения: 20.06.2018).

20. Продукция ДНК-Технология [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://www.dna-technology.ru/about> (дата обращения: 22.06.2018).

21. **Словарева О.Ю., Корнев К.П.** Оптимизация методов обнаружения и идентификации *Acidovorax citrulli* (Schaad et al.), возбудителя бактериальной пятнистости тыквенных культур // Эпидемии болезней растений: мониторинг, прогноз, контроль: матер. Междунар. конф. (Большие Вяземы, Московская обл., 13-17 ноября 2017 г.). – Вып. 8. – С. 294-301.

22. Продукция. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://dialat.ru/> (дата обращения: 22.06.2018).

23. **Стахеев А.А., Самохвалова Л.В., Завриев С.К.** Новые специфичные ДНК-маркеры для исследования генетического разнообразия российской популяции грибов рода *Fusarium* и их видоспецифичной идентификации // Защита зерновых культур от болезней, вредителей, сорняков: достижения и проблемы: матер. Междунар. науч.-практ. конф. (Большие Вяземы, Московская обл., 05-09 декабря 2016 г.). – С. 16-23.

24. **Семенов А.Н., Дивашук М.Г., Карлов Г.И., Терешонкова Т.Д., Соколова Л.М., Егорова А.А., Ховрин А.Н., Леунов В.И., Алексеева К.Л.** Идентификация грибов рода *Fusarium* // Картофель и овощи. – 2016. – № 2. – С. 18-20.

25. Широкомасштабный скрининг РНК- и ДНК-содержащих патогенов картофеля при помощи ПЦР в матричном формате / П.А. Французов, М.М. Никитин, А.М. Малько и др. // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32. – № 3. – С. 45-49. 001:10.24411/0235-2451-2018-10309.

26. **Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П., Орина А.С., Казарцев И.А., Ганнибал Ф.Б.** Сравнение методов выявления в зерне токсинопродуцирующих грибов рода *Fusarium* // Микология и фитопатология. – 2017. – Т. 51. – Вып. 5. – С. 292-298.

27. **Морозова О.Н., Шнейдер Ю.А., Белошапкина О.О.** Отработка методов диагностики особо опасных тосповирусов в растениях хозяевах и насекомых переносчиках // Докл. ТСХА: сб. ст. – Вып. 290. – Ч. III. – М.: РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2018. – С. 37-39.

28. **Сафенкова И.В., Панферов В.Г., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.** Амплификация сигнала в иммунохроматографическом анализе фитопато-

генов // Биотехнология: состояние и перспективы развития: матер. Междунар. форума (23-25 мая 2018 г.). – М. – С. 816-817.

29. **Кондакова О.А., Бутенко К.О., Скурат Е.В., Дрыгин Ю.Ф.** Молекулярная диагностика инфекций Y-вирусом и вирусом скручивания листьев картофеля методом иммунохроматографии // Вестн. Моск. ун-та. – Сер. 16. Биология. – 2016. – № 1. – С. 46-51.

30. **Павловская Н.Е., Солохина И.Ю., Лушников А.В.** Создание тест-систем для идентификации фитопатогенов методом твердофазного иммуоферментного анализа // Биология в сел. хоз-ве. – 2015. – № 4. – С. 7-11.

31. Сравнение фенотипических и молекулярно-генетических методов мониторинга возбудителя фитофтороза картофеля // Е.А. Соколова, М.А. Кузнецова, А.Н. Рогожин и др. // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32. – № 3. – С. 24-27. СЮ1:10.24411/0235-2451-2018-10305.

32. **Садковский В.Т., Соколов Ю.Г., Исмаилов В.Я., Шумилов Ю.В.** Дистанционное обнаружение очагов грибных болезней зерновых культур с помощью беспилотных летательных аппаратов // Эпидемии болезней растений: мониторинг, прогноз, контроль: матер. Междунар. конф. (Большие Вяземы, Московская обл., 13-17 ноября 2017 г.). – Вып. 8. – С. 226-229.

33. **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 государственного аграрного ун-та (г. Новосибирск, 7-11 ноября 2016 г.). – Т. Экономические науки / Новосибирский гос. аграр. ун-т. – Новосибирск: ИЦ «Золотой колос», 2016. – С. 216-220.

34. **Игнатов А.Н., Панычева Ю.С., Ходыкина М.В.** Эпидемиология бактериальных болезней растений // Эпидемии болезней растений: мониторинг, прогноз, контроль: матер. Междунар. конф. (Большие Вяземы, Московская обл., 13-17 ноября 2017 г.). – Вып. 8. – С. 31-44.

35. **Никифоров Е.В., Санин С.С.** Прогнозирование крупномасштабного распространения бурой ржавчины пшеницы // Эпидемии болезней растений: мониторинг, прогноз, контроль: матер. Междунар. конф. (Большие Вяземы, Московская обл., 13-17 ноября 2017 г.). – Вып. 8. – С. 231-237.

36. **Боровский К.В., Санин С.С.** Новый подход к развитию систем поддержки принятия решений по борьбе с эпидемическими заболеваниями пшеницы // Эпидемии болезней растений: мониторинг, прогноз, контроль: матер. Междунар. конф. (Большие Вяземы, Московская обл., 13-17 ноября 2017 г.). – Вып. 8. – С. 359-367.

37. **Гричанов И.Я., Якуткин В.И., Овсянникова Е.И., Саулич М.И.** Карты распространения и зон вредоносности вредителей и болезней картофеля и подсолнечника. – СПб: ВИЗР, 2017. – 63 с. (прил. к журн. «Вестн. защиты растений». – № 21. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://vizr.spb.ru> (дата обращения: 20.06.2018).

