Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова

На правах рукописи

Сурина Татьяна Александровна

ФИТОФТОРОЗНЫЕ КОРНЕВЫЕ ГНИЛИ ДРЕВЕСНЫХ И КУСТАРНИКОВЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИАГНОСТИКА

Специальность 03.02.12 – Микология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
С.Н. Еланский

Москва – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ…… 5

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ…… 10

1.1. Видовой состав, распространенность и вредоносность возбудителей рода *Phytophthora* на древесных и кустарниковых растениях…… 10

1.2. Систематическое положение *Phytophthora* …….. 21

1.3. Биологические особенности возбудителей фитофторозных корневых гнилей древесных и кустарниковых растений…….. 22

1.4. Симптомы проявления фитофторозов на древесных и кустарниковых растениях ……..... 26

1.5. Морфология наиболее распространенных и опасных видов рода *Phytophthora* древесных и кустарниковых растениях ……... 31

1.6. Диагностика фитофторозных корневых гнилей древесных и кустарниковых растений ……..…… 39

1.7. Методы борьбы с фитофторозными корневыми гнилями древесных и кустарниковых растений …… 49

1.8. Эффективность фунгицидов в отношении *P. ramorum*…… 59

1.9. Описание использованных в работе фунгицидов……. 61

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ…..... 64

ГЛАВА III. ОБСЛЕДОВАНИЕ НА ВЫЯВЛЕНИЕ ФИТОФТОРОЗНЫХ КОРНЕВЫХ ГНИЛЕЙ ДРЕВЕСНЫХ И КУСТАРНИКОВЫХ РАСТЕНИЙ В ПИТОМНИКАХ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАСАЖДЕНИЯХ …… 75

3.1. Видовой состав грибов и грибоподобных организмов выявленных в питомниках ……. 75

3.2. Видовой состав грибов и грибоподобных организмов выявленных в естественных насаждениях…… 81

ГЛАВА IV. РАЗРАБОТКА И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ФИТОФТОРОЗОВ ДРЕВЕСНЫХ И КУСТАРНИКОВЫХ РАСТЕНИЙ……... 91
4.1. Изучение морфологических характеристик *P. ramorum, P. cactorum, P. cinnamomi, P. cryptogea, P. syringa.* на различных питательных средах……... 91
4.2. Оптимизация методов выделения ДНК из зараженной растительной ткани…… 97
4.3. Комбинирование методов биоприманок и ПЦР для диагностики видов рода *Phytophthora* ……... 102
4.4. Достоверность идентификации *P. ramorum* при использовании ранее разработанных методов классической ПЦР и ПЦР «в реальном времени» ……... 106
4.5. Разработка диагностики *P. ramorum* и близких видов с использованием ПЦР «в реальном времени»……. 110
4.5.1. Подбор праймеров и зондов……... 112
4.5.2. Оптимизация ПЦР «в реальном времени»……..... 117
4.5.3. Определение ПЦР «в реальном времени» пи диагностики *P. ramorum* и близких видов …… 120
ГЛАВА V. ПОИСК ЭФФЕКТИВНЫХ МЕР ДЛЯ БОРЬБЫ С *PHYTOPHTHORA RAMORUM*……. 123
5.1. Определение биологической эффективности фунгицидов на питательной среде…….. 123
5.2. Определение биологической эффективности фунгицидов на листьях…… 128
ЗАКЛЮЧЕНИЕ……. 135
ВЫВОДЫ …….. 136
НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ…….. 138
БЛАГОДАРНОСТИ……... 138

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ... 139
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ……. 141
ПРИЛОЖЕНИЕ…….. 159

ВВЕДЕНИЕ

Оомицеты рода *Phytophthora* поражают широкий круг древесных и кустарниковых растений, обладают высокой вредоносностью, пластичностью и хорошо приспосабливаются к новым климатическим условиям. В связи с этим особо опасные виды были включены в Список Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР), сигнальную систему NAPPO, а также предложены для включения в проект Единого перечня карантинных объектов Таможенного союза. В список А2 ограниченно распространенных на территории ЕС видов входят *Phytophthora kernoviae* Brasier, Beales & S.A. Kirk, *P. lateralis* Tucker & Milbraith и *P. ramorum* Werres, De Cock & Man in 't Veld. В проект Единого перечня карантинных объектов Таможенного союза были предложены *P. kernoviae, P. lateralis* и *P. alni* Brasier & Kirk. На данный момент описано более 100 видов рода *Phytophthora* и около 40 из них способны повреждать древесные и кустарниковые растения и приносить значительный экономический ущерб.

Идентификация фитофторозов по симптомам на пораженных растениях затруднена, т.к. сходные симптомы могут наблюдаться и при развитии других грибных патогенов. В то же время правильная идентификация крайне важна для составления плана защитных мероприятий: многие препараты против настоящих грибов не действуют на оомицеты, и наоборот.

Традиционно идентификация возбудителей фитофторозов древесных растений проводится на питательной среде после выделения оомицета в чистую культуру. Выделение оомицетов рода *Phytophthora* в чистую культуру довольно сложное занятие, требующее, как правило, использования биоприманок. Определение по морфолого-культуральным признакам занимает длительное время и требует хороших знаний биологии и морфологии видов рода *Phytophthora*. При определении важно учитывать

высокую вариабельность признаков этого рода. В последние годы появились данные о низкой эффективности и недостаточной достоверности методов диагностики оомицетов по морфолого-культуральным признакам.

За рубежом для экспресс диагностики фитофторозов в пораженных тканях, почвенных и водных образцах широко используют тест-наборы на основе иммуноферментного анализа. Мы протестировали некоторые импортные коммерчески доступные наборы на имеющейся в нашем распоряжении коллекции изолятов рода *Phytophthora*. Тестирование показало, что некоторые наборы не могли различать отдельные виды грибов и давали перекрестные реакции. Из литературных источников известно, что чувствительность обнаружения меняется в зависимости от фазы развития оомицета и различные структуры (мицелий, спорангии, ооспоры) могут иметь различные количества обнаруживаемых антигенов. Интенсивность реакции может быть различна у разных видов, а также между штаммами одного и того же вида (Lane et al., 2007).

Появление и внедрение в фитопатологию молекулярных методов, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР), существенно расширило возможности изучения возбудителей болезней, усовершенствовало диагностику и привело к возникновению новых методов исследования. Преимуществами ПЦР-диагностики являются быстрота проведения исследований, небольшое количество исследуемого материала, необходимого для выявления возбудителя, возможность выявления латентной инфекции. Мультиплексная ПЦР «в реальном времени» с использованием зондов, меченных различными флуоресцентными красителями, позволяет в одной пробирке одновременно детектировать два и более возбудителя заболеваний, что сокращает затрачиваемое время и реагенты.

Несмотря на насущную необходимость развития экспресс-диагностики возбудителей фитофторозов, в России в настоящий момент нет тест-систем, протестированных на российских штаммах из разных

регионов. В нашей работе мы провели оценку и сравнительный анализ тест-систем (в том числе мультиплексных), разработанных за рубежом, а также созданных в нашей лаборатории, на штаммах из собственной коллекции изолятов *Phytophthora* sp.

В борьбе с развитием болезней растений важной задачей является поиск эффективных фунгицидных препаратов. Как уже было сказано, фунгициды против грибов не всегда эффективны против оомицетов рода *Phytophthora*. С другой стороны, разные виды *Phytophthora* имеют разную восприимчивость к фунгицидам, используемым и против оомицетов. У зарегистрированных в России препаратов, как правило, изучали эффективность по отношению к *P. infestans* – возбудителю опасного заболевания картофеля и томата. Мы проверили фунгицидное действие ряда препаратов против *P. ramorum*, возбудителя тяжелого заболевания древесных растений, на питательной среде и на листьях восприимчивых растений.

Цель и задачи исследований

Целью проводимых исследований являлось уточнение видового состава оомицетов рода *Phytophthora* на древесных и кустарниковых растениях, разработка и испытание систем их диагностики на основе ПЦР, а также изучение эффективности используемых против них химических фунгицидных препаратов.

Для достижения цели предстояло решить следующие задачи:

1. Изучить видовой состав фитопатогенных оомицетов рода *Phytophthora* на древесных и кустарниковых растениях в питомниках и естественных насаждениях.
2. Разработать и оптимизировать тест-системы и протоколы пробоподготовки и проведения ПЦР (обычного и «в реальном времени») для идентификации возбудителей фитофторозов древесных растений.

3. Разработать методы диагностики фитофторозов в воде с помощью комбинации метода биоприманок и ПЦР.

4. Определить наиболее эффективные препараты для борьбы с фитофторозами древесных растений.

Научная новизна исследований

Научная новизна работы состоит в том, что впервые за 20 лет были проведены обследования естественных насаждений на наличие фитофторозных корневых гнилей древесных растений. Впервые были обследованы питомники и ряд водоемов. Для выявления видов рода *Phytophthora* в воде был применен метод биоприманок, который ранее на территории России не применялся. Применение этого метода позволило выявить 4 вида *Phytophthora* и *Phytopythium litorale*. О выявлении двух из этих видов в России ранее сообщений не было.

Впервые были протестированы российские наборы реактивов для выделения ДНК. Была оценена их эффективность при выделении ДНК из заражённой растительной ткани.

Была проверена специфичность зарубежных тест систем для диагностики опасного патогена древесных растений *P. ramorum*, некоторые из которых показали ложноположительные результаты. На основании секвенированных последовательностей участков генома изолятов из коллекции ВНИИКР, а также депонированных в GenBank, были разработаны собственные высокоспецифичные и чувствительные праймеры и зонды для ПЦР-идентификации данного патогена. Их использование в диагностике показало хорошие результаты.

Впервые было изучено влияние на *P. ramorum* некоторых фунгицидов, зарегистрированных в России для борьбы с возбудителем фитофтороза картофеля и томата.

Практическая значимость работы

Разработанные тест-системы показали высокую специфичность и чувствительность и могут применяться для выявления и идентификации *P. ramorum* в пораженном растительном материале. Метод диагностики возбудителей фитофторозов в воде с помощью биоприманок перспективен для применения при обследовании водоемов.

Результаты изучения эффективности фунгицидов в отношении *P. ramorum* могут быть использованы при разработке защитных мероприятий с этим патогеном.

Апробация работы и публикации

Материалы диссертации были представлены на 3-м Съезде микологов России, (Москва, 10 – 12 октября, 2012 г.); 6-й встрече IUFRO «*Phytophthora* в лесах и природных экосистемах», (Кордова (Испания), 9 – 14 сентября 2012 г.); 10-м Международном конгрессе по фитопатологии (Пекин (КНР) 25 – 30 августа 2013 г.).

По результатам диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 3 статьи в российских рецензируемых журналах, входящих в список ВАК РФ, 2 статьи в иностранных изданиях.

Личный вклад автора заключается в проведении экспериментальных исследований, результаты которых получены исключительно самим автором или при его непосредственном участии. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов, списка литературы и четырех приложений. Материал изложен на 163 страницах машинописного текста,

содержит 34 таблицы и 26 рисунков. Список литературы включает 155 источников, в том числе146 иностранных авторов.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Видовой состав, распространенность и вредоносность оомицетов рода *Phytophthora* на древесных и кустарниковых растениях.

Несмотря на то, что по своему устройству *Phytophthora* сходен с грибами, он не состоит в родстве с настоящими грибами и относится к страменопилам. Примерно 70% выявляемых возбудителей фитофторозных корневых гнилей древесных и кустарниковых растений в мире приходится на *P. ramorum,* который вызывает чрезвычайно опасное заболевание у целого ряда древесных растений и привел к стремительному вымиранию дубов в Калифорнии и Орегоне (Rizzo et al., 2005). Распространение *P. ramorum* благодаря европейской торговле и инвазии искусственных ландшафтных посадок и лесов представляет собой серьезную угрозу целостности экосистем с преобладанием дубов и/или деревьев и кустарников рода *Rhododendron*, особенно во влажном океаническом климате Западной Европы. Широкий географический ареал этого патогена, однако, не позволяет предсказать, какие растения могут стать жертвой инфекции в будущем.

P. ramorum впервые был обнаружен в штате Калифорния (США) на камнеплоднике густоцветковом (*Lithocarpus densiflorus*) в 1994 году, чуть позднее – на прибрежном виргинском дубе (*Quercus agrifolia*) и каменном дубе (*Q. kellogii*), где заболевание получило название «скоротечной или внезапной гибели дуба» (ВГД). Вредный организм быстро распространился по лесным массивам калифорнийского побережья, перемещаясь в отдельных случаях со скоростью до нескольких километров за сезон, и даже вышел за границы штата Калифорния.

Инвазия *P. ramorum* в США привела к значительным экономическим потерям, связанным с гибелью и дальнейшим уничтожением пораженных

ценных древесных, кустарниковых пород, декоративных растений, посадочного материала, и в связи с этим, с ограничением внешней и внутренней торговли. В период 2005-2007 годов на Национальную программу по выявлению и борьбе с *P. ramorum*, включающей и научные исследования, из Федерального бюджета США ежегодно выделялось по 20 миллионов долларов (Risk Analysis of *Phytophthora ramorum*, 2009).

В Европе возбудитель заболевания был выделен впервые из образцов пораженных растений рододендрона (*Rhododendron*), а местами и калины (*Viburnum*), собранных в 1994 г. в питомниках Нидерландов и Германии. В 2001 году возбудитель болезни был идентифицирован и, наконец, получил научное название *P. ramorum* (Werres et al., 2001). В этом же году, информация о вредном организме появилась в ЕОКЗР, которая представляла собой краткий анализ фитосанитарного риска (АФР) *P. ramorum* с предложением о включении (дополнении) этого организма в Сигнальный список карантинного перечня этой организации. В следующем году патоген был включен в сигнальный список Северо-Американской организации по защите растений. В 2009 он получил статус карантинного организма в Израиле. Учитывая динамику фитофтороза и высокую степень его вредоносности в Северной Америке, во всех странах членах ЕС проводятся обследования насаждений рододендронов, калины и других видов декоративных растений на выявление этого вредного организма. Этим же решением всем странам Сообщества с ноября 2002 года вменяется в обязанность проведения мероприятий по предупреждению проникновения и распространения *P. ramorum* по его территории.

Тем не менее, с 2001 года сигналы о появлении заболевания поступают то из одной, то из другой страны (таблица 1). На протяжении некоторого времени круг растений-хозяев гриба в странах Европы ограничивался, главным образом, видами рододендрона и калины. Выявление болезни в этот период происходит чаще всего в питомниках на посадочном материале,

ввезенном из-за рубежа, нередко из Нидерландов, Германии, стран ЕС (Александров, 2007).

Таблица 1

Случаи обнаружения *P. ramorum* в странах Европы (EPPO Reporting Service, 2006-2011)

Страна	Первый случай выявления в стране		Откуда поступил растения
	Год	Растение-хозяин	
Нидерланды	1993	*Rhododendron sp., Viburnum sp.*	Нет информации
Германия	1994	*Rhododendron sp., Viburnum sp.*	Нет информации
Польша	2001	*Rhododendron*	Из Германии
Испания (о. Майорка)	2002	*Rhododendron, Camellia japonica, Viburnum tinus*	Из стран ЕС
Франция	2002	*Rhododendron, Viburnum*	Нет информации
Италия	2002	*Rhododendron Jakushimanum*	Нет информации
Бельгия	2002	*R. jakusimanum, Viburnum x bodnantense*	Из Нидерландов
Дания	2002	*Rhododendron sp., Viburnum sp.*	Из Нидерландов и Германии
Норвегия	2002	*Rhododendron catawbiense*	Из европейских стран
Швеция	2002	*Rhododendron sp., Viburnum sp.*	Из Германии и Нидерландов
Ирландия	2002	*Rhododendron sp., Viburnum sp.*	Нет информации
Великобритания	2002	*Rhododendron sp., Viburnum sp.*	Нет информации
Республика Чехия	2003	*Viburnum bodnantense*	На импортированном материале
Словения	2003	*Rhododendron catawbiense, Viburnum farreri, V.x bodnantense*	Нет информации
Швейцария	2004	*Viburnum sp.*	Нет информации
Финляндия	2004	*Rhododendron*	Из стран ЕС
Португалия	2006	*Viburnum spp.*	Нет информации
Хорватия	2007	*Rhododendron*	Из Нидерландов
Литва	2007	*Rhododendron catawbiense*	2 лота из Польши
Сербия	2008	*Rhododendron*	Нет информации
Греция	2010	*Rhododendron*	Из Бельгии

Признаки поражения растений *P. ramorum* обнаруживают также в садах (общественных и частных), реже у оптовиков. В 2002-2003 годах появляются сообщения о выявлении новых растений-хозяев патогена. Вначале в Нидерландах уточняется список поражаемых растений с добавлением видов калины (*Viburnum x bodnantense, V. farreri, V. falcatum*) и рододендрона (*Rhododendron catawbiense, R. ponticum*). Затем выявляется

целый букет новых растений-хозяев *P. ramorum* в Великобритании: *Camellia japonica* (камелия японская), *Kalmia latifolia* (калмия широколистная), *Pieris formosa* (пиерис красивый), *Pieris japonica* (пиерис японский), *Syringa* (сирень), *Arbutus* (земляничное дерево). Помимо этого здесь зарегистрированы также случаи выявления возбудителя на *Hamamelis virginiana* (хамамелис виргинский) и *Taxus baccata* (тис ягодный).

В 2004 году в Англии обнаружено несколько деревьев с признаками поражения *P. ramorum*, причем на дубе каменном (*Quercus ilex*) и каштане посевном (*Castanea sativa*) симптомы проявились только на листьях, в то время как на стволах дуба турецкого (*Q. cerris*), бука лесного (*Fagus sylvatica*) и каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum*) наблюдались сочащиеся язвы, подобные тем, которые развивались на дубах в США. В Европе также отмечены случаи поражения отдельных деревьев американских видов дубов: южного красного или испанского (*Q. falcata*) в Великобритании и северного красного (*Q. rubra*) в Нидерландах. В этом же году в питомниках Польши выявлен и идентифицирован патоген на *Pieris japonica, Calluna vulgaris* (вереск обыкновенный) и *Photinia* sp. (фотиния), а в Германии впервые на *P. ramorum* (дуб черешчатый), он обнаружен за пределами культурных насаждений (питомники, сады, парки) и на пиерисе японском (EPPO Reporting Service, 2006-2011).

В 2009 году в Великобритании *P. ramorum* вновь был выявлен в лесных массивах, при этом впервые в Европе на хвойных породах – лиственнице японской (*Larix kaempferi*) и тсуге западной (*Tsuga heterophylla*). Год спустя на стволах лиственницы японской наблюдают образование язв и даже гибель деревьев, а в других лесистых местах отмечали поражение лиственницы европейской или опадающей (*Larix decidua*). Случаи поражения отдельных растений родов *Rhododendron, Viburnum, Pieris, Kalmia, Michelia, Magnolia* зафиксированы в Ирландии; помимо этого, *P. ramorum* обнаружен в этой стране на лиственнице японской, дубе Убаме (*Q.*

phillyroeoides) и ели ситхинской (*Picea sitchensis*) (EPPO Reporting Service, 2006-2011).

Таким образом, с момента своего обнаружения возбудитель болезни значительно расширил спектр поражаемых растений, включая широко распространенные в Европе декоративные виды (рододендрон, калина и другие), древесные (различные виды дуба, бук, тис и другие) и даже хвойные породы (лиственница, тсуга, ель ситхинская). Расширение ареала *P. ramorum* привело к тому, что он приблизился к границам Российской Федерации, проникнув в Польшу, Финляндию и Литву. Вторым тревожным для России обстоятельством является факт многочисленных случаев выявления фитофтороза в питомниках стран Европы, откуда регулярно ввозится большое количество посадочного материала в нашу страну. Проведенный в ФГБУ «ВНИИКР» анализ фитосанитарного риска возбудителя показал возможность его проникновения и акклиматизации в отдельных регионах Российской Федерации. Придание *P. ramorum* статуса карантинного вредителя ставит перед нами задачу проведения его постоянного мониторинга на территории России.

Другим видом *Phytophthora*, поражающим надземную часть деревьев-хозяев, является *P. kernoviae*. Он был обнаружен на буковых деревьях с повреждениями ствола и усыханием в Корнуолле, на юго-западе Соединенного Королевства в ходе отбора проб на *P. ramorum* (Brasier et al., 2005). Впоследствии было доказано, что собранные ранее образцы культур, включавшие не полностью описанные *Phytophthora*, выделенные в коренных лесах Новой Зеландии, представляют собой *P. kernoviae* (Ramsfield et al., 2007); поскольку *P. kernoviae* не наносит коренным лесам Новой Зеландии значительного вреда, весьма вероятно, что для них этот патоген является аборигенным.

В Великобритании *P. kernoviae* была в основном найдена на рододендроне в лесных массивах на юго-западе Англии и на нескольких участках на севере Англии, Уэльсе и Шотландии. В период с 2002 по 2008

годы было 66 вспышек заболевания в лесных массивах и 5 вспышек в питомниках в Англии и Уэльсе (Walters et al., 2010). Патоген производит обильное спороношение на листьях, зооспорангии могут распространяться ветром на большие расстояния, а также образует ооспоры в корнях рододендрона и черники, что также служит источником инфекции (Fichtner et al., 2011). Такие виды, как брусника и толокнянка обыкновенная, при искусственном заражении показали высокую чувствительность к патогену, поэтому такие ценные ботанические ресурсы могут оказаться под угрозой исчезновения в Великобритании (Beales et al., 2009). В дополнение к вышеупомянутым растениям хозяевам *P. kernoviae* была выделена со следующих кустарников и травянистых растений: *Hedera helix, Lomatia myricoides, 16* видов *Magnolia spp., Pieris japonica, Vaccinium myrtillus, Drimys winterii, Gevuina avellana, Magnolia doltsopa, Ilex aquifolium, Podocarpus salignan, Prunus laurocerasus* (Таблица 2). Кроме этого, при искусственном заражении было определено еще 45 видов восприимчивых растений; таким образом, список растений хозяев для *P. kernoviae* будет расширяться.

Таблица 2.

Растения хозяева *P. kernoviae* и регион их выявления (http://forestphytophthoras.org/).

Латинское название растения	Общепринятое название растения	Симптомы	Место распространения	Регион
Annona cherimola	Черимойя	Отмирание, гнили плодов	Сельскохозяйственные земли	Новая Зеландия
Drimys winterii	Дримис Винтера	Отмирание, листовые некрозы	Сады	Англия
Fagus sylvatica	Бук европейский	Язвы	Леса, парки, сады	Англия – Корнуолл, Уэльс
Gevuina avellana	Авелланский орех	Отмирание, листовые некрозы	Сады	Англия
Hedera helix	Плющ обыкновенный	Отмирание, листовые	Сады	Англия

		некрозы		
Растение не известно	Вода, почва	Вода, почва	Леса, насаждения	Новая Зеландия
Ilex aquifolium	Падуб остролистный	Отмирание, листовые некрозы	Сады	Англия
Liriodendron tulipifera	Лириодендрон тюльпановый	Отмирание, листовые некрозы	Сады	Англия
Magnolia spp.	Магнолия	Отмирание, листовые некрозы	Сады	Англия
Michelia doltsopa	Sweet Michelia	Отмирание, листовые некрозы	Сады	Англия
Pieris formosa	Пиерис красивый	Отмирание, листовые некрозы	Сады	Англия
Prunus laurocerasus	Лавровишня	Отмирание, листовые некрозы	Сады	Англия
Quercus ilex	Дуб каменный	Отмирание, листовые некрозы	Сады	Англия
Quercus robur	Дуб черешчатый	Отмирание, листовые некрозы	Сады	Англия
Rhododendron ponticum	Рододендрон понтийский	Гнили, увядание, отмирание листьев	Сады, парки, леса	Англия - Корнуолл, Уэльс, Шотландия
Vaccinium myrtillus	Черника	Отмирание, листовые некрозы	Леса	Англия - Корнуолл, Шотландия

Phytophthora cinnamomi Rands является одним из наиболее разрушительных из известных патогенов и может поражать более 950 видов растений. Возможно, это самый широко распространенный инвазивный организм (Hardham, 2005). Потенциал инвазий и разрушительных экологических последствий иллюстрирует стремительное усыхание эвкалиптов в лесах Западной Австралии и Виктории, Австралия. Этот патоген в Австралии рассматривается в качестве основной угрозы экологическим сообществам в соответствии с Законом об охране окружающей среды. *P. cinnamomi* широко распространена в Европе

(Германия, Бельгия, Англия, Голландия, Португалия, Испания, Италия), а также в Северной Америке (Канада, США), Мексике, Африке, Австралии, Новой Зеландии. На сопредельных с Россией территориях *Phytophthora* обнаружена в Грузии, Армении, Украине и Казахстане. В Европу оомицет *P. cinnamomi* впервые был завезен в 18 веке и был причиной чернильной болезни каштанов (Crandall, 1950). Патоген часто можно встретить в каштановых лесах, иногда вместе с *Phytophthora cambivora* (Petri) Buisman и в вечнозеленых дубовых лесах на юге Пиренейского полуострова. Кроме того, он распространяется по средиземноморскому региону, где широко представлены *Quercus ilex* и *Q. phellos* (Camilo-Alves et al., 2013).

P. cinnamomi крайне вредоносный вид. Сильно пораженные деревья характеризуются редкой бледно окрашенной листвой и усыханием отдельных ветвей. Гниль, окольцовывающая дерево, ведет к полному его усыханию. Процесс усыхания протекает довольно медленно. Болезнь начинается обычно с корневой шейки, откуда гриб распространяется вверх по штамбу и вниз – в корни (Жуков и др., 2013). Патоген распространяется через корневые срастания и с движением почвы и воды. Человеческая деятельность, связанная с передвижением почвы, строительство дорог, посадка зараженных растений способствуют распространению патогена.

Заболевание, вызываемое *P. cinnamomi*, обнаружено в Северо-Кавказском горном районе (Краснодарский край). Известно, что ареал каштана съедобного на Кавказе катастрофически сокращается. Одной из многих причин этого феномена является почвообитающий оомицет *P. cinnamomi*, вызывающий корневую гниль, чернильную болезнь и, как следствие, суховершинность деревьев и их окончательное усыхание (Веденяпина, 1985).

Фитофтороз, или гниль надземных частей сеянцев, вызываемая *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J.Schröter, впервые была описана как патоген кактусов *Peronospora cactorum* в 1870 году. Оомицет поражает более 250 видов растений, в том числе древесные породы из родов *Abies, Acacia,*

Acer, Cedrus, Fagus, Larix, Picea, Pinus, Robinia.

P. cactorum обнаружена в странах Европы повсеместно, кроме того, найдена в Иране, Индии, Китае, Корее, Японии, Северной Америке (Канада, США), Южной Америке, Австралии, Африке, Новой Зеландии. В Российской Федерации патоген обнаружен в Южно-таежном районе; Лесостепном районе европейской части Российской Федерации (Воронежская, Саратовская, Курская области); Северо-Кавказском горном районе (Краснодарский край); Приамурско-Приморском хвойно-широколиственном районе (Приморский край).

В большинстве случаев *P. cactorum* вызывает воротниковые корневые гнили или выпревание сеянцев в питомниках, но может и приводить к летальным корневым гнилям и язвам, особенно на пихте и клене. Особую озабоченность и внимание заслуживают частые сообщения о сочащихся стволовых язвах на лиственных растениях во всем мире. Вспышки заболеваний, вызванных *P. cactorum,* появляются не постоянно. Последний случай был в Чехии в 2009 году на буке, березе и тополе, но далее заболевание не развивалось.

P. lateralis появилась в Орегоне в начале второй половины XX века, возможно, будучи завезенной с инфицированными материалами из Тайваня (Brasier et al., 2010), и полностью изменила облик лесов северо-западной части тихоокеанского побережья, в которых преобладал *Chamaecyparis lawsoniana*. Произошло массовое вымирание кипарисовика Лавсона (Hansen et al., 2000); в 1990-х годах этот патоген был обнаружен во Франции (Hansen и Delatour, 1999), а в 2010 году – в Великобритании (Green et al., 2012). В Европе на этот патоген объявлен карантин.

Поведение *P. lateralis* в Орегоне и Калифорнии явно дает понять, что патоген является инвазивным. Инфекция перемещается с водой, почвой транспортными средствами, человеком и животными. С водой по дренажным система и водостокам оомицет перемещается на большие расстояния и поражает доступные растения (Hansen et al., 2000, Jules et al.,

2002). В Европе *P. lateralis* зарегистрирована в нескольких странах и убивает растения в лесозащитных полосах. Кипарисовик (*Chamaecyparis lawsoniana*) особенно чувствителен к патогену. Тихоокеанский тис (*Taxus brevifolia*) также может поражаться, если растет вблизи больных растений кипарисовика, хотя болезнь протекает медленнее (DeNitto и Kleijunas, 1991, Murray и Hansen, 1997).

К другим *Phytophthora*, поражающим европейские лесные деревья, относятся *P. cambivora*, агрессивный и широко распространенный патоген, поражающий широкий спектр древесных растений, в частности, дубов (Jung et al., 2000), *P. quercina* T.Jung, представляющий собой основной фактор вымирания дубов (Jung et al., 1999), *P. citricola, P. cactotum*.

Чернильная болезнь каштанов (*Castanea sativa*) в Греции была связана с *P. cambivora* (Vettraino et al., 2005). В ноябре 2006 года около 10% деревьев пяти–семи лет из сада в округе Лариса, Центральная Греция, проявляли симптомы заболевания. В отобранных образцах вегетативных частей растений и почвы была обнаружена *Phytophthora cryptogea* Pethybridge & Lafferty, определенная по культурально-морфологическим признакам. *P. cryptogea* вызывала чернильную болезнь каштана в Греции; ранее патоген был зарегистрирован на миндале, ромашке, баклажане, огурце, люпине, люцерне.

P. cinnamomi присутствует в Европе с 1700-х годов. Это также вызвало увядание и отмирание каштанов в течение 19 и 20 веков. *P. cinnamomi* и *P. cambivora* сейчас присутствует во всей Европе, а с 1990-х годов, наблюдается возрождение болезни, часто с высокой смертностью, в частности, в Португалии, Италии и Франции (Vettraino et al., 2005).

P. cinnamomi и *P. cambivora* распределяются из Греции в Великобританию. В настоящее время наибольшее влияние болезнь оказывает на юго-западе, юге и теплых регионах Центральной Европы. Оба этих вида *Phytophthora* могут иметь большой спектр видов хозяев (Vannini и Vettraino 2001; Werres et al., 2001).

Несколько других видов *Phytophthora*, в том числе *P. citricola, P. cactorum*, *P. cryptogea* и *Phytophthora gonapodyides* (Petersen) Buisman, также могут привести к чернильной болезни каштана (Vettraino et al., 2005), но их влияние значительно ниже, чем у *P. cambivora* или *P. cinnamomi*.

В исследовании, проведенном в Европе в пяти странах, были обнаружены семь видов фитофтор, об обнаружении на каштанах трех из которых, *Phytophthora megasperma* Drechsler*, P. cryptogea* и *Phytophthora syringae* (Klebahn) Klebahn, ранее не сообщилось. *P. cinnamomi P. cambivora* и *P. citricola* были наиболее часто выявляемыми видами.

Смерть деревьев каштана съедобного в регионе Черного моря Турции, в основном, была связана с грибом из рода *Cryphonectria*, но исследование показало, что *Phytophthora* sp. также участвуют в этом процессе (Akilli et al., 2012). Три вида *Phytophthora (P. cinnamomi*, *P. cambivora* и *P. plurivora)* были найдены в шести лесных местностях с отмиранием каштана, причем. наиболее распространенным видом была *P. cinnamomi*.

В восточной Австрии в насаждениях дуба были выделены пять видов *Phytophthora*: *P. quercina, P. citricola, P. syringae, P. europaea* E.M. Hansen & T. Jung и *P. gonapodyides*. *P. quercina* была выделена из влажных, умеренно влажных и умеренно сухих участков, а также из мест с периодическими колебаниями грунтовых вод и в одном случае из сухого участка. *P. citricola* выделялась из всех участков, кроме самых сухих. *P. gonapodyides* и *P. syringae* наблюдались исключительно во влажных и умеренно влажных участках. *P. europaea* была выделена только один раз из умеренно влажной почвы вместе с *P. citricola* и *P. gonapodyides* (Balci, 2003).

Виды *Phytophthora* были обычно связаны с корневыми или стволовыми гнилями древесных растений. Тем не менее, в лесах умеренного пояса их способность инфицировать листву древесных хозяев неизвестна. До недавнего времени были данные о листовых инфекциях только по нескольким видам *Phytophthora*, таким как, *P. citricola, P. citrophthora* (R.E.Smith & E.H.Smith) Leonian*, P. cactorum* или *P. ilicis* Buddenhagen &

Young, которые могут вызвать некрозы листьев и молодых побегов. Обследования декоративных растений, а также лесных деревьев, показали, что целый ряд других видов *Phytophthora,* кроме *P. ramorum,* способны вызывать некрозы листьев и веток. К ним относятся *P. nemorosa* Hansen & Reeser, *P. pseudosyringae* T.Jung & Delatour, *P. foliarum* Donahoo & Lamour, *P. kernoviae* (Hansen et al., 2003; Brasier et al., 2005). В дополнение к *P. ramorum*, были найдены 13 видов фитофтор, связанных с листовыми болезнями декоративных растений в Калифорнии. *P. citricola и P. syringae* были наиболее часто встречающимися (Yakabe et.al., 2009). *Phytophthora hibernalis* Carne и *Phytophthora hedraiandra* de Cock & Man in 't Veld вызывали пятнистости листьев и увядание молодых побегов растений рододендрона и калины, соответственно (Lvarez et. al., 2007; Moralejo et. al., 2007).

1.2. Систематическое положение *Phytophthora.*

Phytophthora это род микроорганизмов, относящихся к царству Страменопилы, которое также включает и охрофитовые водоросли. Виды *Phytophthora* напоминают истинные грибы потому, что они растут с помощью гиф и образуют споры. В отличие от истинных грибов их клеточные стенки содержат целлюлозу вместо хитина, мицелий без перегородок и в течение жизненного цикла доминирует диплоидная фаза. Другой чертой фитофтор, отличающей их от грибов, является то, что они образуют плавающие зооспоры в одной из фаз жизненного цикла.

Род *Phytophthora* в настоящее время относится к царству *Stramenopila*, подтипу *Heterokonta*, субтипу *Peronosporomycotina*, классу *Peronosporomycetes* (*Oomycetes*), подклассу *Peronosporomycetidae*, порядку *Pythiales* и семейству *Pythiaceae*. Систематика фитофтор претерпела ряд изменений в процессе изучения; от эпохи шести морфологических групп (Stamps et al., 1990) до эпохи филогенетических ветвей (Cooke et al., 2000) а

теперь перешла в новую эру интегрирования морфологического и филогенетического подходов (Ristaino, 2012).

Проверка новых таксонов *Phytophthora* в последние годы осуществлялась с помощью анализа последовательностей области внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) гена рибосомной ДНК, фактора элонгации трансляции 1-α, β-тубулина и митохондриальной кодируемой цитохромоксидазы (coxI и cox II) (Cooke et al., 2000; Kroon et al., 2004; Martin и Tooley, 2003). Мультилокусная филогения, построенная для 82 видов с 7 молекулярными маркерами, подтвердила наличие 10 хорошо поддерживаемых клад для рода *Phytophthora* (Cooke et al., 2000). До 2010 года были признаны 108 видов *Phytophthora*, в последнее время были описаны многие новые виды (Grünwald et al., 2011a; Nelson и Abad, 2010) (рис. 1).

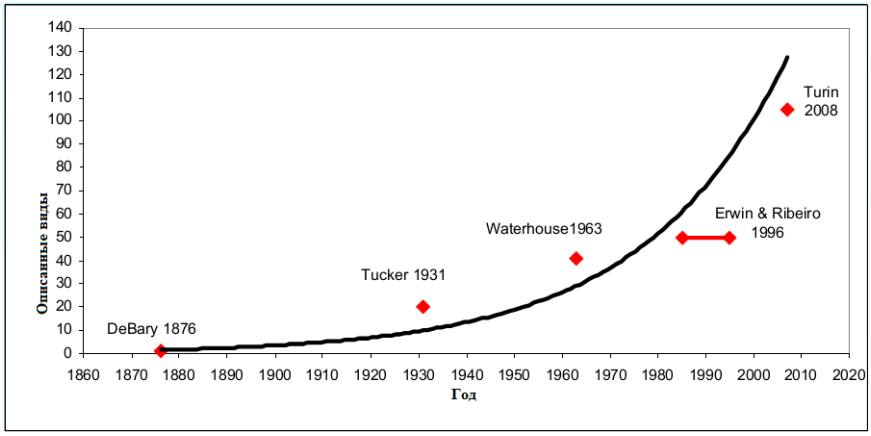


Рисунок 1. Увеличение числа описанных видов *Phytophthora* с течением времени (Brasier, 2008).

1.3. Биологические особенности возбудителей фитофторозных корневых гнилей древесных и кустарниковых растений.

Phytophthora – паразиты высших растений, способные к сапротрофному образу жизни. В процессе онтогенеза они могут проявлять патогенные свойства по отношению к многочисленным растениям – травам, кустарникам, деревьям, вызывая такие болезни, как увядание, усыхание,

гниль. Место их обитания – почва, подземные и надземные органы растений. Жизненный цикл фитофторы может протекать в бесполой стадии развития (мицелий, спорангии, хламидоспоры) или может включать половую стадию (оогонии, антеридии, ооспоры) (рисунок 2).

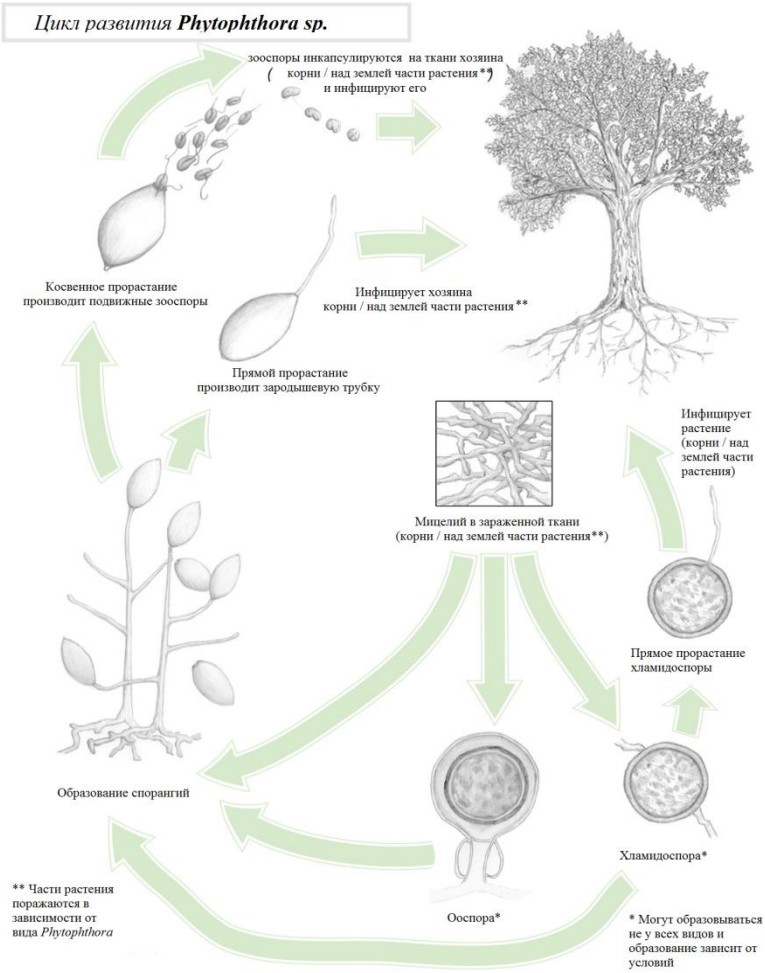


Рисунок 2. Цикл развития *Phytophthora* sp. (http://www.aphis.usda.gov/ (USDA APHIS PPQ)).

Мицелий у фитофторы несептированный, за исключением клеточных перегородок в старых культурах или отделяющих определенные морфологические структуры (хламидоспоры, ооспоры, оогонии, антеридии, гаустории), либо поврежденные органы. Диаметр гиф изменчив, зависит от состава среды, отличается у погруженного, воздушного, поверхностного мицелиев или мицелия внутри клеток растения-хозяина, обычно 5–8 мкм в диаметре. Эндогенный мицелий с гаусториями нитевидной, пальцевидной,

булавовидной и округлой формы, внедряющимися по одному или одновременно по несколько в клетки питающих растений. Бесполое размножение зооспорангиями (конидиями). Спорангиеносцы обособленные, простые и симподиально разветвленные, выступающие одиночно или пучками из устьиц или непосредственно через кутикулу на поверхность субстрата. Попав во влажную среду конидии дают мицелиальный росток, либо их содержимое распадается на зооспоры. Зооспорангии образуются в течение весны и лета; они осуществляют массовые повторные заражения. Заражение здоровых растений может происходить и посредством мицелия гриба, находящегося в почве. Осенью внутри зараженных тканей образуются ооспоры, которые с отмершими частями сеянцев попадают в почву, где способны сохраняться в течение нескольких лет. При благоприятных условиях ооспоры прорастают и заражают сеянцы. Распространению и сильному поражению сеянцев способствуют сырая погода и густое размещение сеянцев.

Ооспоры возникают в результате слияния оогония и антеридия. Они представляют собой толстостенные шаровидные структуры, которые способствуют выживанию организма при неблагоприятных условиях. Некоторые виды *Phytophthora* гомоталличные, у них ооспоры образуются на мицелии одного типа спаривания. Другие виды гетероталличные - у них присутствует мицелий двух типов спаривания A1 и A2 и ооспоры образуются при контакте гиф разных типов.

Хламидоспоры (другой тип толстостенных спор) также способны выживать при неблагоприятных условиях, но они как вегетативные структуры на мицелии. Во влажных условиях хламидоспоры прорастают и образуют зооспорангии.

Прибрежное распределение болезни, вызываемой *P. ramorum* (Rizzo et al., 2005) в Калифорнии, США, предполагает, что возбудитель предпочитает влажные и умеренные климатические условия. Влага в зараженной области обеспечивается за счет тумана, а колебания температуры являются

относительно небольшими по сравнению с внутренней частью Калифорнии. Экспериментальные данные показали, что инфицирование листьев лавра (*Umbellularia californica*) оптимально, когда на поверхности листа остается пленка воды в течение, по крайней мере, 9-12 часов, а температура держитя около 18 °C (Garbelotto et al., 2003). Эти условия часто встречаются в прибрежном районе Калифорнии, где туман наблюдается более чем 200 дней в году.

В отсутствие свободной воды частота инфицирования растений значительно снижается. Это показывает, что зооспорангии и зооспоры являются основным источником инфекции, и растения, преимущественно, поражаются воздушным путем. Спорангии образуются в избытке на листьях, а иногда на веточках растений хозяев, таких как лавр (*U. californica*) и литокарпус густоцветковый (*Notholithocarpus densiflorus*). Уровень развития бесполого спороношения может сильно варьировать: от чрезвычайно обильного на каждом листе в нижнем и среднем ярусе кроны, до всего нескольких пораженных листьев на дереве.

В Калифорнии болезнь всегда коррелирует с наличием двух видов растений, лавра и литокарпуса. В районах, где эти растения произрастают, инфекция с деревьев лавра в подавляющем большинстве превосходит инфекцию на литокарпусе, предполагая ключевую роль, которую играет этот вид в эпидемиологии болезни. После первых дождей *P. ramorum* может быть обнаружена в окружающей среде (Davidson et al., 2002).

Заражение листьев происходит в течение нескольких часов, и зараженные листья могут сохраняться на ветвях более года, обеспечивая постоянный источник инфекции. При высокой относительной влажности на пораженных листьях образуются спорангии и хламидоспоры, которые переносятся по воздуху дождем на другие деревья. На таких растениях, как Литокарпус густоцветковый, листовые инфекции часто связаны с инфекциями веток и приводят к их отмиранию. Главный стебель, вероятно, поражается в финальной стадии заболевания.

Почва и листья являются источниками инфекции: листья инфицируются, если их поместить на зараженную почву. Древесину можно заразить, поместив ее под пораженные листья. С другой стороны, чрезвычайно трудно заразить листья, размещая их на зараженной древесине. Эти результаты показывают, что листья, а не древесина играют решающую роль в эпидемиологии болезни. Листья дуба обычно не поражаются *P. ramorum*, дубы не могут эффективно распространять болезнь. Однако дубы имеют гораздо больше шансов заразиться *P. ramorum,* если они растут в непосредственной близости от лавровых деревьев (Kelly, Meentemeyer, 2002; Swiecki, Bernhardt, 2003).

Спорангии могут выживать в течение нескольких недель даже в сухих условиях, в то время как период выживания хламидоспор до сих пор неизвестен. Хламидоспоры можно найти в изобилии в почве, воде и пораженных листьях. Хламидоспоры в лавровых листьях довольно устойчивы и могут выживать в течение недели при температуре 55°C.

Заражение растений *P. ramorum* происходит только в Европе и некоторых районах Северной Америки. Были идентифицированы три расы этого патогена: EU1, NA1 и NA2, названные в честь континента, где они были впервые найдены, а число указывает на порядок открытия (Grunwald et al., 2009).

Источником распространения *P. ramorum* является растительный материал, хламидоспоры в воде и почве, а также зооспорангии, содержащиеся в воде, почве и переносимые ветром и дождем. Нет известных переносчиков болезни, кроме человека, но любое животное, которое передвигается по почве, может быть потенциальным вектором.

1.4. Симптомы проявления фитофторозов на древесных и кустарниковых растениях.

Виды *Phytophthora* поражают растения, вызывая отмирание тканей. Повреждаться могут листья, стебли, корни. Симптомы на листьях

называются «ожог». Повреждения на веточках или стволах «язвы», которые могут быть локальными или опоясывать ствол дерева. Если ветви полностью покрыты язвами, то это приводит к их отмиранию. Фитофтора может проникать в сосудистую систему дерева и распространяться по ксилеме, что приводит к «увяданию» части кроны или всего дерева. Патогены также могут поражать корневую систему, приводя к «корневым гнилям». Некоторые виды вызывают отмирание только тонких корней, а другие поражают полностью корневую систему дерева, приводя к увяданию или внезапной гибели.

Различные причины могут привести к тем же симптомам поражения надземных органов, что и фитофторозные корневые гнили. Все, что блокирует поступление воды и питательных веществ к растению (недостаток воды, зимние травмы, механические травмы, грибные и бактериальные корневые гнили) приводит к увяданию, хлорозу листьев (пожелтению), некрозу листьев, преждевременному листопаду и смерти дерева.

Некоторые виды фитофтор могут вызывать различные симптомы на одном растении или на разных растениях. Многие виды грибов или абиотические условия могут приводить к появлению сходных симптомов с фитофторозами, что значительно затрудняет диагностику оомицетов. Так, раковые повреждения стволов бука европейского с образованием язв и выделением липкой жидкости по симптомам сходны при поражении как *P. ramorum*, так и *P. kernoviae*. Еще более затруднена диагностика заболевания по листовым поражениям. Динамика развития листовых некрозов, вызываемых названными видами, также достаточно сходна, к тому же на листовой пластинке, черешке листа и молодом побеге одного вида симптомы могут носить разный характер (локализация пятнистостей, ожоги). В случае (при высокой относительной влажности воздуха) образования на пораженных (или бессимптомных) органах белого налета - спороношения *P. ramorum*, его идентификация начинается с прямого

выделения возбудителя болезни и изучения его морфологических параметров.

Ниже приведены 7 основных типов симптомов, вызываемых фитофторами.

Ожог листьев: на листьях появляются водянистые пятна неправильной или клиновидной формы, которые становятся коричневыми или черными, без желтой окантовки. Повреждения могут распространяться от черешка листа к центру (рисунок 3).

Рисунок 3. Пораженные листья (http://forestphytophthoras.org/gallery).

Отмирание веточек: конец стебля или ветки отмирает и инфекция распространяется в направлении главного стебля. Процесс часто сопровождается опадением листьев (рисунок 4).

Рисунок 4. Отмирание веточек (http://forestphytophthoras.org/gallery).

Опадение листвы: растения теряют листья и перестают расти, в связи с чем крона становится редкой. Это длительный процесс, который может происходить в течение нескольких лет (рисунок 5).

Рисунок 5. Опадение листвы и гибель дерева (http://forestphytophthoras.org/gallery).

Гибель деревьев: часть кроны или полностью вся крона отмирает, причем мертвые остаются на дереве (рисунок 5).

Язвы: темноокрашенные некротические поражения тканей под корой. Обычно они хорошо заметны, если удалить кору. Чаще поражаются стволы и крупные ветви. Язвы часто сопровождаются выделениями красно-коричневой жидкости через кору, что создаёт видимость кровотечения (рисунок 6).

Рисунок 6. Язвы на стволе дерева (http://forestphytophthoras.org/gallery).

Гнили: загнивание тканей сопровождается темной окраской. Чаще всего поражаются корни, но иногда и часть стебля над поверхностью почвы (базальная гниль). Воротниковые гнили появляются у основания ствола и распространяются чуть ниже уровня почвы. Чтобы увидеть воротниковые гнили необходимо удалить кору. Камбий имеет тусклый красный или красновато-коричневый цвет. Выше этой области камбий имеет нормальный для растения цвет, как правило, от белого до светло-зеленого. Переход между пораженной областью и здоровой может быть четким, с

характерным краем. Корневая система, пораженная фитофторозной корневой гнилью, редкая, корни темные, разлагающиеся. Симптомы наиболее заметны на кончиках корней и вблизи корневой шейки. Корни начинают разлагаться, как правило, из-за питания других микроорганизмов после их гибели от фитофторы (рисунок 7).