38. **Чекмарёв В.В., Зеленева Ю.В., Конькова Э.А., Козачек А.В.** Построение формул прогноза болезней растений на основе граничных значений факторов погоды // *Вопр. современной науки и практики. Ун-т им. В.И. Вернадского.* – 2017. – № 4 (66). – С. 15-22.

39. **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.

40. **Астапчук И.Л.** Мобильный инструмент фитопатолога для количественной экспресс-оценки в условиях поля степени поражения листьев озимого ячменя пятнистостями на основе спектрального АСК-анализа и системы «Эйдос» // *Науч. журн. КубГАУ.* – 2017. – № 131 (07). – 54 с. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://ej.kubagro.ru/2017/07/pdf/31.pdf> (дата обращения: 22.06.2018).

41. **Захаренко В.А.** Особенности развития фитомониторинга в связи с управлением эпифитотиями фитопатогенов в зерновых агроэкосистемах в условиях реформирования аграрного сектора России // *Эпидемии болезней растений: мониторинг, прогноз, контроль: матер. Междунар. конф. (Большие Вяземы, Московская обл., 13-17 ноября 2017 г.).* – Вып. 8. – С. 339-349.

42. **Санин С.С.** Стратегия современной защиты растений при интенсивном зернопроизводстве // *Вестн. ОрелГАУ.* – 3 (66), июнь 2017 г. – С. 35-39. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.15217/48484> (дата обращения: 22.06.2018).

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	3
1. ОСНОВНЫЕ ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ.....	5
2. ДИАГНОСТИКА ПАТОГЕНОВ СЕЛЬСКОХО-	
ЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ.....	8
2.1. Технологии на основе визуального осмотра	8
2.2. Технологии с использованием микроскопирования.....	10
2.3. Технологии с использованием ПЦР.....	15
2.4. Технология с использованием метода гибридизации	
нуклеиновых кислот.....	29
2.5. Технологии с использованием иммунных методов.....	31
2.6. Технология на основе метода диагностики по составу жирных	
кислот.....	42
3. ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ	
ДИАГНОСТИКИ ПАТОГЕНОВ.....	44
Заключение.....	56
Список использованных источников.....	60

**Вячеслав Филиппович Федоренко,
Николай Петрович Мишуров,
Людмила Алексеевна Неменушая**

**ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДИАГНОСТИКИ
ПАТОГЕНОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**

Научный аналитический обзор

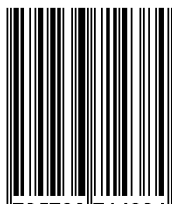
Редактор *В.И. Сидорова*
Обложка художника *П.В. Жукова*
Компьютерная верстка *Г.А. Прокопенковой*
Корректор *Л.Т. Мехрадзе*

fgnu@rosinformagrotech.ru

Подписано в печать 16.08.2018 Формат 60х84/16
Бумага офсетная Гарнитура шрифта "Times New Roman" Печать офсетная
Печ. л. 4,25 Тираж 500 экз. Изд. заказ 102 Тип. заказ 486

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

ISBN 978-5-7367-1438-4



9 785736 714384

ПОДПИСЫВАЙТЕСЬ НА ИНФОРМАЦИОННЫЙ БЮЛЛЕТЕНЬ МИНСЕЛЬХОЗА РОССИИ

Информационный бюллетень Минсельхоза России выпускается ежемесячно тиражом более 4000 экземпляров и распространяется во всех регионах страны, поступает в органы управления АПК субъектов Российской Федерации. В журнале публикуются материалы информационно-аналитического характера о деятельности Министерства по реализации государственной аграрной политики, отражаются приоритеты, цели и направления развития сельского хозяйства и сельских территорий, материалы о мероприятиях, проводимых с участием первых лиц государства по вопросам развития отрасли, освещается ход реализации Госпрограммы на 2013-2020 годы.

Вы прочтете проблемные статьи и интервью с руководителями регионов, ведущими учеными-аграрниками, руководителями сельхозпредприятий и фермерами. Широко представлены новости АПК регионов.

В приложении к Информационному бюллетеню публикуются официальные документы – постановления Правительства России, законодательные и нормативные акты по вопросам АПК, указы Минсельхоза России.

**Подписку можно оформить через редакцию.
Стоимость подписки на 2018 г. с учетом доставки
по Российской Федерации – 4092 руб.
с учетом НДС (10%) за 12 номеров;
341 руб. с учетом НДС (10%) за один номер**

Банковские реквизиты: УФК по Московской области
(Отдел №28 Управления Федерального казначейства по МО)
ИНН 5038001475 / КПП 503801001 ФГБНУ «Росинформагротех»,
л/с 20486Х71280, р/с 4050181054525000104 в ГУ Банка России
по ЦФО, БИК 044525000

**Журнал уже получают тысячи сельхозтоваро-
производителей России и стран СНГ**

В Информационном бюллетене Минсельхоза России Вы можете разместить свои аналитические и рекламные материалы, соответствующие целям и профилю журнала. Подписку и размещение рекламы можно оформить через ФГБНУ «Росинформагротех» с любого месяца и на любой период, перечислив деньги на наш расчетный счет.

Телефоны для справок: 8 (496) 531-19-92,
(495) 993-55-83,
(495) 993-44-04.

Факс 8 (496) 531-64-90

e-mail: market-fgnu@mail.ru, ivanova-fgnu@mail.ru