Рисунок 7. Корневые и прикорневые гнили (http://forestphytophthoras.org/gallery).

Увядание: листва становится вялой в связи с прекращением поступления воды. Это часто является первым надземным симптомом корневых гнилей.

P. ramorum вызывает три основных типа симптомов: образование язв на стволах взрослых деревьев, поражение побегов, приводящее к их усыханию, и различные некрозы на листьях. В основании стволов (дуб турецкий, бук европейский, каштан конский, лиственница японская) возникают плоские или слегка вдавленные язвы, из которых выделяется жидкость темно-красного или почти черного цвета. В месте поражения под корой находится некротическая обесцвеченная ткань внутренней коры. На границе поражения часто проступают черные линии. На молодых деревьях четкие границы могут быть не видны. Листья на пораженных деревьях изменяют окраску до коричневатой, впоследствии такие деревья погибают.

На пораженных побегах наблюдаются коричневые до черного цвета некрозы, распространяющиеся, как правило, от верхушки к основанию. Такие поражения могут возникнуть в любой части побегов и даже стеблей, в том числе и в его основании. Это приводит к быстрой гибели побега или ствола (рододендрон, калина, сирень), обвисанию листьев (рододендрон). Инфекция распространяется и на черешки листьев, а от них – на главную жилку (рододендрон, пиерис и др.).

Наиболее разнообразны листовые поражения. Достаточно часто наблюдается типичная форма проявления заболевания, характерная для видов *Phytophthora* - поражения листовых пластинок с апикальной части (рододендрон, сирень, калина, камелия и др.). В этом случае инфекция может продвигаться по направлению к основанию листовой пластинки с переходом на черешок и даже в побег. Наблюдается и другая локализация некрозов: патоген также может проникать в лист из побега через черешок, с развитием некроза в обратном направлении, от основания к вершине. При массовом развитии бесполого спороношения встречается образование беспорядочных локальных пятен на листовой пластинке.

1.5. Морфология наиболее распространенных и опасных видов рода *Phytophthora* - патогенов древесных и кустарниковых растений.

Идентификация многих видов *Phytophthora* может быть относительно проста; в то же время схожие морфологические особенности и внутривидовая изменчивость может сделать род *Phytophthora* достаточно трудным для видовой идентификации.

Самая надежная характеристика, часто используемая для начала морфологического определения вида, - это толщина папилы (сосочка) спорангия. Классифицируется папилярные (размер сосочка ≥3.5 мкм) (рисунок 8 A, D), полупапилярные (размер сосочка <3,5 мкм) (рисунок 8 E, G) и непапилярные (рисунок 8 H) с очень небольшим утолщением зооспорангии. Еще одним полезным признаком для идентификации

является наличие и длина ножки спорангиев: короткая - менее 5 мкм (рисунок 8 B, E), средняя - между 5 и 20мкм (рисунок 8 C, F), длинная - более 20 мкм (рисунок 8 D, G). Почти все виды непапилярных спорангиев неопадающие (рисунок 8 H), за исключением P. *pinifolia* A.Durán, Gryzenhout & M.J.Wingfield, у которой спорангии являются частично опадающими со средней ножкой (Durán et al., 2008), и *P. foliorum*, спорангии которой частично опадающие с короткой ножкой (Donahoo et al., 2006). Еще один признак, используемый при видовой идентификации - это тип пролиферации зооспорангиев (внутренняя, внешняя, или вложенная (рисунок 8 I, J)). Большинство папилярных и полупапилярных спорангиев не показывают внутреннюю пролиферацию кроме *P. multivesiculata* Ilieva, Man in 't Veld, W. Veenb.-Rijks & R. Pieters (Ilieva et al., 1998) и *P. plurivora* Jung & Burgess (Jung, Burgess, 2009). Большинство непапилярных видов имеют пролиферирующие спорангии, исключением являются *P. rosacearum* E.M. Hansen & W.F. Wilcox (Hansen et al., 2009), *P. pinifolia* (Durán et al., 2008). Форма спорангиев (яйцевидные, обратно-яйцевидные, грушевидные, обратно-грушевидные, булавовидные, обратно-булавовидные, почковидные, нерегулярные), размер (отношение длины и ширины) и основание спорангиев (конические или округлые) является важной характеристикой (Gallegly, Hong, 2008). Большинство видов *Phytophthora* spp. показывают различия по форме зооспорангиев. Для идентификации также необходимо отмечать ветвление зооспорангиеносцев (неразветвленные, с шаровидными вздутиями, близко симподиальные, просто симподиальные, соединено симподиальные, зонтичные и неправильно разветвленные) (рисунок 8 K-N).

Хламидоспоры - толстостенные споры, ограниченные от мицелия перегородками. Их наличие (редкая или частая встречаемость), положение (латеральные, терминальные или интеркалярные), и форма (шаровидные, почти шаровидные, или удлиненные) являются диагностическими признаками хламидоспор (рисунок 8 O, P). Гифальные вздутия, в отличие от

хламидоспор, тонкостенные, не отделены перегородками от мицелия и могут быть разной формы. Их наличие (частота встречаемости), форма (шаровидные, почти шаровидные, удлиненные, обратнояйцевидные, искаженной формы), положение (терминальное или интеркалярное) и формирование цепочек полезны в идентификации (рисунок 8 S).

Грибы рода *Phytophthora* могут производить ооспоры посредством слияния оогония и антеридия. Гомоталличные виды образуют ооспоры в одной культуре (оогонии и антеридии в этом случае образуются на мицелии одного штамма), в то время как гетероталличные виды только в присутствии штамма противоположного типа совместимости (A1 или A2). Гомо- или гетероталлизм – важный систематический признак.

Из 117 зарегистрированных видов *Phytophthora* большинство гомоталличные. Несколько непапилярных видов являются стерильными, у них не наблюдается образование половой стадии; к ним относятся *P. litoralis* T. Jung, Stukely & T.I. Burgess, *P. pinifolia* (Durán et al., 2008; Jung et al., 2011). *P.macrochlamydospora* J.A.G.Irwin, *P. quininea* Crand. (Irwin, 1991). *P. gonapodyides*, *P. thermophila* T. Jung & Stukely и *P. lateralis* являются стерильными или могут производить гаметангии в особых условиях (Jung et al., 2011). *P. leersiae* Sawada ex H.H. Ho & H.S. Chang единственный вид, который образует только половую стадию (Ho et al., 1992).

Антеридии у фитофтор могут быть парагинные или амфигинные. Парагинные антеридии образуются, когда антеридиальные гифы прикрепляются к оогонию сбоку (рисунок 8T). Амфигинный антеридий образуется, когда оогоний растет через антеридиальную гифу, образуя своего рода воротник, который окружает антеридий (рисунок 8U). Некоторые виды имеют только один тип антеридия, в то время как несколько видов способны образовывать оба типа. Почти все гетероталличные виды имеют амфигинный антеридий за исключением *P. hydropathica* C.X. Hong & Gallegly, которая образует оба типа антеридиев

(Hong et al., 2010). *P. insolita* Ann & W.H. Ko это единственный вид фитофторы, который не имеет антеридиев, несмотря на образование ооспор.

Несколько видов *Phytophthora* имеют орнаментированные стенки оогониев (рисунок 8V), в том числе *P. alni subsp. alni, subsp. multiformis, and subsp. uniformis* (Brasier et al., 2004), *P. cambivora, P. katsurae* Ko & Chang и *P. cyperibulbosi* Seethal. & K. Ramakr. Некоторые виды образуют оогонии с коническими основаниями (рисунок 8W). Ооспоры могут быть плеротическими если оогоний заполнен (рисунок 8X), или аплеротическими, если есть пространство внутри оогония (рисунок 8T). Некоторые виды, такие как *P. kernoviae* и *P. morindae* Abad & S.C. Nelson, имеют очень толстые стенки на ранних стадиях (рисунок 8X), которые становятся тоньше по мере созревания ооспоры.

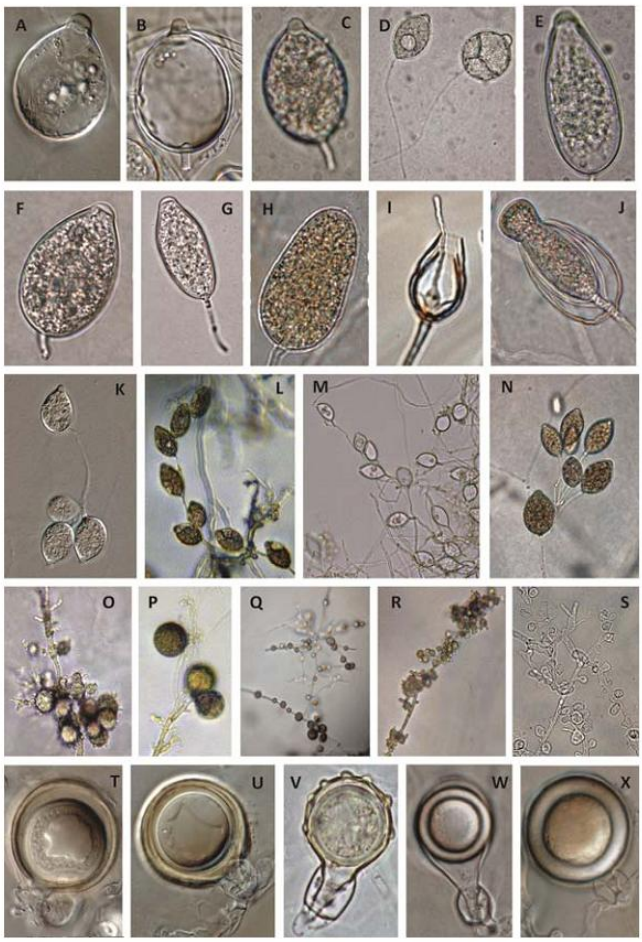


Рисунок 8. Морфологические характеристики видов *Phytophthora* spp. (Martin et al., 2012).

Спорангии *P. ramorum* прозрачные, эллипсоидные или продолговато-яйцевидные (длина х ширина = 25-97 х 14-34 мкм, в среднем 46-65 х 21-28 мкм), симподиально разветвленные, полупапилярные, опадающие или на короткой ножке. Хламидоспоры большие, круглые, прозрачные или желтоватого цвета в зависимости от среды. Они могут быть терминальными и интеркалярными, реже латеральными. Хламидоспоры являются хорошим диагностическим признаком. Размер хламидоспор составляет 20-91 мкм, в среднем 46-60 мкм. *P. ramorum* является гетероталличным, амфигинным видом, оба типа скрещивания известны в природе. При искусственном скрещивании половые споры образует редко. Диаметр оогония в среднем 30,5 мкм, диапазон 25-35 мкм; ооспоры в среднем 25,5 мкм, диапазон 22,5-27,5 мкм; ширина антеридия в среднем 17,3 мкм, длина - 15,0 мкм. Гифы иногда с бугорками, хотя и не имеют вздутий, присутствуют перегородки, особенно при образовании хламидоспор. Мицелий прижатый, образует концентрические кольца роста, более или менее выраженные в зависимости от типа среды (Werres et al., 2001).

P. lateralis образует спорангии (средний размер 26-60 мкм х 12-20 мкм) в воде, они яйцевидные, обратно-яйцевидные или грушевидные, непапилярные, неопадающие на простых симподиальных спорангиеносцах. Гифальные вздутия отсутствуют. Тонкостенные хламидоспоры (20-77 мкм, в среднем 40 мкм) образуются в жидкой среде или в агаре. Они от суб-шаровидных до шаровидных или нерегулярных, терминальные или промежуточные, иногда расположены горизонтально или сидячие на гифах. Патоген считается гомоталличным видом, но ооспоры в культуре на питательной среде обычно не образуются.

Спорангии *P. kernoviae* (34-52 х 19-31 мкм) папилярные и опадающие, иногда формируется на морковном агаре на свету, яйцевидные, лимоновидные, асимметричные, большинство с вакуолями. Длина ножки 5-19 мкм. Спорангиеносцы симподиальные. Гифы иногда зубчатые или бугорчатые. Хламидоспоры не наблюдаются. *P. kernoviae* гомоталличный

вид. Диаметр оогониев 21-28 мкм (в среднем 23,5-25,5 мкм), часто с конической ножкой. Ооспоры 19-25 мкм (в среднем 21,1-22,5 мкм), плеротические, толщина стенки 3,5-5 мкм (в среднем 3,5 мкм). Антеридии амфигинные, размером, как правило, 10-14 х 9-12 мкм.

Мицелий *P. cactorum* состоит из длинных, ветвящихся, прямых и изогнутых гиф. Нередко они отходят под прямым углом и слегка вздуты в местах ответвлений, 4–7 мкм толщиной. Хламидоспоры образуются в большом количестве, терминальные и интеркалярные, шаровидные, бесцветные или желтоватые, 19,0–53,5 мкм в диаметре. Спорангиеносцы простые или симподиально-разветвленные, одиночные или пучками. Зооспорангии овальные, лимоновидные, обратно-грушевидные, иногда несимметричные, размером 20–55×17–46 мкм.

P. cinnamomi образует межклеточный и внутриклеточный мицелий в виде бесцветных разветвленных гиф 5–7 мкм толщиной. Сначала он с тонкой оболочкой, с возрастом становится толстостенным и с перегородками. Характерная особенность мицелия *P. cinnamomi* – крупные гроздевидные везикулы, образующиеся на гифах. Хламидоспоры многочисленные, терминальные и латеральные, на короткой и толстой ножке или сидячие, шаровидные, овальные и грушевидные, 15–59 мкм в диаметре, тонкостенные, желтоватые, расположенные группами по 3–10, прорастающие несколькими ростковыми трубками. Спорангиеносцы недифференцированные, простые или симподиально-разветвленные ветви 2,8–5,6 мкм толщиной отходят от более толстых гиф, иногда наблюдается их пролификация. Зооспорангии терминальные, овально-удлиненные, эллипсоидальные, обратно-грушевидные, лимоновидные, тонкостенные, размером 8–84×27–39 мкм, бесцветные или светло-желтые.

Форма спорангиев *P. citricola* сильно варьирует. Они могут быть обратнояйцевидными, обратно-булавовидными, грушевидными или слегка сплющенными с одной стороны; реже - глубоко раздвоенные с двумя вершинами или неправильной формы. Спорангии 30 -75 мкм длиной и 21 -

44 мкм в ширину (в среднем 47 х 34 мкм), неопадающие и стойкие на ножке. Перегородка находится на одном уровне с основанием спорангия. Полупапилярные сосочки широкие и плоские. Спорангиеносцы простые или иногда симподиальные. Хламидоспоры редки (их образование отмечено только на овсяном агаре). *P. citricola* является гомоталличным видом. Антеридии парагинные (редко амфигинные); оогонии имеют сферическую форму и от 18 до 35 мкм в диаметре, в среднем 25,5 мкм, иногда сужаются воронкообразно к основанию; ооспоры имеют сферическую форму, почти плеротические, от 16 до 30 мкм в диаметре, в среднем 22,0 мкм.

Спорангии *Phytophthora plurivora* Jung & Burgess, как правило, формируются терминально на неразветвленных спорангиеносцах или более часто на симподиальных. Гифальные вздутия иногда образуются в узлах. Спорангии неопадающие, полупапилярные, реже с двумя или тремя сосочками или двулопастные и, как правило, формируют заметную базальную вилку, выступающую в пустой спорангий. Спорангии по форме от яйцевидных или лимоновидных до обратно-грушевидных, эллипсоидальных или искаженных. Размер спорангиев в среднем 47,4 ± 7,7 х 33,5 ± 5,1 мкм (общий диапазон 27,5-80,5 х 16,7-69,6 мкм). Хламидоспоры не наблюдаются. *P. plurivora* является гомоталличным видом. Оогонии имеют гладкие стенки, шаровидные диаметром 28,5 ± 3,3 мкм (общий диапазон 15-37,5) или редко вытянутые с сужающимся основанием. Ооспоры обычно шаровидные, но могут быть почти шаровидные у удлиненных оогониев. Толщина стенки ооспор 1,45 ± 0,35μm (диапазон 0,4-2,5 мкм). Антеридии обратно-яйцевидные, булавовидные или неправильной формы, иногда с одним или несколькими выступами, и почти исключительно парагинные. Амфигинные антеридии наблюдается редко.

Спорангии *Phytophthora pini* Leonian неопадающие, полупапилярные, в основном яйцевидные. Спорангии в среднем 47,4 - 31,5 мкм. Спорангиеносцы простые симподиольные. Хламидоспоры не наблюдаются, но иногда встречаются небольшие гифальные вздутия. Гомоталличный вид

с парагинными антеридиями. Оогонии шаровидные и относительно равномерные, в среднем 30,3 мкм диаметром (диапазон диаметра 22.2-41.4 мкм). Ооспоры в основном плеротические, диаметром 19.6-34.2 мкм (в среднем 26,0 мкм), стенки толщиной 1,7 мм (1,4-1,9 мкм). Характеристики антеридий отличаются от *P. citricola*. Антеридии *P. pini* крупнее, асимметрично головчатые, раздельнополые, и прикрепляются к оогонию около ножки. Иногда можно увидеть два антеридия у одного оогония.

Спорангии *P. megasperma* непапилярные, яйцевидные, грушевидные, от 35 до 60 мкм длиной до 25 до 45 мкм в ширину, не опадающие на ножке с внутренней пролиферацией. Спорангиеносцы простые или умеренно разветвленные. Гифальные вздутия образуются в водных культурах; они округлые или угловатые в цепочках. Хламидоспоры не образуются. *P. megasperma,* в основном, гомоталличны. Антеридии неправильной сферической или эллипсоидальной формы (10-18 х 14-20 мкм) главным образом парагинные, но бывают и амфигинные. Оогонии производятся в изобилии в тканях хозяина и на питательной среде, гладкие и суб-сферические, 42-52 мкм в диаметре, в среднем 47,4 мкм. Ооспоры от 26 до 52 мкм в диаметре, в среднем 41,1 мкм.

Спорангии *P. gonapodyides* непапилярные, с внутренней пролиферацией, неопадающие, эллипсоидальные, яйцевидные, грушевидные; от 42 до 75 мкм длиной и от 20 до 32 мкм в ширину (в среднем 44 х 22 мкм). Пролиферация может быть как внутренней, вложенной, так и внешней. Спорангиеносцы симподиальные только в воде. Хламидоспоры и гифальные вздутия не образуются. *P. gonapodyides* является гетероталличным видом. Оогонии и амфигинные антеридии образуются при скрещивании культуры А1 с культурой А2 *P. drechsleri* Tucker. Оогонии шаровидные (от 27 до 48 мкм в диаметре). Ооспоры в культуре аплеротические, толстостенные, от 18 до 32 мкм в диаметре.

Образование зооспорангиев у *Phytophthora polonica* Belbahri, E. Moralejo, Calmin & Oszako не наблюдается ни на каких питательных средах.

Их образование не происходило и в экстракте почвы. Однако в небольшом количестве зооспорангии образовывались в растворе желатина. Спорангиеносцы длинные неветвящиеся. Спорангии в основном от овальных до эллипсоидальных, 52-67 X 32-44 мкм, неопадающие, непапилярные, с внутренней или вложенной пролиферацией. Хламидоспоры обильные сферические, почти шаровидные или грушевидные, средний диаметр 48,4 мкм (в пределах от 16 до 69 мкм), умеренно тонкостенные (1-2 мкм), терминальные, латеральные или интеркалярные на короткой веточке. Ооспоры от аплеротических до почти заполненных, 38,1 ± 2,5 мкм в диаметре, умеренно толстостенные (в среднем 2,9 ± 0,8 мкм). Антеридии в основном булавовидные или неправильной формы, реже сферические и бочкообразной формы, 16,2 ± 2,8 мкм длиной и 13 ± 2,1 мкм шириной; имеют длинные ножки, прикреплены к оогонию рядом с основанием. Преимущественно парагинные, редко амфигинные.

1.6. Диагностика фитофторозных корневых гнилей древесных и кустарниковых растений.

Традиционные методы выделения и идентификации возбудителей фитофторозов древесных растений проводятся на питательных средах и с использованием биоприманок. Применение этих методов может быть отдельным или в комплексе, что увеличивает специфичность диагностики. Однако при использовании каждого необходимы хорошие знания биологии, морфологии возбудителей *Phytophthora* sp., важно учитывать пластичность признаков фитофторозов. В последние годы все больше исследователей ссылаются на низкую эффективность и недостаточную достоверность традиционных методов диагностики.

Характерные симптомы или сочетание симптомов может быть полезно для идентификации видов *Phytophthora* sp. Определение видов *Phytophthora* sp. ведется с помощью выделения организма путем

культивирования на различных микробиологических средах, с последующей идентификацией морфологического сходства или различий с другими видами, а также с помощью молекулярных методов, в том числе ПЦР. Культуральные методы и ПЦР могут обнаружить организм в растительной ткани, растительных остатках, в почве и воде. Темпы роста в процессе культивирования на питательных средах могут изменяться в зависимости от сезона и растения.

Выделение *Phytophthora* sp.

Селективные среды для изоляции патогенов, как правило, состоят из кукурузного агара (CMA) или агара V8 с разными комбинациями антибиотиков: пимарицин, ампициллин, рифампицин, ванкомицин, нистатин; и фунгицидов: пентахлорнитробензол (PCNB) и гимексазол (также известный как Тачигарен). Избирательное действие этих средств, обеспечивается, в основном, пимарицином или нистатином, так как они активны в отношении большинства грибов из группы *Eumycota*. Селективные среды светочувствительны и должны храниться в темноте. Гимексазол подавляет большинство видов *Pythium* и *Morteriell*а, которые могут подавлять и маскировать *Phytophthora*. Для подавления бактерий более эффективным является сочетание рифампицина и ампициллина, чем ванкомицин. Следует также уделить внимание качеству или типу образца материала, из которого планируется выделение патогена (кора, листья, грунт или вода).

Выделение из почвы и воды.

Широкий спектр методов были зарегистрированы для успешного выделения *Phytophthora* из почвенных и водных образцов, включая прямой посев почвы на среду и метод приманок. Из-за ограниченного количества почвы, которое может быть нанесено на поверхность среды, прямой посев обычно используют, когда почва сильно заспорена *Phytophthora*. Метод приманок имеет ряд преимуществ перед прямым посевом. Во-первых, больший объем почвы может быть проверен, что увеличивает вероятность

обнаружения видов, присутствующих в образце. Во-вторых, гомоталличные виды, которые сохраняются в виде спящих ооспор, более вероятно могут быть обнаружены методом приманок, чем при прямом посеве.

Метод приманок основан на использовании приманки, привлекающей зооспоры, которая плавает в почвенно-водной суспензии. Зооспоры плывут наверх и заражают эти приманки, которые затем промывают под дистиллированной или водопроводной водой (в основном для устранения скопления бактерий на поверхности приманки), высушивают и помещают участки с обесцвечиванием на селективные среды. Успех изоляции из почвы возрастает, когда поддерживается температура между 15 и 20°C и приманка не повреждена, что препятствует колонизации *Pythium* sp. и бактериями. Ложноотрицательных результатов можно избежать, если почву подвергнуть методу приманок после сушки на воздухе, или холодного хранения, так как это вызывает прорастание покоящихся спор. Следует отметить, что популяция *Phytophthora* sp. может варьировать в зависимости от сезона, так как образцы могут быть собраны в разное время года. Лист растения в качестве приманки предпочтительней, чем яблоко, груша, или цитрусовые. Для приманки используются листья разных растений, так как каждый тип приманки более привлекателен для разнообразных видов *Phytophthora* sp. Листья камелии, рододендрона и дуба наиболее широко используются в последние годы.

Также существуют методики, включающие вариации методов фильтрации и приманок для изоляции фитофтор. Приманки с листьями помещают в сетчатый мешок и затапливают в воду (например, в поток) в течение определенного периода времени. Время извлечения в значительной степени зависит от температуры воды: при температуре выше 15°C процесс инфицирования может быть довольно быстрым (от 3 до 7 дней). Листья вечнозеленых растений, таких как рододендрон, падуб или *Lithocarpus densiflorus* с толстыми кожистыми листьями, лучше подходят для приманки

по сравнению с хрупкими листьями, которые быстро колонизируются разнообразными организмами.

В дополнение к методу приманок для выделения *Phytophthora* sp. из воды используются нитроцеллюлозные поликарбонатные фильтры с размером пор 3 или 5 мкм. Если вода мутная и содержит большие органические частицы, то необходима предварительная фильтрация марлей. После того как вода отфильтруется, фильтр помещается лицевой стороной вниз на селективную среду и инкубируется в течение от 1 до 3 дней. Фильтры затем удаляют и ежедневно исследуют колонии, характерные для *Phytophthora* sp.

Изоляция из растительной ткани.

Выделение *Phytophthora* sp. происходит из образцов с повреждениями, когда инфекция активна и образцы берутся с границы поражения без стерилизации поверхности. Успех изоляции патогена из некротических тканей уменьшается с присутствием антагонистических бактерий и фенольных соединений, образуемых растением, так как они ингибируют рост *Phytophthora* sp. Образцы с растений, которые производят большое количество фенольных соединений, таких как *Alnus* sp., необходимо промывать повторно. Образцы тканей должны быть высушены фильтровальной бумагой до посева, чтобы препятствовать накоплению бактерий. Ткани с некрозами помещают на 30 секунд в 70% этанол (этанол не оставляет остатков на поверхности и нет необходимости в промывке, по сравнению с использованием гипохлорита натрия) с последующей сушкой на фильтре. На листьях вечнозеленых растений колонизация сапротрофными организмами происходит довольно медленно, обеспечивая тем самым более длительное время для изоляции.

Морфологическая идентификация.

Чтобы начать работу с чистыми культурами необходимо использовать соответствующие селективные среды. Выбор сред для выращивания является особенно важным для идентификации и описания видов. Обычно

используют V8 агар для роста и морфологических особенностей и кукурузный агар, V8 и картофельно-глюкозный агар для получения рисунка колонии. Для оценки морфологии и измерений размера зооспорангиев используют жидкую среду. Изоляты можно инкубировать при комнатной температуре на лабораторном столе, а под белым люминесцентным светом они могут проявлять усиленное образование спорангиев.

Молекулярная идентификация.

Для идентификации на видовом и внутривидовом уровне используются разнообразные молекулярные методы, различающиеся по сложности, требующие разной квалификации персонала и разного по сложности и стоимости оборудования.

Идентификации видов на основе последовательности нуклеотидов.

Наиболее точная идентификация изолятов на видовом уровне осуществляется путем анализа последовательностей специфических локусов. Чаще всего для целей идентификации используют регион ITS, так как для него существует большой набор исследованных последовательностей для многих описанных видов и типовых штаммов из известных коллекций. Тем не менее, это не оптимальный локус для тех видов, которые филогенетически тесно связаны. В последнее время для идентификации начали активно использовать альтернативные ядерные (60S ribosomal protein L10, β-tubulin, enolase, HS protein 90, large subunit rRNA, TigA gene fusion, translation elongation factor 1α) и митохондриальные (cox1, nad1, COX2, nad9, rps10, и SecY) локусы.

Иммунологический метод.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) является биохимическим диагностическим инструментом на основе антител, которые распознают антиген, специфический к растительному патогену. Коммерчески доступные ELISA тесты для обнаружения *Phytophthora* существуют в различных форматах. Иммунодетекция фитофтор в различных типах растительных образцов достаточно проста, эффективна, и

быстра. Поскольку ImmunoStrip и LFD тесты не требуют специального лабораторного оборудования, эти форматы особенно подходят для пользователей с ограниченными техническими ресурсами и опытом.

Анализы на основе ИФА, как правило, используют антитела, которые обнаруживают антигены *Phytophthora*. Антитела некоторых коммерческих ИФА, как известно, реагирует с некоторыми видами *Pythium*, в результате чего получаются ложно-положительные результаты. Многочисленные сравнительные исследования по обнаружению *Phytophthora* с использованием ИФА, посевов на питательную среду, и / или методы на основе ПЦР выявили различия между производительностью каждого теста. Протоколы на основе ИФА успешно обнаруживают *Phytophthora* sp. в многочисленных типах образцов, в том числе в листьях растений, корнях, почве, поливной воде и гидропонных питательных растворах. В некоторых случаях эти анализы не обнаружили присутствие патогена, давая ложноотрицательные результаты. Неспособность обнаружить антигены может быть связана с типом или качеством ткани хозяина или с конкретными видами *Phytophthora* sp.

Антигены, специфичные к конкретным видам в пределах рода *Phytophthora*, до сих пор не созданы, хотя ранее были сконструированы серологические тесты с высокой чувствительностью к определенным видам *Phytophthora*. Антитела с самой высокой чувствительностью к *P. ramorum* и *P. kernoviae* были произведены, однако было установлено, что они дают перекрестные реакции с другими видами *Phytophthora*.

Молекулярные методы идентификации.

Создание ПЦР совершило революцию в диагностике и позволило обнаруживать патогенов в небольших количествах растительной ткани. При правильной разработке праймеров для амплификации высоко специфические диагностические тесты могут быть получены с использованием обычных методов ПЦР. В Классическом ПЦР есть один недостаток: это необходимость визуализации ампликонов на агарозном

геле, что увеличивает время и не позволяет определить количество ДНК-мишени. ПЦР в реальном времени, где краситель включен в смесь для амплификации и флуоресцирует в пропорции к количеству ДНК-матрицы, обладает большей чувствительностью и быстротой обработки пробы, позволяет получать количественные данные. Флуоресценция во время амплификации уменьшает время, необходимое для получения результатов, но увеличивают стоимость оборудования и материалов для выполнения анализов.

Есть несколько различных химических составов, используемых для ПЦР в реальном времени. Краситель SYBR Green флуоресцирует только тогда, когда он встраивается в двойную цепь ДНК. Большое количество двунитевых фрагментов в ПЦР-продукте появляется только в том случае, если была амплифицирована соответствующая последовательность-мишень.

Более высокий уровень специфичности может быть получен с использованием Taq-Man зондов, где целевой конкретный олигонуклеотид имеет флюорохром на одном конце и молекулу гаситель на другом. Когда зонд встраивается в двухцепочечную ДНК, эти молекулы разделяются и краситель флюоресцирует. В целом, эти анализы являются более специфичными, чем SYBR Green из-за идентичности последовательности и меченых зондов. Другое преимущество использования технологии, которая использует комбинацию флюорохрома и гасителя, по сравнению с SYBR Green, является возможность мультиплексирования диагностических маркеров с разными красителями для каждой цели, что позволяет диагностировать до пяти мишеней одновременно при одной амплификации.

Родоспецифичные диагностические маркеры.

Основой видовой диагностики являются, несомненно, видоспецифичные диагностические маркеры. Родоспецифичные маркеры можно совмещать с видоспецифичными маркерами для повышения специфичности диагностики. *Phytophthora*- (родо-) специфический диагностический маркер, совмещенный с видоспецифическим, был

разработан для классического ПЦР на основе кодированного митохондриального cox1-2 spacer гена (Martin et al., 2004). Билодеу с соавторами разработали мультиплексированный TaqMan для ПЦР в реальном времени для анализа *P. ramorum*, который включал родоспецифичные маркеры, основанные на гене тубулина, но наблюдались некоторые перекрестные реакции с другими оомицетами (Bilodeau et al., 2009).

Были разработаны и другие диагностические маркеры для обнаружения *Phytophthora* sp. Например, Ypt-1 ген имеет несколько консервативных зон, применяемых для разграничения видов *Phytophthora* (Schena et al., 2008).

Несколько родоспецифичных маркеров, основанных на ITS регионе, были зарегистрированы. Дрент и др. описали классический ПЦР с парой праймеров, которые амплифицировали продукт размером 752-832 п.н. (Drenth et al., 2006).

Видоспецифичные диагностические маркеры.

Конструирование видоспецифичных диагностических маркеров длительное время было сосредоточено на ITS регионе, однако в более поздних работах были использованы и другие гены: Ypt1, β-тубулин, область между митохондриальными закодированными cox1 и cox2 генами, и некоторые другие. Мультиплексирование анализов повысило точность результатов. Перечень видов, для которых диагностические маркеры были разработаны, представлен в таблице 3.

Таблица 3.

Список диагностических маркеров для идентификации видов рода *Phytophthora* sp.

Вид	Тип ПЦР	Положение гена в хромосоме	Литературный источник
P. alni	Классический	SCAR	Bakonyi et al. (2006), De Merlier et al. (2005), Ioos et al. (2005)
P. cactorum	Классический	SCAR ITS	Causin et al. (2005) Bhat and Browne (2010), Boersma et al.

	ПЦР «в реальном времени»	*Ypt1*	(2000), Lacourt et al. (1997) Schena et al. (2008)
P. cambivora	Классический ПЦР «в реальном времени»	SCAR ITS *Ypt1*	Schubert et al. (1999) Boersma et al. (2000) Schena et al. (2008)
P. cinnamomi	Классический ПЦР «в реальном времени»	ITS *Lpv* SCAR *Ypt1*	Boersma et al. (2000) Kong et al. (2003) O'Brien (2008) Schena et al. (2008)
P. citricola	Классический ПЦР «в реальном времени»	ITS *Ypt1*	Schuburt et al. (1999) Schena et al. (2008,2006)
P. cryptogea	Классический ПЦР «в реальном времени»	*Ypt1* ITS *Ypt1*	Minerdi et al. (2008) Boersma et al. (2000) Schena et al. (2008)
P. kernoviae	ПЦР «в реальном времени»	*Ypt1* ITS	Schena et al. (2008,2006) Hughes et al. (2011)
P. lateralis	Классический ПЦР «в реальном времени»	ITS *Ypt1*	Winton and Hansen (295) Schena et al. (2008)
P. megasperma	ПЦР «в реальном времени»	*Ypt1*	Schena et al. (2008)
P. nicotianae	Классический ПЦР «в реальном времени»	SCAR ITS *parA1* *Ypt1* ITS	Ersek et al. (1994) Boersma et al. (2000), Grote et al. (2002), Huang et al. (2010), Tooley et al. (1997) Kong et al. (2003) Meng and Wang (2010) Huang et al. (2010), Ippolito et al. (2004) Schena et al. (2004)
P. pinifolia	Классический	ITS *Ypt1*	Durán et al. (2009) Durán et al. (2009)
P. pseudosyringae	ПЦР «в реальном времени» Классический ПЦР «в реальном времени»	*Ypt1* *cox* spacer *cox* spacer	Schena et al. (2008) Martin et al. (2004) Tooley et al. (2006)
P. quercina	Классический ПЦР «в реальном времени»	SCAR *Ypt1*	Nechwatal et al. (2001), Schubert et al. (1999) Schena et al. (2008,2006)
P. ramorum	Классический ПЦР «в реальном времени»	ITS *cox* spacer SCAR *gpa1* *trp1* *cox1* ITS *cox* spacer	Garbelotto et al. (2002) Martin et al. (2004) Ioos et al. (2005) Ioos et al. (2006) Ioos et al. (2006) Kroon et al. (2004b) Bilodeau et al. (2007), Hayden et al. (2006, 2004), Hughes et al. (2006a), Tomlinson et al. (2007) Tooley et al. (2006)

	LAMP	*Ypt1* elicitin β-tubulin ITS	Schena et al. (2008,2006) Bilodeau et al. (2007) Bilodeau et al. (2007) Tomlinson et al. (2007)
Специфичные к роду *Phytophthora* sp.	Классический Праймеры ПЦР «в реальном времени»	ITS *cox* spacer ITSc *Ypt1*	Drenth et al. (2006) Martin et al. (2004) Kox et al. (2007) Schena et al. (2008)

Согласно Диагностическому протоколу ЕОКЗР (PM 7/66 (1), 2006) для выявления и диагностики фитофторозов древесных и кустарниковых культур рекомендуется использовать визуальный, микроскопический и биологический методы (влажной камеры и использования питательных сред). Кроме того, для ускоренной идентификации возбудителя разработаны метод приманок, серологические методы и ПЦР-анализ.

P. ramorum растет на большинстве сред, используемых для других видов грибов и оомицетов, таких как кукурузный агар, картофельно-глюкозный агар, V8 и морковный агар. Мицелий растет относительно хорошо при 15-22°C, но рост значительно замедляется, если температура превышает 25°C. Наиболее широко используемой селективной средой для выделения *P. ramorum* из зараженных растений является PARP. Культуры могут быть получены из следующих субстратов: язвы на стволах, листья и стебли. Лучше всего выделение патогена, как правило, происходит в конце зимы и весной. Время, которое прошло между сбором материала и его обработкой, сильно влияет на чувствительность диагностических методов культивирования.

Для некоторых лиственных растений, таких как *Umbellularia* и *Rhododendron*, инкубация во влажной камере в течение от 48 до 64 часов приводит к обильному спороношению.

Можно приманить *P. ramorum* из почвы, водных потоков, инфицированных листьев, и в ограниченной степени из древесины (Davidson et al., 2002c; Werres et al., 2001). Наиболее распространенными приманками, используемыми для *P. ramorum*, являются груши и листья рододендрона. Приманки, как правило, закладываются на 5-7 дней. Затем их

собирают, и оставляют сохнуть в течение нескольких дней, а потом раскладывают на селективную среду PARP и инкубируют при 18°C. С середины лета выделение из почвы становится неудачным. Пока неясно, соответствует ли это временному периоду покоя патогена, или же жизнеспособность инокулята теряется.

Существует широкий выбор протоколов для идентификации патогена на основе ПЦР, как из культур, так непосредственно из зараженного растительного материала (таблица 3). Большинство исследователей пришли к выводу, что сочетание культивирования и молекулярной диагностики с молекулярными анализами - наиболее успешный подход к выявлению *P. ramorum*.

1.7. Методы борьбы с фитофторозными корневыми гнилями древесных и кустарниковых растений.

Лучшая стратегия в борьбе с фитофторозами - это недопущение их появления, для чего необходимо соблюдать следующие правила:

- Уполномоченный и обученный персонал визуально осматривает все входящие саженцы, независимо от происхождения, на наличие симптомов фитофторозов.
- Разгрузка поступающих партий растений с высокой степенью риска должна производиться в чистое место, удаленное от зоны приема и автофургона; мусор должен быть ликвидирован таким образом, чтобы удалить потенциальные источники заболевания.
- Автофургоны, в которых поставляются растения, должны регулярно осматриваться и обрабатываться дезинфицирующими растворами. Грузовики должны быть очищены от растительных остатков, грязь и почва должны смываться с шин, так как грузовики являются потенциальным источником инфекции, если не убраны и не продезинфицированы должным образом.

Если фитофтороз всё-таки обнаружен, то общей стратегией для питомников является искоренение зараженного материала после контрольного обследования. Фумигация, уничтожение растений-хозяев и другие методы могут быть использованы. На заражённую площадь будет наложен карантин, чтобы ограничить распространение видов *Phytophthora*.

В настоящее время доступны четыре процедуры для управления фитофторозными заболеваниями:

1. Уничтожение диких и культурных растений-хозяев может осуществляться с помощью двойной упаковки и правильной утилизации (путем сжигания в пепел), либо паровой стерилизации.

2. Фумигация. После удаления растительного материала питомники дезинфицируются с помощью бромистого метила, базамида или аналогичных биоцидных фумигантов. Если после дезинфекции выявляются виды *Phytophthora*, фумигация повторяется.

3. Дезинфекция всего оборудования и инвентаря, которые вступают в контакт с растениями-хозяевами или почвой.

4. Запрет на выращивание восприимчивых культур в питомниках до тех пор, пока возбудитель не будет ликвидирован.

Интегрированная система защиты растений от фитофторозов.

Если ликвидация растений невозможна, то для борьбы с заболеванием требуется интеграция агротехнических, биологических, химических мер. В большинстве случаев, интегрированный подход к борьбе с патогеном дает лучшие результаты и менее токсичен для окружающей среды.

Агротехнические методы борьбы.

Развитие болезни наступает при одновременном действии трех факторов: 1) наличие восприимчивых растений, 2) присутствие вирулентных возбудителей 3) оптимальные условия окружающей среды.

Манипулирование любым из этих трех факторов через агротехнические элементы управления может помочь в борьбе с заболеванием.

1. Влажность. Это экологический фактор, к которому растения наиболее уязвимы и к которому чувствительны возбудители фитофтороза.

Регулирование водного режима является важным способом контроля фитофторозов. Он включает в себя как количество и продолжительность поступления воды к растениям, так и способ отвода воды от них.

Степень влажности почвы легко регулируется там, где используется орошение. В борьбе с фитофторозами используют более длительное время между поливами, короткие поливы и предотвращение попадания и постоянного контакта поливной воды на стволы деревьев. Размещение растений в зависимости от необходимости в воде может помочь облегчить некоторые из хронических проблем питомников, связанных с фитофторозами.

Необходимо избегать верхнего орошения высоких растений. Орошать следует таким образом, чтобы не допускать длительного увлажнения листа. Правильно приуроченные ирригационные мероприятия уменьшают условия, благоприятные для развития болезни.

Следует также минимизировать накопление и застой воды, так как *Phytophthora* sp. передается через воду. Обнаружения фитофтор чаще происходят в местах накопления стоячей воды.

Хороший дренаж почвы и движение воздуха препятствуют развитию болезни. Следует избегать посадки растений в плохо осушенные участки, на тяжелых глинистых почвах, в низинных районах.

В случаях, когда количество воды, поступающей к растениям, не может регулироваться, необходимо производить посев на гребнях или насыпях, осуществлять посадку в проницаемые, хорошо дренированные почвы и наклонные контейнеры. Предотвращение избыточного уплотнения почвы или рыхления этих областей могут помочь увеличить отвод воды.

Использование чистой или стерильной почвы также уменьшает риск заболевания. Необработанную оросительную воду из любого источника, кроме колодца или муниципального водоснабжения, следует подвергать ежегодному мониторингу на наличие патогена. При использовании для орошения открытых водных источников (пруды, озера, ручьи) необходима правильная обработка воды (например, озонирование, хлорирование или другая программа для обеззараживания воды).

2. Санитарные мероприятия. Санитария определяется как предотвращение накопления инфекции и/или удаление пораженного растительного материала.

Необходимо удаление растений и листвы с подозрением на заболевание. Следует избегать контакта контейнеров с почвой, проводить очистку и дезинфекцию оборудования, обуви и рук после работы с растениями.

Использование высоких температур также подходит для борьбы с *Phytophthora*. Паровая обработка контейнеров для посадки и почвы эффективна против *Phytophthora*. Если горшки и контейнеры для растений используются повторно, то их нужно дезинфицировать путем замачивания в горячей (82°C) воде в течение не менее 30 мин или использовать пар (60°C) в течение 30 мин.

Использование чистых инструментов и производственных площадей поможет предотвратить многие болезни. Несколько видов дезинфицирующих веществ используются для обеззараживания теплиц, горшков, инструментов и оборудования. Эти продукты имеют короткий период действия и менее эффективны, чем фунгициды. Дезинфицирующие средства включают в себя продукты с перекисью и/или гипохлоритом натрия (отбеливатель). Чтобы получить наибольшую эффективность от этих веществ, обрабатываемые поверхности должны быть очищены от почвы и растительных остатков. Увеличение времени контакта с дезинфицирующим раствором также увеличивает эффективность.

3. Расстояние межу растениями. Использование широких междурядий экономически нецелесообразно, однако следует учитывать, что наиболее тяжелые и быстро распространяющиеся вспышки фитофторозов наблюдались в очень плотных посадках. Физический барьер или размещение между посадками растений-хозяев невосприимчивых к фитофторозам растений позволит снизить распространение болезни.

4. Севооборот или оставление поля под паром могут использоваться для снижения первоначальный инфекции. *Phytophthora* образуют устойчивые ооспоры, которые могут сохраняться в почве и в растительных остатках в течение многих лет в условиях отсутствия растения-хозяина. Однако виды *Phytophthora* sp. не конкурентоспособны с сапрофитными грибами, которые могут подавлять их развитие. Таким образом, использование севооборота, особенно для однолетних растений, является эффективным, если альтернативные растения севооборота не восприимчивы к возбудителю

5. Снижение вреда растениям. Травмы служат отправной точкой для заражения видами *Phytophthora*.

6. Правильная борьба с сорняками. Сорные растения хозяева могут питать возбудителя. Кроме того, сорные растения затеняют нижнюю часть культурных растений и затрудняют движение воздуха, что также способствует развитию фитофтороза.

7. pH. Увеличение pH почвы может привести к вспышкам фитофторозов.

9. Ликвидация стресса. Стресс от засухи является важным фактором заболевания, вызываемого *Phytophthora* sp**.**

10. Устойчивые растения. Для предотвращения заражения полезным является использование устойчивых видов и сортов растений хозяев. Например, существуют сорта и гибриды рододендрона, устойчивые к фитофторозной корневой гнили. Несколько сортов и видов *Chamaecyparis* устойчивы к *P. lateralis*.

Использование восприимчивых видов деревьев, которые были привиты на устойчивых подвоях, успешно применяются против фитофторозных корневых гнилей. Однако даже в пределах одного вида растений могут быть особи с различной восприимчивостью к грибным заболеваниям. После появления устойчивых сортов организм патогена может подвергнуться половой рекомбинации и дать потомство, способное инфицировать новые сорта.

Биологические меры борьбы

Биологические средства контроля могут быть использованы для подавления патогена, но они не способны искоренить его. Биологические меры борьбы могут быть полезными и эффективными при использовании в комбинации с другими методами. В настоящее время мало доступной информации о возможных биологических агентах для борьбы с *Phytophthora* sp. Известно, что *Myrothecium verucarria* и *Streptomyces* sp. ингибируют рост *P. cinnamomi* на картофельно-глюкозном агаре. *Trichoderma* значительно снижала смертность деревьев от *P. cactorum* после естественных и искусственных прививок молодых яблонь.

Добавление в компост коры лиственных пород или ели способствует уменьшению заражения *Phytophthora*. Кора увеличивает пористость почвенных смесей и при ее разложении появляются антагонистические почвенные грибы, такие как *Trichoderma* sp.

Химические меры борьбы

Фунгициды являются химическими соединениями, которые уничтожают гриб или ингибируют его рост. Большинство антигрибных препаратов неэффективны против видов *Phytophthora*, так как они не являются истинными грибами. Есть несколько классов соединений, которые имеют положительную активность в отношении видов *Phytophthora* по защите растений от инфекции. Эти соединения редко убивают *Phytophthora*, если растение уже заражено, и могут маскировать развитие симптомов и способствовать непреднамеренному переносу зараженного посадочного

материала и распространению болезни. Зараженная почва или инфицированные корни могут также предоставлять скрытые пути для распространения возбудителя.

Несколько контактных фунгицидов широко используются для защиты растений от заражения листьев различными видами *Phytophthora* sp. Эти фунгициды подавляют прорастание и/или проникновение зооспор или мицелия в ткани растений. Контактные фунгициды неэффективны, если патоген проник внутрь растительных тканей. Их лучше всего использовать в период перед распространением спор. Программы прогнозирования развития фитофторозов могут помочь определить этот период времени.

Соединения на основе меди, такие как бордосская смесь, использовались в течение длительного времени и остаются эффективными. Другие препараты на основе меди включают гидроксид меди, оксид меди, оксихлорид меди и карбонат меди аммония. В каждом случае активным агентом против фитофтор является ион Cu^{2+}.

Фунгициды, производные этилен-бис-дитиокарбаминовой кислоты, такие как манкоцеб, также являются контактными фунгицидами. Продукты хлороталонила, такие как Браво, также используются для эффективного контроля фитофторозов. Этридиазол эффективен химически, но так как он является чувствительным к УФ-облучения, его в основном используют в качестве пропитки почвы.

Системные фунгициды способны проникать в ткани растений. Основные группы сисемных фунгицидов - фениламиды, фосфаты, производные коричной кислоты и хиноны. Есть небольшие различия в том, как каждая группа проникает и распространяется внутри растений. Эти отличия обусловливают то, как и когда они используются для борьбы с фитофторозами. Некоторые химические вещества движутся вверх от корней к верхушке растения (движение по ксилеме) или как вверх, так и вниз в сосудистой системе (движение, как в ксилеме, так и во флоэме).

Проникновение и движение в тканях обеспечивает как защитное действие, так и подавляющую активность. Системные препараты должны применяться при активном росте растений. Все эти химические вещества широко используются для борьбы с фитофторозами. Продукты, которые содержат данные химические соединения, используются в качестве протравителей семян, для обработки почвы или листьев.

Соединения из фениламидной группы движутся по ксилеме (от корней к побегам) и включают в себя металаксил, оксадиксил и мефеноксам. При попытке предотвратить корневую гниль эти химикаты должны быть внесены в почву. Лучше всего весной, непосредственно перед ростом корней.

Фениламидная группа активна только против оомицетов. Они подавляют образование спорангиев, рост мицелия и возникновение новой инфекции.

Фосфонатная группа фунгицидов движется вверх и вниз в сосудистой системе и включает в себя фосэтил алюминия и фосфорную кислоту. В растение эти химические вещества проникают через корни, листья и стебли, а затем перемещаются в другие части. Эффективны обработки всех частей растений и почвы в любое время во время активного роста растений.

Механизм действия этой группы химических веществ, немного отличается. Они непосредственно действуют на фитофторы, и также стимулируют растений-хозяев.

Фениламидные и фосфонатные фунгициды не убивают возбудителей фитофтороза, находящихся внутри растения, но они могут предотвратить заражение. Данные фунгициды подавляют дальнейший рост, если организм уже внутри растения. Результатом является то, что они могут задержать симптомы. После того, как химическая активность фунгицида снизилась, фитофтора может возобновить рост в зараженных растениях.

Некоторые из фунгицидов на основе хинонов обладают эффективностью в отношении фитофтор. Хотя эти фунгициды системного

действия они не двигаются в растительных тканях. Для сравнения, эти химические вещества медленно передвигаются в зеленых листьях и стеблях. Это называется трансламинарное движение. Эти химические вещества используются для управления листовыми инфекциями.

Механизмы действия каждой из этих групп является настолько специфичными, что многие виды *Phytophthora* выработали устойчивость к ним. Устойчивый организм может расти и вызывать заболевание при концентрации препарата, которая должна была предотвратить их рост. Для того, чтобы предотвртить развитие резистентности, системные препараты смешивают с контактными фунгицидами.

В настоящее время тестируются препараты для борьбы с *P. ramorum* и другими фитофторами (Garbeloto et al., 2002, 2003, 2007, 2009). Сравнение действия металаксила-М, фосфорной кислоты (фосфонат), и гидроксида меди в отношении *P. ramorum* было проведено *in vitro*. Оомицет *P. ramorum* показал умеренную чувствительность к фосфорной кислоте *in vitro*, но был очень чувствительным к гидроксиду меди. Инъекции фосфорной кислоты и опрыскивание гидроксидом меди показали хорошую эффективность в предотвращении роста *P. ramorum* на дубах. Хотя металаксил-М был эффективен *in vitro*, опрыскивание горшечных дубов было непокзало высокой эффективности (Garbelotto et al., 2009). В отличие от этого, Линдерман и Дэвис показали, что металаксил является наиболее эффективным для подавления инфекции по целому ряду видов рода *Phytophthora* (*P. ramorum, P. citricola, P. citrophthora, и P. nicotianae*) (Linderman, Davis, 2008).

Знания, обеспечивающие полную программу по борьбе с *P. ramorum* по-прежнему ограничены. Однако были достигнуты значительные результаты, учитывая относительно короткий период времени, как возбудитель был обнаружен. Для того, чтобы минимизировать вред от фитофтороза, следует вполнять следующие условия:

- Сушка при 55°C в течение 30 минут недостаточна, чтобы убить

возбудителя. По крайней мере, требуется 1 час.

- Оомицет восприимчив к сульфату меди и гидроокиси меди. В разных составах умеренно восприимчив к манкоцебу. Возбудитель чувствителен к фосфитам или фосфонатам. Фосфитные инъекции эффективны для дуба. Опрыскивание листьев фосфитами неэффективно на дубе. Возбудитель чрезвычайно чувствителен к металаксилу, но опрыскивание листьев неэффективно на дубе (Garbelotto et al., 2002).

- Управление влажностью крайне важно, особенно когда температура между 15 и 20°С. Для заражения требуется 9-12 часов увлажнения листьев.

- Наличие инфекции в водных потоках можно контролировать биоприманками (листья рододендрона) (Davidson et al., 2002).

Пестициды, зарегистрированные для использования против видов *Phytophthora*, представлены в таблице 4.

Таблица 4.

Фунгициды для борьбы с фитофторозами.

Действующее вещество	**Препарат**	**Производитель**	**На каких культурах зарегистрирован**
Азоксистробин	Амистар	Сингента	Овощные культуры
Хлороталонил	Daconil Ultrex	Сингента	Декоративные растения
Хлороталонил	Echo 720 T&O	SipCam Agro	Торф, Декоративные растения
Меди гидроокись	Champ Formula 2 flowable, WP	Nufarm	Декоративные растения
Меди гидроокись	Champion WP	Nufarm	Декоративные растения
Меди гидроокись	Kocide 2000 T/N/O	Griffin	Торф, Декоративные растения
Диметоморф	Акробат МЦ, ВДГ	BASF	Картофель
Этридиазол	Banrot 40WP, 8G	Scotts	Декоративные растения
Этридиазол	Тертазол	Crompton-Uniroyal	Декоративные растения
Этридиазол	Truban 25EC, 30WP, 5G	Scotts	Торф, Декоративные растения
Флуазинам	Omega 500F	Сингента	Арахис, картофель
Манкоцеб	Дитан М-45, СП	Dow	Декоративные растения
Манкоцеб	Fore	Dow	Торф, Декоративные растения
Манкоцеб	Gavel 75 DF	Dow	Овощные культуры
Манкоцеб +Cu(OH)2	Манкоцеб, СП	Griffin	Фрукты и овощи
Мефеноксам	Апрон XL, ВЭ	Сингента	Овощные культуры
Мефеноксам	Mefanoxam 2	SipCam Agro	Декоративные растения

Мефеноксам	Ридомил Голд МЦ МЦ, ВДГ	Сингента	Фрукты и овощи
Фосфонат	Aliette WDG Chipco	Bayer	Торф, Декоративные растения
Фосфонат	Phostrol	Nufarm	Фрукты и овощи
Фосфонат	Vital	Griffin	Декоративные растения
Пропамокарб	Banol	Bayer	Торф, Декоративные растения
Пираклостробин	Кабрио Топ, ВДГ	BASF	Фрукты и овощи
Пираклостробин	Headline	BASF	Овощные культуры
Трифлоксистробин	Flint	Bayer	Фрукты и овощи

1.8. Эффективность фунгицидов в отношении *P. ramorum*

На сегодняшний день в России не проводилось изучение действия фунгицидов на *P. ramorum*. Однако в других странах такие работы велись и есть данные по некоторым группам соединений и их действию на патоген.

Так, известно, что оомицет *P. ramorum* чувствителен к гидроксиду меди, металаксилу, фосфатам и фосфитам (Garbelotto et al., 2002c; Harnik и Garbelotto, 2006; Schmidt et al., 2006). Гидроксид меди сохранял эффективность до шести недель после обработки *U. californica* (Harnik и Garbelotto, 2006). На *Quercus* spp. и *L. densiflorus* фосфитные инъекции значительно снижали степень поражения. Тем не менее, Канаски и др. (2006) обнаружили различия в способах применения фунгицидов и их влияния на степень поражения болезнью на *L. densiflorus*. Сочетание инъекций и опрыскивания фосфонатом на *Q. parvifolia var. shrevei* было более эффективно, чем применение какого-либо способа по отдельности (Schmidt et al., 2006).

В Великобритании проводили несколько серий исследований по определению эффективности фунгицидов по отношению к *P. ramorum*. Тернер и др. (2004; 2006a; 2006b) тестировали эффективность азоксистробина, боскалида с пираклостробином, циазофамида, этридиазола, фенамидона с манкоцебом, фамоксадона с цимоксанилом, фенамидона с пропамокарб гидрохлоридом, фосетил-алюминия, флуазинама, манкоцеба, манкоцеба с диметоморфом, зоксамида или цимоксанила, металаксила-М, металаксила М смешанного с флуазинамом, манкоцеба или хлорталонила

против европейских изолятов. На чашках Петри, циазофамид, этридиазол, фенамидон, манкоцеб, металаксил-М оказались эффективными, аналогичные результаты были получены и с фотометрических анализов на прорастание спор. Азоксистробин и флуазинам, которые были относительно неэффективны против роста мицелия, были гораздо более эффективны против прорастания спор (Turner et al., 2004). Между изолятами иногда наблюдались значительные различия в чувствительности; была доказана устойчивость к металаксилу-М одного немецкого изолята с рододендрона (Turner et al., 2006a).

Хюнгенс и его коллеги в 2005 году протестировали многие химические вещества на агаризованной среде. Металаксил и диметоморф показали полное ингибирование роста мицелия при концентрации 1 мкг/мл. Цимоксанил, этридиазол и манкоцеб вызывали торможение роста при концентрации от 10 до 100 мкг/мл. Хлороталонил, оксихлорид меди, фенамидон, флуазинам, фосетил-алюминий и пропамокарб гидрохлорид не полностью подавляли рост даже при концентрации 100 мкг/мл. Циазофамид ингибировал рост при более низких концентрациях по сравнению с другими фунгицидами, однако даже концентрация 100 мкг/мл не полностью ингибировала рост.

Исследования с растительным материалом имеют очевидные преимущества. Известно, что некоторые соединения являются более эффективными на растениях, а некоторые химические вещества не работают в тестах с чашками. Кроме того, в случае с фосетил-алюминием, фосфатами и фосфонатами, которые являются стимуляторами растений, активный ингредиент фосфорная кислота освобождается только в растениях (Garbelotto et al., 2002).

Честегнер и др. (2007) проверили эффективность 17 фунгицидов для защиты *Abies procera, Abies grandis* и видов рододендронов на верхушках побегов для хвойных и на листьях рододендрона. Фунгициды были применены перед заражением. В результате обнаружили, что манкоцеб,

манкоцеб с зоксамидом, диметоморф, циазофамид, манеб, фенамидон, хлороталонил, и пираклостробин были наиболее эффективными химическими веществами в снижение заболеваемости на хвойных побегах. На рододендроне они обнаружили, что менее 17 фунгицидов были эффективными, манкоцеб и зоксамид и мефеноксам (Металаксил-М) были наиболее эффективными в борьбе с развитием болезни.

Тернер и др. (2006) использовали листья рододендрона и калины, чтобы проверить эффективность циазофамида, манкоцеба с зоксамидом, фенамидона с пропамокарб гидрохлоридом, металаксила-М и металаксила-М смешанного с флуазинамом, манкоцеба или хлорталонила. Инокуляцию листьев проводили зооспорами на 4 или 7 день после химической обработки. Металаксил-М и смеси, его содержащие, фенамидон и пропамокарб гидрохлорид предотвращали развитие поражения на обоих растениях. Азоксистробин предотвратил развитие поражения на калине.

В России в списке разрешенных к применению агрохимикотов и пестицидов нет фунгицидов против фитофторозов древесных кустарниковых растений. Поэтому нашей целью было определить эффективность препаратов по отношению к P. ramorum. Опыт проводили на чашках Петри и на листьях рододендрона. Основываясь на опыт зарубежных коллег и наличие в России фунгицидов, которые рекомендованы для борьбы с фитофторозами на других культурах, мы выбрали следующие препараты для оценки их действия на *P. ramorum*.

1.9. Описание использованных в работе фунгицидов.

Браво - защитный фунгицид контактного действия. Обладает активностью против фитофтороза. Действующее вещество (хлороталонил) препятствует прорастанию конидий и спор, нарушая функции дыхательных и гликолитических ферментов клеток.

Ридомил Голд МЦ МЦ - защитный, лечащий фунгицид контактного и системного действия. Рекомендован против фитофтороза картофеля и томата. Действующие вещество мефеноксам и манкоцеб.

Манкоцеб защитный фунгицид контактного действия из класса дитиокарбоматов. При растворении в воде образует вещества, воздействующие на ферментные системы грибов. Они нарушают около шести важных биохимических процессов в митохондриях и цитоплазме грибных клеток. В итоге созревание спор тормозится, распространение грибной инфекции сильно ослабляется.

Мефеноксам – системный фунгицид из класса фениламидов, является системным фунгицидом искореняющего и защитного действия. Вещество ингибирует образование белков в грибах, подавляет синтез рибосомальной РНК.

Превикур - защитный фунгицид системного действия. Действующее вещество пропамокарб гидрохлорид относится к классу карбоматов. Обладает активностью против фитофторозов, укрепляет механизмы сопротивляемости растения к инфекции. Пропамокарб гидрохлорид проникает через корневую систему и перемещается в акропетальном направлении, частично сорбируется листьями. Вещество обладает фунгистатическим действием на споры многих почвенных грибов.

Танос - защитный и лечащий фунгицид контактного и системного действия. Действующие вещества фамоксадон и цимоксанил.

Цимоксанил – фунгицид контактного, защитного и лечебного действия с локальной системной активностью, фунгистатик. Способен защищать растения в период инкубации возбудителей. Эффективен против ложномучнисторосяных грибов, высокоактивен против фитофтороза. Он обладает способностью проникать внутрь растения, но не может по нему перемещаться. Подавляет спороношение грибов за счет ингибирования биосинтеза РНК в их клетках.

Фамоксадон – контактный фунгицид защитного и лечащего действия. Эффективен в отношении оомицетов, в том числе против рас, устойчивых к фениламидам. Фамоксадон ингибирует митохондриальное дыхание.

Бордоская жидкость - защитный фунгицид контактного действия. Действующее вещество Бордоская жидкость (меди сульфат + кальция гидроксид) относится к неорганическим веществам и соединениям меди.

Бордоская смесь (меди сульфат + кальция гидроксид) – пестицид, защитный контактный фунгицид и бактерицид. В повышенных дозах оказывает искореняющее действие на покоящиеся формы возбудителей растений. Фунгицидное действие бордоской жидкости обусловлено тем, что при гидролизе под влиянием углекислоты воздуха, выделений грибов и растений основная соль сернокислой меди разлагается и выделяет в небольших количествах сернокислую медь.

Биологические свойства медьсодержащих препаратов определяются тем, что поступившие в клетки патогена ионы меди взаимодействуют с различными ферментами и ингибируют процессы, входящие в дыхательный цикл. Также они вызывают неспецифическую денатурацию белков.

Скор - защитный, иммунизирующий и лечащий фунгицид контактного и системного действия. Действующее вещество дифеноконазол относится к классу триазолов.

Дифеноконазол контактный, системный пестицид, защитный иммунизирующий лечащий фунгицид.

При опрыскивании препарат сорбируется листьями, оказывая защитное и лечащее действие. Дифеноконазол проникает в ткани растения, полностью ингибирует рост субкутикулярного мицелия, снижает уровень спороношения патогена.

Топаз - защитный пестицид системного действия. Действующее вещество пенконазол, относящееся к классу триазолов.

Перемещается акропетально и подавляет инфекцию в период прорастания спор и проникновения ростовой трубки в ткани листа.

Воздействует в очень низких концентрациях на патоген в период его внедрения в ткани листа и формирования гаусторий.

Фарма йод - водорастворимый комплекс йода с неионогенным поверхностно-активным веществом. Он обладает высокой антимикробной активностью в отношении бактерий, фитопатогенных вирусов; при повышенной концентрации эффективен против возбудителей грибных заболеваний. Обладает длительным периодом защитного действия.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа была выполнена в 2010-2014 гг. в Московском Государственном Университете им. М.В. Ломоносова на кафедре микологии и альгологии биологического факультета; часть работы выполнена на базе ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ВНИИКР).

2.1 Проведение мониторинга на выявление фитофторозных корневых гнилей.

Мониторинг проводился в 2011 – 2014 гг. в 6 субъектах Российской Федерации (Московская область, Ивановская область, Ставропольский Край, Республики Карелия, Дагестан и Карачаево–Черкессия) в питомниках и естественных насаждениях древесных и кустарниковых растений. Обследования проводились с конца мая по июль.

В питомниках осматривали каждое дерево (куст) вдоль рядов посадок по ходовым линиям. На больших массивах просматривали деревья с признаками заболевания. Глазомерно отмечали наличие больных деревьев (кустов), характер и степень их поражения, после чего отбирали образцы с наиболее характерными признаками в количестве 3-7 штук с каждого пораженного дерева или куста. В зависимости от типа материала использовали различные методы отбора:

1. В случае язвенных повреждений деревьев срезали кору непосредственно вокруг сочащегося сока, пока не обнажался край ракового образования. Кусочки пораженных тканей (флоэмы, ксилемы, коры) помещали в сейф-пакеты. Образцы каждого вида растений упаковывали отдельно.

2. Засохшие или некротизированные фрагменты побегов срезали с захватом здоровых частей растения таким образом, чтобы была заметна граница между здоровой и пораженной тканью. Отобранные части помещали в контейнеры с небольшим кусочком влажной марли (фильтровальной бумаги) для предотвращения их пересыхания.

3. Подозрительные на зараженность фитофторозом листья саженцев срезали и помещали в сейф-пакеты с кусочком влажной ткани (фильтровальной бумаги).

4. От пораженных растений отбирали почву (в прикорневой части стебля, не менее 500 граммов), которую помещали в пластиковый пакет.

Все образцы, отобранные при обследованиях, помещали в сейф-пакеты, снабжали этикеткой и направляли в лабораторию. В случае задержки доставки образцов их сохраняли в холодильнике при температуре + 4 ºС.

Следует отметить, что отбор растений в питомниках проводился в основном из контейнеров, так как производители в последние годы применяют эту технологию выращивания древесных и кустарниковых культур ввиду ее экономичности и лучшей приживаемости растений при пересадках.

Для диагностики фитофтороза декоративных и кустарниковых культур использовали методы микроскопирования и морфометрии, влажных камер, выделения в чистые культуры с использованием питательных сред, ПЦР-диагностики.

2.2 Выделение возбудителя фитофтороза из растительного материала, почвы и воды.

Небольшие фрагменты пораженных частей растения предварительно обеззараживали в спирте или 0,5%-м растворе гипохлорита натрия в течение 2-5 минут, промывали несколько раз стерильной водой и обсушивали фильтровальной бумагой. Затем их раскладывали в стерильные чашки Петри или пластиковые контейнеры на увлажненную фильтровальную бумагу и инкубировали в течение 3-7 суток при 22-25°С.

Параллельно проводили выделение возбудителя на различные агаризованные среды (морковный агар или PARP(H), Приложение 1). Для этого из поверхностно-обеззараженных тканей (пораженной вторичной коры, побегов или листьев) стерильным скальпелем вырезали небольшие фрагменты (размером 2 мм), которые асептически переносили в чашки Петри на агаризованную среду. Чашки Петри инкубировали при 22-25 ^{o}С в течение 3-10 суток до появления спороношения гриба.

Для выделения видов *Phytophthora* из почвы использовали приманочный тест с листьями рододендрона. В чашку Петри помещали 20 – 30 г исследуемой почвы, которую заливали стерильной деминерализованной водой. Для предотвращения излишнего загрязнения биоприманок грибами из чашек удаляли всплывшую органику, сверху раскладывали листья рододендрона так, чтобы они плавали на поверхности воды. Через 3-7 дней инкубации при комнатной температуре проверяли присутствие изолятов *Phytophthora* микроскопическим, культурально-морфологическим методами и ПЦР.

При выявлении фитофторозов в водоемах использовали метод биоприманок. Для этого в пластиковый пакет с замком помещали листья рододендрона, калины или сирени в количестве 2-3 шт. В пакете проделывались отверстия 3-5 мм для того чтобы вода смогла проникать в него. Приманку забрасывали в водоем и привязывали к берегу. Через 3-7 суток вынимали приманку и исследовали образовавшиеся некрозы культурально-морфологическим методом и с помощью ПЦР.

2.3. Коллекция штаммов, использованных в работе.

В работе было использовано 13 изолятов культур, приведенных в таблице 5. Большая часть штаммов была получена из коллекции DSMZ (Германская коллекция микроорганизмов и клеточных культур).

Таблица 5.

Коллекция возбудителей фитофторозов, использованная в работе

№ п/п	Вид	Номер штамма	Название коллекции
1	*P. ramorum*	-	Коллекция «FERA», Англия
2	*P. kernoviae*	-	
3	*P. lateralis*	-	
4	*P. quercina*	-	
5	*P. ramorum*	-	Коллекция EVIRA, Финляндия
6	*P. infestans*	23	Коллекция станции защиты растений РГАУ-МСХА, Московская область
7	*P. cinnamomi*	DSM 62654	Коллекция «DSMZ», Германия
8	*P. citricola*	DSM 62662	
9	*P. cryptogea*	DSM 62674	
10	*P. erythroseptica*	DSM 62682	
11	*P. megasperma*	DSM 63697	
12	*P. cactorum*	DSM 62643	
13	*P. syringae*	DSM 62714	

2.4. Изучение культурально-морфологических свойств видов рода *Phytophthora* на питательных средах.

Для изучения культурально-морфологических характеристик видов рода *Phytophthora* использовались следующие виды: *P. ramorum, P. cactorum, P. cinnamomi, P. cryptogea, P. syringae*.

Изучение культурально-морфологических признаков отобранных культур проводили путем посева кусочка мицелия гриба на различные питательные среды (морковная (CPA), синтетическая (SNA), овсяно-глюкозная среда и V8) в 4-кратной повторности. Состав сред описан в приложении 1. Культуры инкубировали в термостате при температуре 24 ºС,

с подсветкой лампами дневного света 1200 лк в течение 8-10 часов. Наблюдения за ростом грибов проводили на 3-и, 7-е и 10-е сутки. Отмечали характер и динамику роста колоний, их цвет, тип и интенсивность образования спороношения (размер, форма и т.п.).

2.5. Микроскопирование и определение изолятов *Phytophthora* sp.

Определение проводили методом микроскопирования и морфометрии на микроскопе Axioskop 40 «Carl Zeiss», Германия. Морфологические признаки изучаемых видов сравнивали со стандартными характеристиками, представленными в определительной литературе или с материалом, представленном на сайте http://www.q-bank.eu/Fungi/.

2.6. Искусственное заражение листьев.

Для искусственного заражения использовали листья сирени, которые помещали на фильтр во влажную камеру и проводили заражение путем укола в центральную жилку листа суспензией культуры *P. ramorum* в концентрации $7x10^5$ клеток в 1 мл. Листья инкубировали при температуре 22^0С в комнатных условиях. Симптомы появились на 5-е сутки.

2.7. Выделение ДНК.

Выделение ДНК из растительного материала и чистых культур проводили следующими методами:

1. С использованием набора «Проба ГС» кат. № Р-003/1 (ООО «Агродиагностика», Москва). Метод основан на использовании для лизиса клеток гуанидин тиоционата (GuSCN) и последующей сорбции ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля и т.д.). После отмывок в пробе остается ДНК, сорбированная на носителе, с которого она снимается элюирующим раствором.

2. Согласно методике. описанной J.J. Doyle, J.L. Doyle (1990). В 1,5 мл пробирку вносили 5-7 мг растительного материала, затем добавляли 300 мкл экстрагирующего буфера (2% (w/v) CTAB ¼ M NaCl, 0/4% (v/v) 2-меркаптоэтанол, 20 mM EDTA, 0/1 M Tris HCl, 1% (w/v) PVP 40 pH 7,0-8,0) и растирали его пестиком, затем добавляли еще 200 мкл буфера (доводя

общий V до 500 мкл) и перемешивали на вортексе. Далее пробирку инкубировали 30 мин. при 60 °С и центрифугировали с охлаждением при 10 °С 5 мин. при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку. Добавляли 500 мкл смеси хлороформ: изоамиловый спирт (24:1), встряхивали в руках и перемешивали. Центрифугировали при 10°С в течение 5 мин. при 6000 об/мин. Переносили супернатант в новую пробирку Eppendorf. Добавляли 500 мкл изопропанола, перемешивали для осаждения ДНК. Центрифугировали с охлаждением при 10 °С 5 мин. при 13000 об/мин., осторожно сливали супернатант и осадок подсушивали. Добавляли 500 мкл 70% этанола, центрифугировали с охлаждением при 10 °С 5 мин. при 13000 об/мин., осторожно удаляли супернатант. Высушивали осадок термостатируя пробирку 5-7 мин. при 60 °С. и растворяли его в 50 мкл стерильной воды, встряхивали на вортексе и выдерживали 5 мин. при 60 °С.

3. С использованием фосфатно-солевого буфера Дулбеско (DPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline). Готовили DPBS буфер, состоящий из $CaCl_2$ x $2H_2O$ 1.33 г/л, $MgCl_2$ x $6H_2O$ 1 г/л, KCl 2 г/л, KH_2PO_4 2 г/л, NaCl 80 г/л, Na_2HPO_4 (ангидрид) 11,5 г/л, растворенных в 1 л дистиллированной воды.). В 1,5 мл пробирку вносили 5-7 мг растительного материала, затем добавляли 300 DPBS буфера, растирали его пестиком и перемешивали на вортексе. Центрифугировали пробирку 10 мин. при 13.000 об/мин. Сливали супернатант. Повторяли операцию еще один раз. Затем к осадку добавляли 100 мкл свободной от ДНК воды, перемешивали и термостатировали пробирку 20 мин. при 95^0С. Центрифугировали пробирку 10 мин. при 13.000 об/мин., переносили супернатант в новую 1,5 мл пробирку и хранили при 4^0С.

4. С помощью станции выделения нуклеиновых кислот Tecan Freedom EVO с использованием набора на основе магнитных частиц "М-Сорб-Туб" (ЗАО «Синтол»). Методика выделения включала: лизис ДНК изотиоцианатом гуанидина, сорбцию ДНК на магнитных частицах, осаждение ДНК центрифугированием, стадии промывок и элюцию ДНК.

2.8. Очистка ДНК.

Проводили дополнительную очистку ДНК с помощью поливинилполипирролидоновых (PVPP) колонок. Хроматографические колонки Micro Bio-Spin (Biorad, cat no: 732–6204) заполняли на 0,5 см PVPP, и помещали в пустую пробирку. Затем добавляли 250 мкл воды и центрифугировали в течение 5 мин. при 4000 об/мин. в микроцентрифуге. Затем колонки помещали в чистую пробирку и вносили в них ДНК, центрифугировали в течение 5 мин. при 4000 об/мин.

2.9. Измерение концентрации ДНК.

Концентрацию и чистоту выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 при длине волны 260 нм. Оценку качества экстрагированной ДНК проводили на основании измерения оптической плотности раствора ДНК при 280 и 260 и 230 нм. Для чистых образцов ДНК соотношение оптических плотностей, полученных при 260/280 нм, должно быть около 1,8, при 260/230 нм 1,8-2,2.

2.10. Постановка классической ПЦР.

С выделенными образцами ДНК проводили классическую ПЦР. Праймеры, использованные в исследованиях, представлены в приложении 4. Синтез праймеров проводили в ЗАО «Синтол», ЗАО «Евроген» Москва.

Для амплификации ДНК использовали универсальные праймеры ITS4/ITS5 (White, 1990), которые амплифицируют продукт от 500 п.о. до 1700 п.о. региона ITS rRNA. Амплификацию фрагмента ras-related protein (Ypt1) гена осуществляли с праймерами YPh1F/YPh2R, которые амплифицируют продукт размером 470 п.о. гена Ypt1, специфичный для *Phytophthora* sp. (Schena et al., 2008).

Смесь реактивов для постановки одной реакции объемом 25 мкл с праймерами ITS4/ITS5 содержала:17 мкл свободной от РНК и ДНК воды, 5 мкл 5Х ПЦР буфера Mas^{DD}TaqMIX -2025 (ООО «Диалат Лтд», Москва), по 0,5 мкл каждого праймера (10мкМ) и 2 мкл целевой ДНК.

Смесь реактивов для постановки одной реакции объемом 25 мкл с праймерами YPh1F/YPh2R содержала: 16,8 мкл свободной от РНК и ДНК воды 5 мкл 5Х ПЦР буфера Mas^{DD}TaqMIX -2025 (ООО «Диалат Лтд», Москва), по 0,6 мкл каждого праймера (10мкМ) и 2 мкл ДНК.

Температурно-временные параметры амплификации для праймеров ITS 4/ITS 5 включали преденатурацию 96^{0}С - 15 мин., далее 40 циклов состоящих из денатурации 94^{0}С - 45 сек., отжига праймеров 52^{0}С – 30 сек., элонгации 72^{0}С - 90 сек.; финальный досинтез 72^{0}С - 6 мин.; хранение при +4^{0}С. Для праймеров Y Ph1F/Y Ph2R 96^{0}С - 15 мин., 35 циклов: 94^{0}С-30 сек., 58^{0}С-30 сек, 72^{0}С-30 сек 72^{0}С-10 мин.; хранение при +4^{0}С.

Для постановки специфичной ПЦР к *P. ramorum* использовали следующие праймеры: Phyto 1/Phyto 4(Hayden et al., 2004) с амплификацией продукта размером 687 п. о. и Pram F1/Pram R1 (Lane et al., 2003b) с размером ампликона 700 п.о.

Реакционная смесь с праймерами Phyto 1/Phyto 4 (общим объемом 25 мкл) содержала: 5 мкл ДНК, 5 мкл 5Х реакционного ПЦР буфера Mas^{DD}TaqMIX -2025 (ООО «Диалат Лтд», Москва), по 1 мкл каждого праймера (10 мкМ) и 13 мкл воды, свободной от ДНК и РНК.

Реакционная смесь с праймерами Pram F1/Pram R1 (общим объемом 25 мкл) содержала: 2 мкл ДНК, 5 мкл 5Х реакционного ПЦР буфера Mas^{DD}TaqMIX -2025 (ООО «Диалат Лтд», Москва), по 1,25 мкл каждого праймера (10 мкМ) и 15,5 мкл воды, свободной от ДНК и РНК.

Режим амплификации для Phyto 1/Phyto 4: 15 мин. при 96 °С; затем 35 циклов (15 сек. при 94 °С, 60 сек. при 62 °С и 45 сек. при 72 °С). Далее один цикл при 72 °С в течение 10 мин. и финальный досинтез – 1 сек. при 20 °С, хранение при +40С.

Режим амплификации для Pram F1/Pram R1: 15 мин. при 96 °С; затем 30 циклов (30 сек. при 94 °С, 30 сек. при 57 °С и 30 сек. при 72 °С). Далее один цикл при 72 °С в течение 10 мин., хранение при +40С.

Результаты амплификации регистрировали после проведения электрофореза в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием в гель-документирующей системе Quantum-ST-4-1500 (Япония). Размер продукта ПЦР измеряли, используя маркеры молекулярного веса GeneRuler™ 100+ п.н. и Fast Ruler™ (Fermentas).

Для проверки контаминации в каждый эксперимент включали отрицательный (вода, свободная от ДНК и РНК) и положительный контроли (ДНК референтной культуры) для проверки эффективности ПЦР.

2.10. Секвенирование нуклеотидных последовательностей.

Секвенирование образцов проводили по методу Сэнгера. ПЦР продукты, предназначенные для секвенирования, очищали с помощью коммерческого набора PCR GeneJET (Fermentas, арт. K0701). Реакцию секвенирования проводили с применением реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems). Нуклеотидные последовательности участков генов изучаемых видов анализировали с помощью программного обеспечения «BioEdit» и базы данных NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

2.11. Постановка ПЦР «в реальном времени».

Амплификацию и детекцию в реальном времени проводили на амплификаторе iCycler iQ 5 (Bio-Rad, США) со специфичными к *P. ramorum* праймерами и зондами (Pram 114-FC/Pram 1527-190-R, TaqMan® зонд: Pram 1527-134-T; Pram-5/Pram-6, TaqMan® зонд: Pram-7).

Объем реакционной смеси для праймеров Pram 114-FC/Pram 1527-190-R составлял 25 мкл и включал 2,5 мкл 10X ПЦР буфера MagMix (ООО «Диалат Лтд», Москва), по 1,5 мкл (5 пМ) каждого из праймеров (5 мкМ), 0,5 мкл зонда (5 мкМ), 1 мкл целевой ДНК и 18 мкл стерильной воды. Реакцию проводили при следующих температурно-временных условиях: 1 цикл 96^0C– 15 мин.; 40 циклов 94^0C – 15 сек., 60^0C – 60 сек. Образец

считался положительным *P. ramorum*, если он производил флуоресценцию FAM фиксированного значения Ct FAM < 40

Для праймеров Pram-5/Pram-6 объем составлял 15 мкл и состоял из: 1,5 мкл 10Х ПЦР буфера MagMix (ООО «Диалат Лтд», Москва), по 0,6 мкл (5 пМ) каждого из праймеров (5 мкМ), 0,6 мкл зонда (5 мкМ), 5 мкл целевой ДНК и 6,7 мкл стерильной воды. Реакцию проводили при следующих температурно-временных условиях: 1 цикл 96^0С– 15 мин.; 35 циклов 95^0С – 15 сек., $60,5^0$С – 60 сек. Образец считался положительным как *P. ramorum,* если значение Ct < 35.

Для разработки и проведения ПЦР «в реальном времени» проводили подбор олигонуклеотидов на основе гена Ypt1. Нами были разработаны специфичные к *P. ramorum* праймеры PramF PramR и зонд PramP с гасителем флуоресценции MGB. Также, были разработаны универсальные к роду *Phytophthora* праймеры PhytoYptF/PhytoYptR и Phyto2YptF/Phyto2YptR и шесть специфичных к гену Ypt1 зонда, содержащие разные флуоресцентные метки на 5’ конце и гасители флуоресценции на 3’конце MGB типа. Синтез зондов проводили в компании Applied Biosystems. Разработанные зонды и праймеры представлены в приложении. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл и включал 2,5 мкл 10Х ПЦР буфера MagMix (ООО «Диалат Лтд», Москва), по 1 мкл каждого из праймеров (10мкМ), 1 мкл зонда (5 мкМ), 2 мкл целевой ДНК и 17,5 мкл стерильной воды. Реакцию проводили при следующих температурно-временных условиях: 1 цикл 96^0С– 15 мин.; 40 циклов 95^0С – 15 сек., 51^0С – 60 сек.

При оптимизации ПЦР «в реальном времени» для каждого из подобранных зондов и для мультиплексной ПЦР подбирали температурный режим, число и продолжительность циклов амплификации, концентрацию зондов и праймеров.

2.12. Определение биологической эффективности фунгицидов.

Определение биологической эффективности препаратов проводили на твердой питательной среде СРА и на листьях рододендрона. В питательную

среду добавляли фунгициды в трех концентрациях и разливали по чашкам Петри, затем засевали *P. ramorum* диском диаметром 10 мм.

Листья рододендрона помещали во влажную камеру и опрыскивали раствором фунгицида, затем проводили искусственное заражение суспензией *P. ramorum*, методом укола в центральную жилку листа.

Для опыта использовали следующие фунгициды и концентрации препарата (таблица 6).

Таблица 6.

Препараты, использованные в опыте.

№ п/п	Название препарата	Концентрация препаратов, %	
		опыт на питательной среде	опыт на листьях
1.	Бордоская смесь	2; 1; 0,5	2; 1;
2.	Превикур	0.4; 0.2; 0.1	0,4; 0,2
3.	Топаз	0,1; 0,05; 0,025	0,1; 0,05
4.	Скор	0,04; 0,02; 0,01	0,04; 0,02
5.	Браво	1; 0,5; 0,25	1; 0,5
6.	Ридомил Голд МЦ	1; 0,5; 0,25	1; 0,5
7.	Фарма Йод	1; 0,5; 0,25	1; 0,5
8.	Танос	0,3; 0,15; 0,075	0,3; 0,15

Каждый препарат и концентрацию в опыте на питательной среде оценивали по 5-ти кратной повторности. Диаметр колоний измеряли на 3, 5, 7 и 10 сутки. Расчет биологической эффективности проводили по формуле: Б = (К-В / К) х 100%, К – диаметр колонии в контроле, В -диаметр колонии в варианте.

В опыте с листьями каждый препарат и концентрацию оценивали по 3-х кратной повторности. Степень развития некрозов оценивали по 5-ти бальной шкале на 5, 7, 9 и 12 сутки.

Шкала поражения в баллах: 0 – здоровые; 1 – поражено до 25% листа; 2 – до 50%; 3 – до 75%; 4 - до 100%.

Развитие болезни вычисляли по формуле:

$R = \sum(a \times b) \times 100 / N \times K$, где $\sum(a \times b)$ – сумма произведений числа пораженных растений (a) на соответствующий балл поражения (b); N – общее число растений; К – высший балл шкалы учета (число баллов в шкале) (Методы мониторинга вредителей и болезней леса, Том III, Справочник, М., 2004).

Расчет биологической эффективности проводили по формуле:

$Б = (Rк – Ro) \times 100\% / Rк$, Rк – развитие болезни в контроле, Ro – развитие болезни в варианте (Методы мониторинга вредителей и болезней леса, Том III, Справочник, М., 2004).

ГЛАВА III. ОБСЛЕДОВАНИЕ НА ВЫЯВЛЕНИЕ ФИТОФТОРОЗНЫХ КОРНЕВЫХ ГНИЛЕЙ ДРЕВЕСНЫХ И КУСТАРНИКОВЫХ РАСТЕНИЙ В ПИТОМНИКАХ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАСАЖДЕНИЯХ

3.1. Видовой состав грибов и грибоподобных организмов, выявленных в питомниках.

Обследования проводились в течение 2011 – 2013 гг. в питомниках Московской и Ивановской областей, Республики Карелия и Ставропольского Края. Всего было отобрано 313 образцов (Московская область – 200 образцов, Ивановская область – 50 образцов, Республика Карелия – 50 образцов, Ставропольский Край – 13 образцов) почвы и вегетативных частей растений с наиболее характерными признаками: усыхание листвы и ветвей, изменение цвета древесины, с симптомами язвенных повреждений стволов, усыхания и отмирания побегов и некрозами листьев.

В Московской области были обследованы посадки древесных и кустарниковых культур в Пушкинском, Рузском, Егорьевском, Шаховском,

Одинцовском, Волоколамском, Подольском и Раменском районах, а также в г. Мытищи и в г. Ивантеевка на площади 75 га. В Ивановской области были обследованы посадки древесных и кустарниковых культур в Ивановском районе на площади 31 га. В Республике Карелия было обследовано 6,229 га в г. Петрозаводск. В Ставропольском Крае обследовались два питомника г. Пятигорска, общей площадью 0,2 га (таблица 7).

В лаборатории отобранные образцы сначала осматривались визуально, затем отдельные части закладывались во влажную камеру или на питательные среды. После появления спороношения проводилось микроскопирование и ПЦР анализ с секвенированием с целью определения патогена до вида. Образцы почвы исследовались методом биоприманок.

В результате микологической экспертизы древесных и кустарниковых культур из Московской области в 2011 году были выявлены следующие виды: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler (альтернариоз), *Verticillium* sp. (вертициллез), *Fusarium* sp. (фузариоз), *Fusarium oxysporum* Schlecht. (фузариоз), *Trichothecium roseum* Lk. (гниль), *Phyllosticta* sp. (пятнистость), *Puccinia coronifera* Kleb. (ржавчина), *Cladosporium herbarum* (Pers) Lk. (оливковая плесень), *Monochaetia* sp. (пятнистость), *Pestalotia* sp. (некроз), *Nigrospora* sp. (пятнистость). В 2012 году на образцах были обнаружены: *Fusarium* sp. (фузариоз), *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler (альтернариоз), *Cladosporium herbarum* (Pers) Lk. (оливковая плесень), *Pestalotia funerea* Desm. (пятнистость), *Dothichiza ferruginosa* Sacc.(усыхание), *Phyllosticta vaccinii* (Earle) Shear (пятнистость), *Fumago vagans* Pers. (черная пятнистость), *Tubercularia acinorum* Cav. (усыхание ветвей), *Phoma* sp. (фомоз), *Hormodendrum cladosporioides* (Fields) Sacc. (синева древесины), *Stigmina* sp.(парша), *Phomopsis* sp. (фомопсис), *Rhizosphaera kalkhoffii* Bubak (ризосфериоз), *Verticillium lateritium* (вертициллез) (таблица 7).

Как видно из таблицы, многие виды повторяются в следующем году, но присутствует ряд патогенов, которые не были выявлены в 2011 году.

В Ивановской области были выявлены следующие виды: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler (альтернариоз), *Verticillium* sp. (вертициллез), *Fusarium* sp. (фузариоз), *Fusarium oxysporum* Schlecht. (фузариоз), *Fusarium semitectum* Berk. et Pov. (фузариоз), *Trichothecium roseum* Lk. (гниль), *Rhizosphaera pini* (Corda) Moubl. (побурение хвои) (таблица 7).

В образцах из Республики Карелия были выявлены: *Fusarium* sp.(фузариоз), *Verticillium* sp. (вертициллез), *Cladosporium herbarum* (Pers) Lk. (оливковая плесень), *Alternaria* sp. (альтернариоз) (таблица 7).

На полученных образцах из Ставропольского Края выявлены следующие виды: *Fusarium* sp.(фузариоз), *Verticillium* sp. (увядание), *Pestalotia* sp. (некроз), *Alternaria* sp. (альтернариоз) (таблица 7).

Таблица 7.

Результаты микологической экспертизы образцов посадок древесных и декоративных кустарниковых культур в питомниках

Название обследуемого объекта, площадь	**Кол-во исследуемых образцов**	**Вид растений**	**Выявленные виды**
Московская область			
2011			
ООО «Питомник Назарово», 4 га	32	Дуб, Клен, Ель, Сирень, Рододендрон, Жимолость, Калина, Лиственница, Каштан, Пихта	*A. alternata*, *F. oxysporum*, *Cladosporium herbarum*, *Monochaetia* sp. , *Triposporium* sp.
ЗАО «ТИС'С Руза», 10 га	43	Рододендрон, Калина, Магнолия, Дуб, Сирень, Ель, Тис, Лиственница, Голубика, Лещина	*A. alternata*, *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Pestalotia* sp., *Nigrospora* sp.
ООО «СиМ», Егорьевский р-н, МО 2 га	10	Сирень, Лещина, Жимолость, Клен	*A. alternata*, *Fusarium* sp., *Verticillium* sp.
ОООКХ «Сунгоркина В.Н.», 10 га	28	Дуб, Каштан, Ель, Сирень, Калина, Лиственница, Пихта, Клен	*A. alternata*, *F. oxysporum*, *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Phyllosticta* sp., *P. coronifera*
ООО «Зеленый сад», 1 га	26	Дуб, Каштан, Ель, Сирень, Калина, Клен	*A. alternata*, *Fusarium* sp., *Verticillium* sp.
ФГУП «Ивантеевский	11	Дуб, Клен, Калина, Сирень, Ель,	*A. alternata*

лесной селекционный опытно-показательный питомник», 5 га		Лиственница, Каштан, Пихта	
2012			
с. Теряево, 10 га	5	Дуб, Каштан	-
п. Сенькино - Сикерино КХ"Захарово", 2 га	5	Голубика, Туя, Лиственница	*Fusarium* sp., *A. alternata, C. herbarum, P. funerea, D. ferruginosa, P. vaccinii, F. vagans*.
Питомник "Точка роста", 7 га	7	Каштан, Клен, Шиповник	*A. alternata, Fusarium* sp., *T. acinorum, Phoma* sp.
Филиал ГУП Мосзеленхоз Калининградский СДС, 23 га	15	Сирень	*A. alternata, Fusarium* sp., *H. cladosporioides, Stigmina* sp.
Питомник Внуково, 1 га	18	Ель, Лиственница, почва	*A. alternata, C. herbarum, Phomopsis* sp., *Stigmina* sp., *R. kalkhoffii, V. lateritium*
Ивановская область			
2011			
ООО «Агрофирма Ваш Сад», 1 га	13	Клен, Калина, Жимолость, Сирень, Шиповник, Каштан, Малина, Тис ягодный.	*A. alternata, Verticillium* sp., *Fusarium* sp., *F. oxysporum*
ООО «Центр декоративных культур», 20 га	15	Клен, Калина, Жимолость, Сирень, Шиповник, Каштан, Лиственница, Ель, Лещина, Рододендрон, Черника.	*A. alternata, Verticillium* sp., *Fusarium* sp., *F. oxysporum*
ООО «Питомник декоративных растений», 10 га	22	Клюква, Пихта, Клен, Дуб, Калина, Жимолость, Малина, Сирень, Шиповник, Каштан, Лиственница, Ель, Лещина.	*A. alternata, Verticillium* sp., *Fusarium* sp., *F. oxysporum, F. semitectum, T. roseum, R. pini*
Республика Карелия			
2012			
ФГБОУВПО «Петрозаводский государственный университет» Ботанический сад, 6 га	26	Дуб, Клен, Лиственница, Пихта, Псевдотсуга, Каштан, Рододендрон, Тис, Ель, Сирень, Почва.	*Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *C. herbarum*
Карельский государственный сортоиспытательный участок,	3	Жимолость	*Verticillium* sp.

0,09 га			
ООО «Городской центр по благоустройству и озеленению», 0,139 га	21	Дуб, Клен, Сирень, Ель, Каштан, почва	*Fusarium* sp., *Alternaria* sp.
Ставропольский Край			
2013			
ЗАО с-з «Декоративные культуры», 0,1 га	7	Образцы почвы из под: калины, сирени, клена, ели	*Fusarium* sp., *Verticillium* sp.
ООО Предприятие «Крона», 0,1 га	6	Калина, Сирень, Клен, почва	*Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Pestalotia* sp., *Alternaria* sp.

Как видно из таблицы 8, наибольшее число патогенов было выявлено в питомниках Московской области: 22 вида грибов, обнаруженные в 133 случаях из 200 проб. В Ивановской области было выявлено 7 видов в 57 случаях. В Республике Карелия и Ставропольском Крае на отобранных образцах выявили по 4 вида. Наиболее часто встречающимися видами были возбудитель альтернариоза *A. alternata,* виды рода *Fusarium,* возбудитель сосудистого увядания - *Verticillium* sp. Данные возбудители присутствовали в образцах из всех обследуемых регионов. Пятнистость листьев, вызванная *Pestallotia* sp., также встречалась чаще других патогенов, но только в Московской области.

Таблица 8.

Количество случаев обнаружения видов по регионам.

Регион	Название патогена	Количество случаев обнаружения*
Московская обл.	*Alternaria alternata*	61
	Cladosporium herbarum	6
	Dothichiza ferruginosa	3
	Fumago vagans	2
	Fusarium oxysporum	5
	Fusarium sp.	10
	Hormodendrum cladosporioides	1
	Monochaetia sp.	1
	Nigrospora sp.	1
	Pestalotia funerea	2

	Pestalotia sp. *Phoma sp.* *Phomopsis sp.* *Phyllosticta vaccinii* *Phyllosticta sp.* *Puccinia coronifera* *Rhizosphaera kalkhoffii* *Stigmina sp.* *Triposporium sp.* *Tubercularia acinorum* *Verticillium lateritium* *Verticillium sp.*	10 1 1 1 1 1 2 2 1 1 2 18
Итого:	*22*	133
Ивановская обл.	*Alternaria alternata* *Fusarium oxysporum* *Fusarium semitectum* *Fusarium sp.* *Rhizosphaera pini* *Trichothecium roseum* *Verticillium sp.*	17 10 3 15 1 2 9
Итого:	*7*	57
Республика Карелия	*Alternaria sp* *Cladosporium herbarum* *Fusarium sp.* *Verticillium sp.*	1 1 7 2
Итого:	*4*	11
Ставропольский Край	*Alternaria sp.* *Fusarium sp* *Pestalotia sp.* *Verticillium sp.*	2 3 1 3
Итого:	*4*	9

* – сколько раз (в скольких образцах) патоген был обнаружен

Таким образом, мониторинг питомников показал отсутствие фитофторозных корневых гнилей на обследованных растениях. Возможно, это связано с тем, что все обследованные питомники выращивают свои растения в контейнерах (горшках) с использованием стерильного субстрата и капельного полива. Данный тип агротехники значительно снижает риск заражения фитофторозами.

Микобиота посадочного материала из питомников Московской области отличалась большим разнообразием видов, чем из других регионов. Наиболее часто встречались такие патогены, как *Alternaria alternata*, *Fusarium* sp. и *Verticillium* sp.

3.2. Видовой состав грибов и грибоподобных организмов, выявленных в естественных насаждениях.

Обследования декоративных и кустарниковых культур в естественных насаждениях проводились в 2012-2014 годах. Всего было отобрано 407 образцов (в Ставропольском крае 287 образцов, Республике Дагестан – 50 образцов, Карачаево-Черкесской Республике – 70 образцов) вегетативных частей растений с наиболее характерными признаками: усыхание листвы и ветвей, изменение цвета древесины, с симптомами язвенных повреждений стволов, усыхания и отмирания побегов и некрозами листьев, а также почвы.

В Ставропольском крае были обследованы посадки древесных и кустарниковых культур в пяти районах на площади 9670,3 га. В Республике Дагестан было обследовано 606, 6 га и в Карачаево-Черкесской Республике были обследованы посадки древесных и кустарниковых культур в 2 районах на общей площади 41,22 га.

Лабораторная экспертиза проводилась методами влажных камер, выделения патогена на питательные среды, биоприманок для выделения патогенов из почвы. При появлении спороношения проводили микроскопирование и ПЦР анализ с секвенированием с целью определения патогена до вида.

Таблица 9.

Результаты микологической экспертизы образцов древесных и кустарниковых растений естественных насаждений

Название обследуемого объекта, площадь	Кол-во образцов	Вид растений	Выявленные виды
Ставропольский Край			
2012			
ГУСК «Ессентукский лесхоз», 25,2 га	8	Клен, Калина, Шиповник, Дуб, почва	*Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Verticillium* sp.
ГУСК	12	Клен,	*Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Phomopsis*

«Кисловодский лесхоз», 20,3 га		шиповник, Дуб, почва	*quercella* Died., *Cytospora tumida* Lib., *Epicoccum nigrum* Link
ГУСК «Бештаугорский лесхоз», 5,1 га	5	Сирень, Шиповник, почва	*C. herbarum*, *Alternaria* sp., *Verticillium albo-atrum* P. et B.
ГКУ «Георгиевское лесничество», 7955 га	14	Сирень, шиповник, Каштан, Дуб, почва	*Alternaria* sp., *Bionectria ochroleuca* (Schwein.) Schroers & Samuels, *Botryosphaeria stevensii* Shoemaker, *Fusarium* sp., *F. equiseti*, *Verticillium* sp., *C. herbarum*, *C. tumida*, *Cytospora rosarum* Grev., *E. nigrum*
ГКУ «Георгиевское лесничество», 1350 га	11	Клен, Дуб	*Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *F. armeniacum* (G.A. Forbes, Windels & L.W. Burgess) L.W. Burgess & Summerell, *F. sambucinum* Fuckel, *F. lateritium* Nees, *Verticillium* sp., *C. herbarum*, *Nectria cinnaborina* Fr., *Septomyxa negundinis* All., *Coryneum depressum* Kunze., *P. quercella*
2013			
ГКУ «Буденовский лесхоз», 30 га	32	Дуб, почва	*Alternaria* sp., *Verticillium* sp., *F. solani* (Mart.) Sacc.
с. Сунжа, 0,7 га	25	Дуб, Калина, Сирень, Клен, Шиповник, почва	*Alternaria* sp., *Fusarium* sp.
ГКХ «Георгиевское лесничество», 4 га	30	Клен, Каштан, Дуб, почва	*Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *F. sporotrichioides* Sherb., *Gibberella avenacea* R.J. Cook, *Trichothecium roseum* (Pers.) Link, *Phomopsis* sp., *Ophiostoma piceae* (Münch) Syd. & P. Syd., *P. citricola*
ГКУ «Калаусское лесничество», 10 га	24	Туя, Сирень, Клен, Дуб, почва	*F. tricinctum* (Corda) Sacc., *Gibberella moniliformis* Wineland, *Verticillium* sp., *F. armeniacum*, *Pestalotia* sp., *Alternaria* sp.
Ботанический сад Фармакадемии, г. Пятигорск, 15 га	6	Тис, Каштан, Дуб, Калина, почва	*Alternaria* sp., *Verticillium* sp., *P. citricola*, *P. cactorum*
2014			
гора Машук, г. Пятигорск, 30 га	25	Дуб, ель, клен, сосна, почва	*P. plurivora*, *T. roseum* *Cyclaneusma minus* (Butin) DiCosmo, Peredo & Minter, *Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Dyko & B. Sutton, *Lophodermium pinastri* (Schrad.) Chevall., *Phoma* sp., *Alternaria sp.*, *Verticillium* sp., *Fusarium* sp.
Городской парк, г. Пятигорск, 27,5 га	14	Клен, сосна, почва	*Fusarium* sp., *T. roseum*, *C. minus*
Дубравка, г.	7	Дуб, почва	-

Пятигорск, 20 га			
Городской парк Победы, г. Ессентуки, 18 га	12	Ель, каштан, почва	*Fusarium* sp., *P. pini*
Городской парк Победы, г. Кисловодск, 27,5 га	34	Дуб, каштан, клен, лиственница, ель, сосна, почва	*Fusarium* sp, *P. plurivora*, *Dothichiza ferruginosa* Sacc., *Leptostroma pinastri* Desm., *Diplodia pinea* (Desm.) J. Kickx
ГНУ СБС им. В.В. Скринченко, Шпаковский р-н, 132 га	28	Рододендрон, камелия, калина, каштан, сосна, дуб, сирень	*Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *P. cactorum*, *P. plurivora*
Республика Дагестан			
2012			
Касумкентское лесничество, 202 га	31	Дуб	*Alternaria* sp., *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel, *Fusarium* sp., *Cylindrocarpon* sp., *E. nigrum*, *T. roseum*, *F. acuminatum* Ellis & Everh., *F. sporotrichioides*, *G. moniliformis*, *F. equiseti*, *Microsphaera alphitoides* Griffon & Maubl. (мучнистая роса), *Monochaetia monochaeta* (Desm.) Allesch. (пятнистость).
Хасавюртовский лесхоз, 170 га	10	Дуб	*Alternaria* sp. (альтернариоз), *Verticillium* sp. (вертициллез), *F. equiseti* (Corda) Sacc., *Phoma quercina* (Peck.) Sacc., *T. roseum*, *Microsphaera alphitoides* Griffon&Maubl., *Monochaetia monochaeta* (Desm.) Allesch.
Казбековский лесхоз, 115,6 га	6	Дуб	*Alternaria* sp., *Verticillium* sp., *T. roseum*, *M. alphitoides*
Кизимортовский лесхоз, 119 га	3	Дуб	*F. lateritium*, *Fusarium* sp., *T. roseum*
Карачаево – Черкесская Республика			
2013			
ЧГМУП «Зеленый остров», 40 га	10	Сосна, Лещина, Калина, Сирень, Тополь.	*T. roseum*, *Fusarium* sp.
Ермоловка, 0,7 га	10	Калина, Каштан, Сирень, Пихта.	*Alternaria* sp., *Fusarium* sp.
Юго-Восточная окраина Даусузского СП, 0,1 га	10	Азалия.	*Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *F. equiseti*, *Verticillium* sp., *Phoma glomerata* (Corda) Wollenw. & Hochapfel. *Phomopsis* sp.
Ермоловское лесничество, 0,42 га	40	Бук, Лещина, Ольха, Азалия, Калина, Клен, Ясень.	*Botrytis cinerea* Pers., *Fusarium* sp., *Gibberella pulicaris* (Fr.) Sacc., *Verticillium*. sp., *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm.) Scholten

Как видно из таблицы 9, из некарантинных патогенов в Ставропольском крае в 2012 году были выявлены: *Alternaria alternata* (альтернариоз), *Bionectria ochroleuca*, *Botryosphaeria stevensii*, *Coryneum depressum* (засыхание ветвей), *Cylindrocarpon* sp. (гниль), *Cytospora tumida* (цитоспороз), *Cytospora rosarum* (цитоспороз), *Epicoccum nigrum*, *Microsphaera alphitoides* (мучнистая роса), *Nectria cinnaborina* (отмирание побегов), *Phoma quercina* (фомоз), *Phomopsis quercella* (диапортовый микоз), *Septomyxa negundinis* (засыхание ветвей), *Verticillium albo-atrum*, *Fusarium* sp. (фузариоз), *F. armeniacum*, *F. equiseti*, *F. lateritium*, *F. sambucinum*.

В 2013 году из образцов почвы, отобранных в Кировском районе Ставропольского края в лесонасаждениях дуба, была выделена *P. citricola* методом биоприманок. На образцах древесины этого дерева во влажной камере наблюдалось образование перитециев *Ophiostoma piceae*. В почве, отобранной в прикорневой зоне каштана в Ботаническом саду г. Пятигорска, была обнаружена *P. cactorum*, а в почве, отобранной около тиса и дуба, была выявлена *P. citricola* (таблица 9). Все деревья, в прикорневой зоне которых отбирались образцы почвы, были с характерными симптомами фитофтороза (рисунок 9). Оомицет *P. cactorum* в комплексе с другими видами является причиной чернильной болезни каштана, которая получила широкое распространение в ряде стран Европы. *P. citricola* поражает широкий круг растений хозяев, в том числе и древесных. Она была выявлена в Испании, Италии и Греции (Vettraino, 2005).

Рисунок 9. Некротизация древесины дуба.

Из некарантинных заболеваний в образцах, отобранных в Ставропольском крае, выявлены: *Alternaria sp*. (альтернариоз), *Verticillium* sp. (увядание). *F. solani* (фузариоз) *F. tricinctum* (фузариоз), *F. sporotrichioides* (фузариоз), *Gibberella avenacea*, *Trichothecium roseum* (гниль), *Phomopsis* sp. (рак), *Ophiostoma piceae* (сосудистый микоз дуба), *Gibberella moniliformis* (фузариоз), *F. oxysporum* (фузариоз), *F. armeniacum* (фузариоз), *Pestalotia sp.* (некроз).

В 2014 году мы проводили обследования в других районах Ставропольского края. При обследовании лесного массива на горе Машук г. Пятигорск в образцах почвы, отобранных от дуба и клена, была обнаружена *P. plurivora* T. Jung & T.I. Burgess. В городском парке г. Кисловодск в образцах почвы, отобранных от каштана и клена, также была выявлена *P. plurivora* (таблица 10). Данный патоген был выявлен в естественных лесах Европы и на различных растениях в разных частях мира. Древесные растения–хозяева включают такие виды, как *Abies alba* (пихта белая), *Alnus glutinosa* (ольха черная), *Alnus incana* (ольха серая), *Acer platanoides* (клён остролистный), *Acer pseudoplatanus* (клен белый), *Acer saccharum* (клен сахарный) , *Aesculus hippocastanum* (конский каштан), *Carpinus betulus* (граб обыкновенный), *Fagus sylvatica* (бук европейский), *Fraxinus excelsior* (ясень обыкновенный), *Quercus robur* (дуб черешчатый), *Quercus petraea* (дуб скальный), *Quercus rubra* (дуб красный), *Rhododendron* spp. (рододендрон) ,

Syringa vulgaris (сирень обыкновенная), *Tilia* spp. (липа), *Tsuga canadensis* (тсуга канадская) (Jung и Burgess, 2009). Патоген был выделен из корней почвы, базальных и стволовых язв. На основе уникальных комбинаций морфологических и физиологических характеристик, и с помощью мультигенной филогении, было выяснено, что *P. plurivora* входит в состав *P. citricola* комплекс вместе с *P. multivora, P. pini, P. capensis, P. citricola*. Описание морфологических и физиологических характеристик, разграничающих *P. plurivora* от *P. citricola,* представлены в работе в Бюргеса и Янга (2009). Это соотношение длины и ширины спорангиев *P. plurivora*, различия морфологических структур, характер роста колоний на КГА, и более высокий уровень роста *P. plurivora* на КГА при 20°С и на V8 при 20-30°С. *P. plurivora* явно отличается от *P. multivora* и морфологическими и физиологическими характеристиками.

В городском парке г. Ессентуки основными породами являлись ель и каштан, произрастающие рядом. Большинство деревьев были с симптомами усыхания (ель) и мокрыми язвами на стволе древа (каштан). В образцах почвы от таких деревьев в результате лабораторной экспертизы была выявлена *Phytophthora pini* (таблица 10).

P. pini изначально была отмечена в 1925 году на образце из красной сосны (*Pinus resinosa*) в Миннесоте, но официального описания не было сделано. Затем этот вид был описан как *P. citricola* ввиду схожих морфологических признаков. Последние работы подтвердили различные филогенетические ветви в *P. citricola* комплексе видов, и *P. pini* был воскрешен как вид (Hong et al. 2011). *P. pini* была выявлена в Северной Америке и Европе в качестве возбудителя на растениях из семи родов. Этот вид также может атаковать множество других декоративных и овощных растений (Hong et al., 2008) и бук в Европе (Jung et al., 2009). Вполне вероятно, что многие изоляты, идентифицированные как *P. citricola* в крупных коллекциях культур, в действительности являются *P. pini* или *P. plurivora*. Точно так же многие виды растений, в настоящее время

перечисленные в качестве хозяев для *P. citricola* могут быть хозяевами для *P. pini*. Необходимо провести большую работу, чтобы выяснить диапазон растений хозяев для *P. pini* и других видов из комплекса *P. citricola*.

В ботаническом саду г. Ставрополь произрастает более 30 сортов сирени. Некоторые растения были усыхающими, с отслаиванием коры и стволовыми язвами. В образцах почвы, отобранных от таких растений, были найдены *Phytophthora cactorum и P. plurivora* (таблица 10).

Таблица 10.

Виды *Phytophthora* и количество случаев их обнаружения в результате лабораторной экспертизы образцов древесных и кустарниковых культур в естественных насаждениях

Регион России	Вид растений	Количество обследованных насаждений, площадь	Количество образцов	Выявленные виды, количество случаев обнаружения*
Ставропольский край	Клен, Калина, Шиповник, Дуб, Сирень, Тис, Каштан Клен, почва	10 9415,3 га	167	*P. citricola – 3* *P. cactorum - 1*
Ставропольский край	Дуб, Каштан, клен, ель, сирень	6 255 га	120	*P. cactorum – 1* *P. plurivora* – 8 *P. pini* - 2
Республика Дагестан	Дуб	4 606,6 га	50	-
Карачаево – Черкесская Республика	Калина, Сирень, Каштан, Пихта, Азалия, Клен, Бук, Ольха	4 41.22 га	70	-
Итого:	**12 видов растений**	**24** **1258 га**	**407**	***P. citricola – 3*** ***P. cactorum – 2*** ***P. plurivora* – 8** ***P. pini* - 2**

* – сколько раз (в скольких образцах) патоген был обнаружен

Кроме оомицетов на образцах отобранных растений были найдены такие виды грибов, как: *Dothichiza ferruginosa* (склерофомоз сосны), *Leptostroma pinastri* (шютте), *Diplodia pinea* (усыхание ветвей сосны),

Trichothecium roseum (гниль), *Cyclaneusma minus* (шютте), *Sphaeropsis sapinea* (усыхание ветвей сосны), *Lophodermium pinastri* (шютте), *Fusarium* sp. (фузариоз), *Verticillium* sp. (вертициллез), *Alternaria* sp. (альтернариоз) (таблица 9).

В Республике Дагестан были обнаружены: *Alternaria alternata* (альтернариоз), *Botryotinia fuckeliana*, *Cylindrocarpon* sp. (гниль), *Epicoccum nigrum, F. acuminatum, F. lateritium, F. sporotrichioides, F. equiseti* (фузариоз), *Gibberella moniliformis, Microsphaera alphitoides* (мучнистая роса), *Monochaetia monochaeta* (пятнистость), *Phoma quercina* (фомоз), *Trichothecium roseum* (гниль), *Verticillium* sp. (вертициллез) (таблица 9).

В Карачаево – Черкесской Республике были обнаружены: *Alternaria* sp. (альтернариоз), *Fusarium* sp. (фузариоз), *Trichothecium roseum* (гниль), *Phomopsis* sp. (фомопсис), *Verticillium* sp. (вертициллез), *Botrytis cinerea* (серая гниль), *Cylindrocarpon destructans* (гниль), *F. equiseti* (фузариоз), *Gibberella pulicaris* (фузариоз), *Phoma glomerata* (ожог веточек) (таблица 9).

Таблица 11.

Количество случаев обнаружения видов по регионам.

Регион	Название патогена	Количество случаев обнаружения*
Ставропольский край	*Alternaria sp.*	33
	Bionectria ochroleuca	2
	Botryosphaeria stevensii	2
	Cladosporium herbarum	4
	Coryneum depressum	2
	Cyclaneusma minus	2
	Cytospora rosarum	1
	Cytospora tumida	3
	Diplodia pinea	1
	Dothichiza ferruginosa	2
	Epicoccum nigrum	2
	Fusarium sp.	25
	Fusarium armeniacum	3
	Fusarium equiseti	2
	Fusarium lateritium	4
	F. sambucinum	3
	Fusarium solani	1
	Fusarium sporotrichioides	1
	Fusarium tricinctum	1
	Gibberella avenacea	1

	Gibberella moniliformis	1
	Lophodermium pinastri	4
	Nectria cinnaborina	2
	Ophiostoma piceae	1
	Pestalotia sp.	2
	Phoma sp.	1
	Phomopsis quercella	3
	Phomopsis sp	2
	Phytophthora cactorum	2
	Phytophthora citricola	3
	Phytophthora pini	2
	Phytophthora plurivora	8
	Septomyxa negundinis	2
	Sphaeropsis sapinea (	3
	Trichothecium roseum	3
	Verticillium albo-atrum	1
	Verticillium sp	10
Итого:	*37*	145
Республика Дагестан	*Alternaria sp.*	10
	Botryotinia fuckeliana	1
	Cylindrocarpon sp.	1
	Epicoccum nigrum	2
	Fusarium sp.	6
	Fusarium acuminatum	1
	Fusarium equiseti	2
	Fusarium lateritium	1
	Fusarium sporotrichioides	3
	Gibberella moniliformis	1
	Microsphaera alphitoides	10
	Monochaetia monochaeta	10
	Trichothecium roseum	10
	Phoma quercina	2
	Verticillium sp.	5
Итого:	*15*	55
Карачаево-Черкесская Республика	*Alternaria* sp.	8
	Botrytis cinerea	2
	Cylindrocarpon destructans	2
	Fusarium equiseti	1
	Fusarium sp.	5
	Gibberella pulicaris	1
	Phoma glomerata	1
	Phomopsis sp.	1
	Trichothecium roseum	2
	Verticillium sp.	6
Итого:	*10*	29

* – сколько раз (в скольких образцах) патоген был обнаружен

Из данных таблицы 11 видно, что микобиота естественных насаждений Ставропольского края отличалась большим разнообразием видов, по сравнению с другими регионами. Преобладающими видами были фузариозы (*Fusarium* sp.), альтернариоз (*Alternaria* sp.) и сосудистое увядание (*Verticillium* sp.). Кроме данных патогенов из образцов

вегетативных частей растений были выделены штаммы видов, которые приводят к стволовым гнилям, раковым образованиям (*Botryosphaeria stevensii, Cytospora tumida* Lib. и др.), сосудистым увяданиям (*Ophiostoma piceae* (Münch) Syd. & P. Syd) и, как следствие, к гибели деревьев. Данные симптомы похожи на повреждения, вызываемые фитофторами, и могут затруднять отбор образцов при обследовании.

Так, например, *Nectria cinnaborina* вызывает нектриевое отмирание. Это заболевание встречается на многих видах растений, в том числе ясене, березе, самшите, вязе, липе, клене. *N. cinnaborina* обычно растет как сапрофит на мертвой древесине, но если растение ранено или ослаблено, то гриб становится слабым паразитом, образуя язвы и вызывая отмирание побегов и ветвей. Клены особенно страдают от этого заболевания, как и городские декоративные растения и кустарники.

В результате мониторинга питомников и естественных насаждений было отобрано и проанализировано 720 образцов вегетативных частей растений и почвы. В питомниках фитофторозов выявлено не было. Возможно, это связано с особенностями агротехники выращивания посадочного материала. Большинство обследованных растений выращивались в контейнерах в специальном субстрате. В естественных насаждениях было выделено и идентифицировано 4 вида *Phytophthora*. Из почвы, отобранной в ботаническом саду г. Пятигорска были выделены в чистую культуру *P. cactorum* и *P. citricola. P. plurivora* была обнаружена в образцах почвы из лесного массива на горе Машук и из городского парка г. Кисловодск. *P. pini* была выявлена в почве из городского парка г. Ессентуки. В ботаническом саду г. Ставрополь в образцах почвы, отобранных от сирени, были найдены *P. cactorum, P. plurivora*. Всего в питомниках было идентифицировано 24 вида грибов в 133 случаях, а в естественных насаждениях 47 видов в 239 случаях.

Как показывают данные, обследование естественных насаждений дает более достоверную информацию о видовом составе фитофтор, нежели

питомников. Поэтому дальнейшую работу по изучению видового состава оомицетов рода *Phytophthora* на территории Российской Федерации следует проводить в лесных массивах, парках, городских лесонасаждениях.

ГЛАВА IV. РАЗРАБОТКА И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ФИТОФТОРОЗОВ ДРЕВЕСНЫХ И КУСТАРНИКОВЫХ РАСТЕНИЙ

4.1. Изучение морфологических характеристик *P. ramorum, P. cactorum, P. cinnamomi, P. cryptogea, P. syringae* на различных питательных средах

Анализ литературных данных о возбудителях рода *Phytophthora* показал, что наиболее распространенными и вредоносными патогенами, поражающими древесные и кустарниковые культуры в России, являются следующие виды: *P. cactorum, P. cinnamomi, P. syringae* (Жуков, 2013).

При культивировании отобранных культур рода *Phytophthora* было выявлено, что наилучшими для роста всех патогенов являлись естественные среды: (морковная CPA и овсяно-глюкозная). На 7-е сутки размер колоний на этих средах в среднем составлял 35-80 мм, причем *P. cactorum, P. cinnamomi* и *P. cryptogea* имели более высокую скорость роста по сравнению с изолятами *P. ramorum* или *P. syringae* (таблица 12). Слабый рост мицелия отмечен на синтетической и полусинтетической средах (SNA и V8) практически у всех изученных видов грибов, за исключением *P. cryptogea*.

Изучение культуральных признаков изолятов *P. ramorum* показало, что по характеру роста (фенотипу) на различных средах они отличались от других видов р. *Phytophthora*. Колонии *P. ramorum* были белого цвета, хорошо заметные, с неровными краями. При выращивании гриба на морковной и овсяно-глюкозной средах мицелий разрастался характерными концентрическими кольцами. Воздушный мицелий паутинистый,

прижатый, редкий, коралловидный, белого цвета. На морковной и овсяно-глюкозной средах на 3-и и 7-е сутки диаметр колоний в среднем составлял 10-20 мм и 35-45 мм соответственно (таблица 12).

Обильное спороношение (зооспорангии) формировалось у *P. ramorum* и *P. cactorum* и умеренное – у *P. cinnamomi* только на естественных средах. Многочисленные зооспорангии *P. ramorum* по форме от эллипсоидальных до веретеновидных или продолговато-овальных, образовывались поодиночке или гроздьями на спорангиеносцах, размером: 20-32 х 40-80 мм. Они быстро опадающие, обычно с короткой ножкой и небольшим сосочком (папиллой). Хламидоспоры тонкостенные, прозрачные или светло-коричневые, до 88 мкм в диаметре (таблица 13).

Спорангии *P. cactorum* были овальной или лимоновидной, обратно грушевидной формы, редко несимметричной, размером 20-55 х 17-46 мкм. Ооспоры шаровидные, 20-30 мкм в диаметре, бесцветные и желтоватые с оболочкой 1-2 мкм толщиной. Хламидоспоры образовывались в большом количестве, шаровидные бесцветные или желтоватые, 19-53 в диаметре (таблица 13).

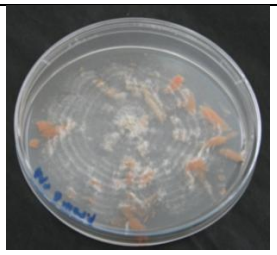
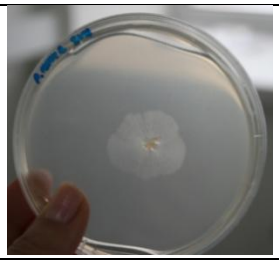
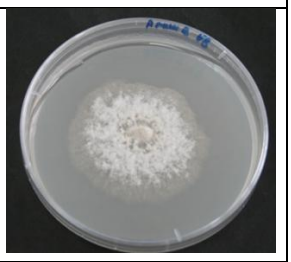
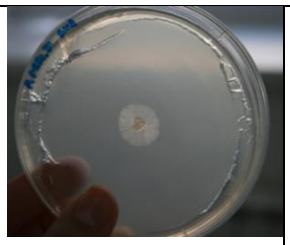
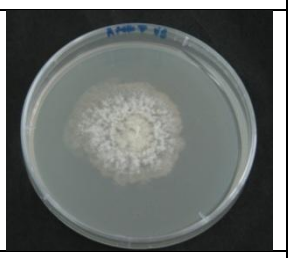
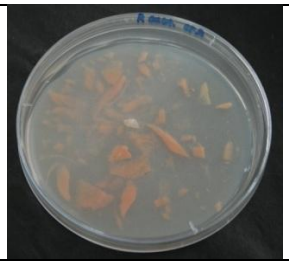
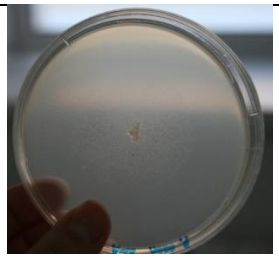
Зооспорангии *P. cinnamomi* имели овально-удлиненную или эллипсоидальную, обратно грушевидную, лимоновидную форму, тонкостенные, 38-84 х 27-39 мкм, бесцветные или светло-желтые, с уплощенной вершиной и малозаметным сосочком, без ножки. Ооспоры шаровидные 25,7-27,2 мкм в диаметре (таблица 13).

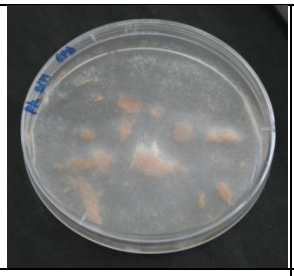
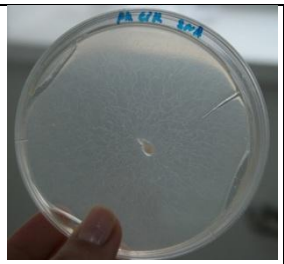
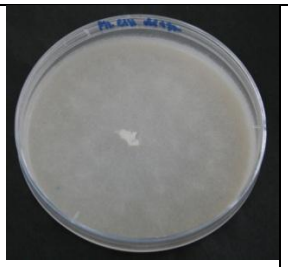
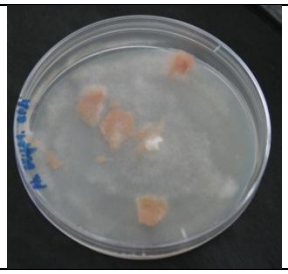
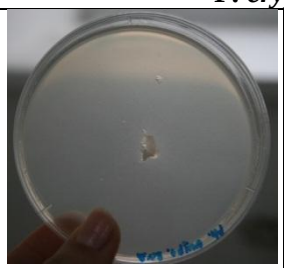
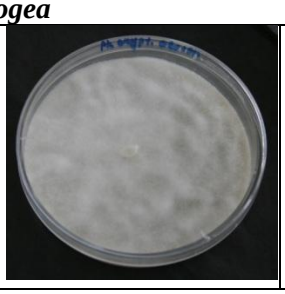
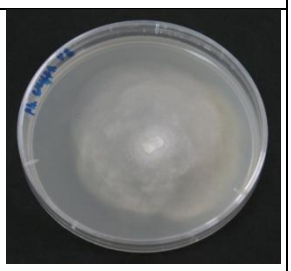
На синтетической и полусинтетической средах (SNA и V8) у всех изученных видов грибов спороношения не отмечали.

Культурально-морфологические признаки выросших культур *P. ramorum, P. cactorum, P. cinnamomi* (размер, форма зооспорангиев и пр.) совпадают с данными, представленными в определительной литературе. В то же время у *P. cryptogea* ни на одной из селективных сред не было выявлено образования морфологических структур.

Таблица 12.

Культуральные признаки видов р. *Phytophthora*.

***P. ramorum* В**			
			
CPA Колонии белого цвета, хорошо заметные, с не ровными краями, концентричность. Мицелий прижатый, коралловидный, белого цвета. d=35 мм на 7-е сутки. Обильное спороношение.	**SNA** Колонии прозрачные, плохо заметные. Рост слабый d= 10 мм на 7-е сутки	**Овсяно-глюкозный агар** Колонии белого цвета, хорошо заметные, с не ровными краями, концентричность. Мицелий рыхлый, коралловидный, белого цвета. d=40 мм на 7-е сутки. Обильное спороношение.	**V8** Колонии белого цвета войлочные. Рост слабый d=20 мм на 7-е сутки. Мицелий беловатый. Концентричность слабая.
***P. ramorum* Ф**			
			
CPA Колонии беловатого цвета, хорошо заметные, с не ровными краями, концентричность. Мицелий прижатый, коралловидный, белого цвета. d=42 мм на 7-е сутки. Обильное спороношение.	**SNA** Колонии прозрачные, плохо заметные. Рост слабый d= 11 мм на 7-е сутки. Мицелий коралловидный	**Овсяно-глюкозный агар** Колонии белого цвета, хорошо заметные, с не ровными краями, концентричность. Мицелий рыхлый, коралловидный, белого цвета. d=45 мм на 7-е сутки. Обильное спороношение.	**V8** Колонии белого цвета войлочные. Рост слабый d=25 мм на 7-е сутки. Мицелий беловатый. Концентричность слабая.
P. cactorum			
			

CPA Колонии беловатого цвета, хорошо заметные. Мицелий прижатый, стелящийся, белого цвета. d=70 мм на 7-е сутки. Спороношение присутствует.	**SNA** Колонии прозрачные, плохо заметные. d= 35 мм на 7-е сутки.	**Овсяно-глюкозный агар** Колонии прозрачно-белого цвета, хорошо заметные, с не ровными краями. Мицелий прозрачный прижатый d=45 мм на 7-е сутки. Обильное спороношение.	**V8** Колонии белого цвета с не ровными краями. Рост слабый d=20 мм на 7-е сутки. Мицелий беловатый, стелящийся.
P. cinnamomi			
			
CPA Колонии беловатого цвета полупрозрачные, хорошо заметные с не ровными краями. Мицелий приподнимающийся, пушистый тонкий, бесцветный. d=80 мм на 7-е сутки. Спороношение присутствует.	**SNA** Колонии прозрачные, плохо заметные. d= 55 мм на 7-е сутки. Мицелий тонкий бесцветный паутинистый	**Овсяно-глюкозный агар** Колонии беловатого цвета полупрозрачные, хорошо заметные с не ровными краями. Мицелий приподнимающийс, пушистый тонкий, бесцветный. d=70 мм на 7-е сутки. Спороношение присутствует.	**V8** Колонии белого цвета с не ровными краями. Рост слабый d=20 мм на 7-е сутки. Мицелий беловатый, приподнимающийся в центре колонии.
P. cryptogea			
			

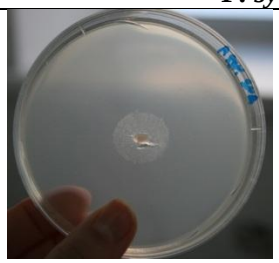
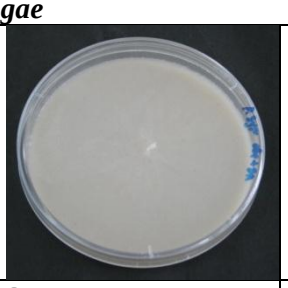
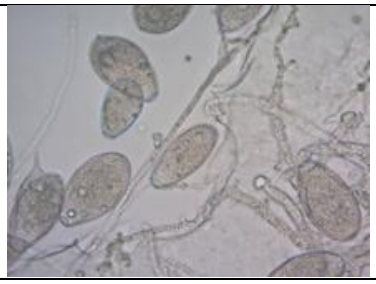
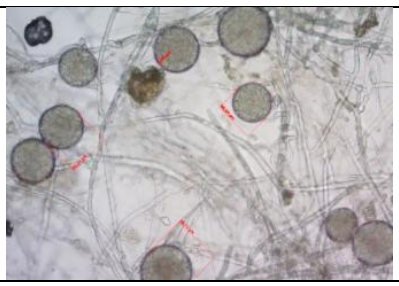
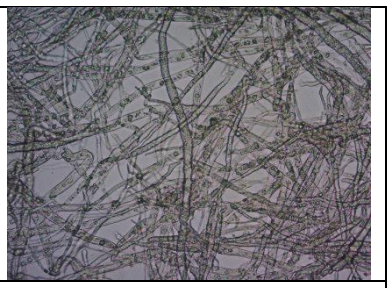
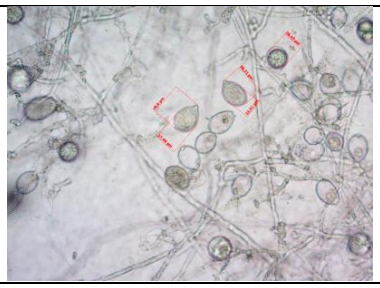
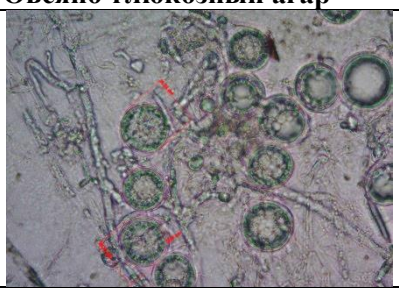
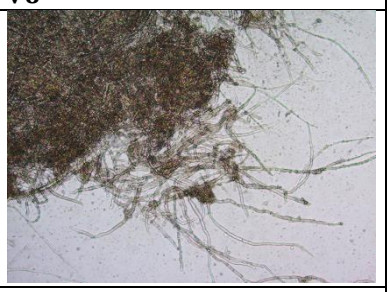
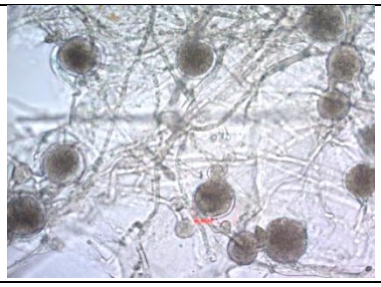
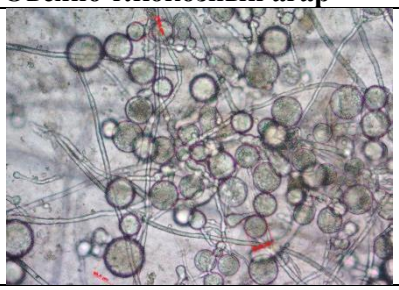
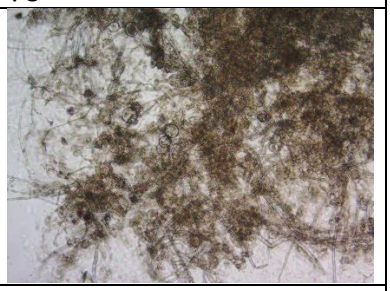
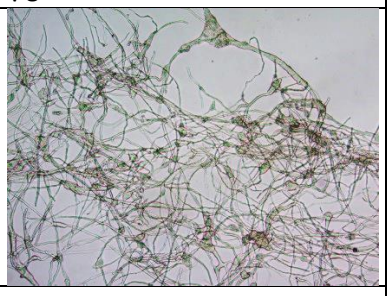
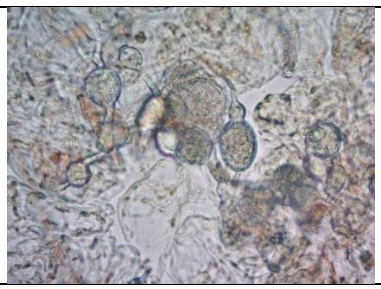
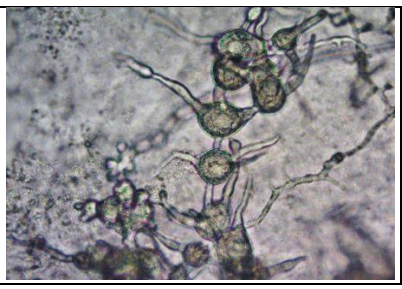
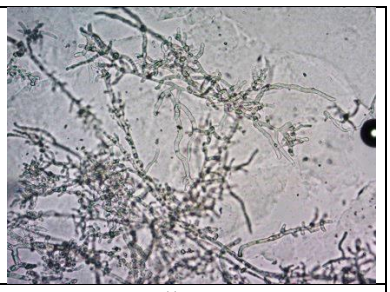
CPA Колонии беловатого цвета полупрозрачные, хорошо заметные с не ровными краями. Мицелий приподнимающийся в центре, тонкий, бесцветный. d=80 мм на 7-е сутки. Легкая концентричность.	**SNA** Колонии прозрачные, плохо заметные. d= 85 мм на 7-е сутки. Мицелий тонкий бесцветный паутинистый.	**Овсяно-глюкозный агар** Колонии беловатого цвета, хорошо заметные. Мицелий шерстистый, плотный бесцветный. d=70 мм на 7-е сутки.	**V8** Колонии белого цвета хорошо заметные, не однородные. d=45 мм на 7-е сутки. Мицелий беловатый, приподнимающийся в центре колонии, шерстистый.
P. syringae			
			
CPA Колонии беловатого цвета полупрозрачные, бархатистые, хорошо заметные с не ровными краями. Мицелий приподнимающийся в центре. d=45 мм на 7-е сутки.	**SNA** Колонии прозрачные, плохо заметные. d= 11 мм на 7-е сутки.	**Овсяно-глюкозный агар** Колонии бесцветные. Мицелий приподнимающийся, слабый. d=38 мм на 7-е сутки.	**V8** Колонии белого цвета хорошо заметные, плотные, с не ровными краями. d=15 мм на 7-е сутки. Мицелий беловатый, приподнимающийся, рыхлый.

Таблица 13.

Морфологические признаки видов р. *Phytophthora*

***P. ramorum* B**		
CPA	**Овсяно-глюкозный агар**	**V8**
		
Зооспорангии эллипсоидные, или продолговато-овальные, одиночные или пучками; опадающие, с коротким или отсутствующим стебельком. Размер: 20-32 х 40-80 мм, в среднем 24 х 52 мм. Мицелий коралловидный, гифальные вздутия отсутствуют.		
P. ramorum		
CPA	**Овсяно-глюкозный агар**	**V8**

		
Зооспорангии эллипсоидные, или продолговато-овальные, одиночные или пучками; опадающие, с коротким или отсутствующим стебельком. Размер: 20-32 х 40-80 мм, в среднем 24 х 52 мм. Хламидоспоры тонкостенные, прозрачные или светло-коричневые, до 88 мкм в диаметре.		
P. cactorum		
CPA	**Овсяно-глюкозный агар**	**V8**
		
Зооспорангии овальные, лимоновидные, обратно-грушевидные, иногда несимметричные. 20-55 х 17-46 мкм. Ооспоры шаровидные, 20-30 мкм в диаметре, бесцветные и желтоватые с оболочкой 1-2 мкм толщиной. Мицелий состоит из длинных ветвящихся гиф, которые имеют вздутия в местах ответвлений, 4-7 мкм толщиной.		
P. cinnamomi		
CPA	**Овсяно-глюкозный агар**	**V8**
		
Образование зооспорангий не наблюдалось. Ооспоры шаровидные 25,7-27,2 мкм в диаметре. Наблюдалось обильное образование хламидоспор.		
P. cryptogea		
CPA	**Овсяно-глюкозный агар**	**V8**
		
Спороношение отсутствовало. Мицелий разветвленный, 4-7 мкм в диаметре, гифы с вздутиями различной формы.		
P. syringae		
CPA	**Овсяно-глюкозный агар**	**V8**

		
Мицелий до 8 мкм толщиной. Гифы заполнены зернистой протоплазмой, изогнутые с узловатыми разветвлениями иногда с утолщениями. Зооспорангии не одинаковые по форме и размерам, яйцевидные, эллипсоидальные, обратно грушевидные, с уплощенной вершиной 24-47 х 19-42 мкм.		

В результате проведенных исследований выявлено, что наилучшими средами для роста различных видов р. *Phytophthora* являлись естественные среды (морковная и овсяно-глюкозная), в то время как на синтетической и полусинтетической средах (SNA и V8) отмечен более слабый рост мицелия практически у всех изученных видов грибов, кроме *P. cryptogea*.

Культурально-морфологические признаки *P. ramorum, P. cactorum, P. cinnamomi* (размер, форма зооспорангиев и пр.) совпадали с данными, представленными в определительной литературе. В то же время у *P. cryptogea* и *P. syringae* ни на одной из селективных сред не было выявлено образования морфологических структур.

Культурально-морфологические признаки изолятов *P. ramorum* (характер роста) на различных средах отличались от других видов р. *Phytophthora*, поэтому их целесообразно использовать для диагностических целей.

4.2. Оптимизация методов выделения ДНК из зараженной растительной ткани.

Для работы была использована культура *P. ramorum*, полученная из коллекции грибов Финляндского агентства продовольственной безопасности.

Для отработки методов выделения ДНК было проведено искусственное заражение листьев сирени суспензией культуры *P. ramorum* концентрацией 7 х 10^5 пропагул в 1 мл.

В результате искусственного заражения листьев сирени культурой *P. ramorum* на третьи сутки наблюдали появление коричнево-черных пятен (некрозов) в основании черешка листа. Позже пятна размером 1-3 см образовались на других частях листовой пластины (рисунок 10). Эти симптомы являются характерными при проявлении заболевания. Данные некрозы использовали для определения оптимального метода выделения ДНК.

Рисунок 10 . Некротизированные листья сирени.

Для выделения ДНК отбирали участки полностью некротизированной ткани и на границе здорового и пораженного участка.

Выделение ДНК проводилось следующими методами: набором «Проба ГС» (ООО «Агро Диагностика»); по методике Doyle J.J., Doyle J.L., 1990; с использованием фосфатно-солевого буфера Дулбеско (DPBS Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline); с помощью станции выделения нуклеиновых кислот Tecan Freedom EVO с использованием набора на основе магнитных частиц "М-Сорб-Туб" (ЗАО «Синтол»). В половине повторностей проводили дополнительную очистку ДНК поливинилполипирролидоном (PVPP).

Затем проводили классическую ПЦР с двумя видами праймеров (1 - Phyto1/Phyto4; 2 - PramF1/PramR1) и ПЦР в реальном времени с тремя вариантами праймеров и зондов (3 - Pram114-FC/Pram1527-190R, Pram1527-134T; 4 - Pram5/Pram6, Pram7; 5 - PramF/PramR, PramP). Результат выделения ДНК оценивали по положительному результату для

классического ПЦР и по среднему значению Ct (пороговый цикл) для ПЦР «в реальном времени», полученному из пяти повторностей.

Полученные результаты представлены в таблицах 14-17.

Из данных таблицы 14 видно, что наиболее оптимальными методами выделения ДНК для классической ПЦР являются метод Doyle и метод выделения ДНК на основе магнитных частиц (Tecan), так как только в этих случаях наблюдался положительный результат.

Для постановки ПЦР «в реальном времени» подходят способы выделения ДНК с использованием набора Проба ГС, по методике Doyle и набором на основе магнитных частиц (Tecan). Значение Ct в этих случаях значительно ниже (от 21 цикла с праймерами и зондом Pram 5/Pram 6, Pram 7 до 31 цикла с Pram F/Pram R, Pram P), а значит, количество ДНК в реакции больше. Выделение ДНК из пораженных фитофторозом листьев с применением DPBS оказалось непригодным для поставленной задачи.

Таблица 14

Сравнение разных способов выделения ДНК

Вариант	**Классический ПЦР**		**ПЦР в реальном времени, Ct**		
	1	*2*	*3*	*4*	*5*
Проба ГС	-	-	24	21	29
Doyle	+	+	24	22	30
DPBS	-	-	31	28	N/A
Tecan	+	+	25	21	31

+ наличие продукта амплификации (положительный результат)
- отсутствие продукта амплификации (отрицательный результат)
N/A– отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат).
цифры – значения Ct (значение порогового цикла)
1 - классическая ПЦР с праймерами Phyto1/Phyto4
2 - классическая ПЦР с праймерами PramF1/PramR1
3 - ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом Pram114-FC/Pram1527-190R, Pram1527-134T
4 - ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом Pram5/Pram6, Pram7
5 - ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом - PramF/PramR, PramP

Сравнение очищенной PVPP и неочищенной ДНК показало, что очистку ДНК следует проводить только при постановке классической ПЦР и в случае выделения ДНК набором проба ГС. Так как, при выделении по методике Доуля (Doyle, 1990) или набором на основе магнитных частиц даже неочищенная ДНК дает положительный результат. Для проведения ПЦР в реальном времени дополнительная очистка нецелесообразна, так как

в процессе очистки теряется некоторое количество ДНК, о чем свидетельствует увеличение значения Ct (таблица 15).

Таблица 15

Использование неочищенной ДНК и ДНК, очищенной PVPP

Вариант	Проба ГС					Doyle					DPBS					Tecan				
	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
Не очищ. ДНК	-	-	24	21	29	+	+	24	22	30	-	-	31	28	N/A	+	+	25	21	31
Очищ. PVPP	+	+	33	22	30	+	+	27	27	31	-	-	28	23	33	+	+	26	21	32

+ наличие продукта амплификации (положительный результат)
- отсутствие продукта амплификации (отрицательный результат)
N/A– отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат).
цифры – значения Ct (значение порогового цикла)
1 - классическая ПЦР с праймерами Phyto1/Phyto4
2 - классическая ПЦР с праймерами PramF1/PramR1
3 - ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом Pram114-FC/Pram1527-190R, Pram1527-134T
4 - ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом Pram5/Pram6, Pram7
5 - ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом - PramF/PramR, PramP

Для определения оптимального места в приманке, которое следует использовать для выделения ДНК, из пораженных листьев вырезали кусочки размером 3 х 7 мм из двух зон: на границе пораженной и здоровой тканей и из полностью некротизированной части. Результаты эксперимента представлены в таблица 16.

Таблица 16

Влияние места отбора образца в зараженной биоприманке на достоверность диагностики *Phytophthora ramorum* методом ПЦР «в реальном времени»

	Проба ГС					Doyle					DPBS					Tecan				
	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
ГР	-	-	24	21	29	+	+	24	22	30	-	-	31	28	N/A	+	+	25	21	31
Н	-	-	26	25	29	-	-	28	27	N/A	-	-	N/A	N/A	N/A	+	+	27	21	31

+ наличие продукта амплификации (положительный результат)
- отсутствие продукта амплификации (отрицательный результат)
N/A– отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат).
цифры – значения Ct (значение порогового цикла)
1 - классическая ПЦР с праймерами Phyto1/Phyto4
2 - классическая ПЦР с праймерами PramF1/PramR1
3 - ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом Pram114-FC/Pram1527-190R, Pram1527-134T
4 - ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом Pram5/Pram6, Pram7
5 - ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом - PramF/PramR, PramP

По данным таблицы 16 можно сделать вывод, что наиболее оптимальной является зона между здоровой и пораженной тканью, так как в этом варианте мы видим положительный результат в классическом ПЦР и более низкие значения Ct. В случае выделения ДНК на роботизированной станции Tecan с использованием набора «М-Сорб Туб» на основе магнитных частиц, можно использовать как границу между здоровой и пораженной тканями, так и полностью некротизированную часть в случае, если нет возможности отобрать образец на границе поражения.

При выделении ДНК из некротизированной ткани следует проводить очистку ДНК PVPP, особенно при постановке классической ПЦР (таблица 17).

Таблица 17

Использование неочищенной ДНК и ДНК, очищенной PVPP, выделенной из некроза

Вариант	**Проба ГС**					**Doyle**					**DPBS**					**Tecan**				
	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*	*1*	*2*	*3*	*4*	*5*
Без PVPP	-	-	26	25	29	-	-	28	27	N/A	-	-	N/A	N/A	N/A	+	+	27	21	31
С PVPP	+	+	26	23	29	+	+	28	26	33	-	-	N/A	N/A	N/A	+	+	25	21	31

+ наличие продукта амплификации (положительный результат)
- отсутствие продукта амплификации (отрицательный результат)
N/A– отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат).
цифры – значения Ct (значение порогового цикла)
1 - классическая ПЦР с праймерами Phyto1/Phyto4
2 - классическая ПЦР с праймерами PramF1/PramR1
3 - ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом Pram114-FC/Pram1527-190R, Pram1527-134T
4 - ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом Pram5/Pram6, Pram7
5 - ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом - PramF/PramR, PramP

Наилучшими методами для выделения ДНК из растительной ткани являлись: метод Doyle и метод выделения на основе магнитных частиц.

Очистка ДНК с помощью поливинилполипирролидона (PVPP) необязательна для ПЦР в реальном времени, но необходима для проведения классической ПЦР.

Наиболее оптимальным местом в образце растительной ткани для выделения ДНК являлась зона между здоровой и некротизированной

тканями. В случае отсутствия таковой может использоваться некроз, но в этом случаем следует очистить ДНК PVPP.

4.3. Комбинирование методов биоприманок и ПЦР «в реальном времени» для выявления видов рода *Phytophthora.*

Выявления возбудителей фитофторозов древесных и кустарниковых растений проводили путем закладки биоприманок в водоемы Московской и г. Пятигорска (рисунок 11).

Для определения наиболее подходящих растений в качестве приманок использовали листья рододендрона, калины и сирени.

Рисунок 11. Биоприманки с листьями рододендрона.

Через 3-7 суток нахождения в воде на листьях рододендрона появлялись некрозы, что свидетельствовало о заражении приманки грибом или оомицетом (рисунок 12). На листьях других растений некрозов не наблюдалось.

Рисунок 12. Некрозы на листьях рододендрона.

После инкубирования кусочков приманки на селективной питательной среде с антибиотиками (PARPH) вокруг кусочков ткани появлялся мицелий белого цвета (рисунок 13).

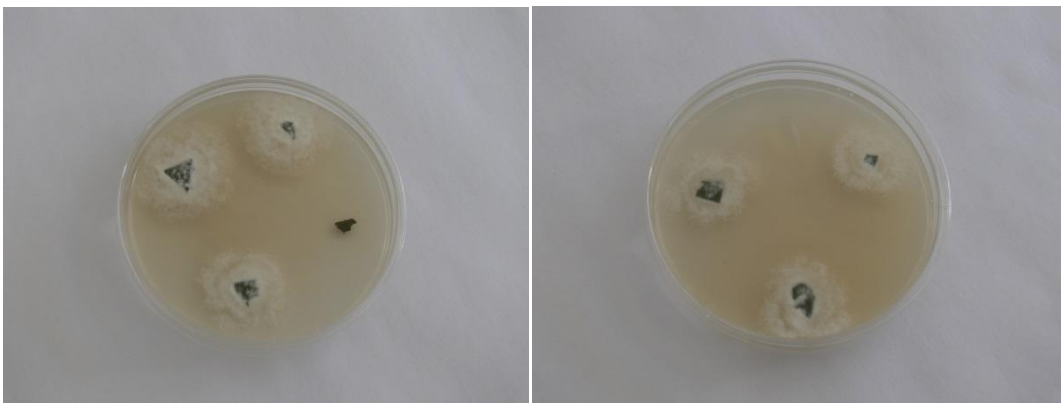


Рисунок 13. Образование мицелия на питательной среде (PARPH).

Выделение ДНК проводили из мицелия, образовавшегося на питательной среде. Идентификацию возбудителей проводили секвенированием участков гена ITS и Ypt1. С образцами, где присутствовало 2 и более видов грибов, проводили клонирование ДНК, с последующим секвенированием.

После проведения ПЦР с праймерами ITS4/ITS5 образцов из Московской области получили продукты двух размеров 550 и 1000 п.о., причем в некоторых образцах наблюдалось сразу два продукта (рисунок 14).

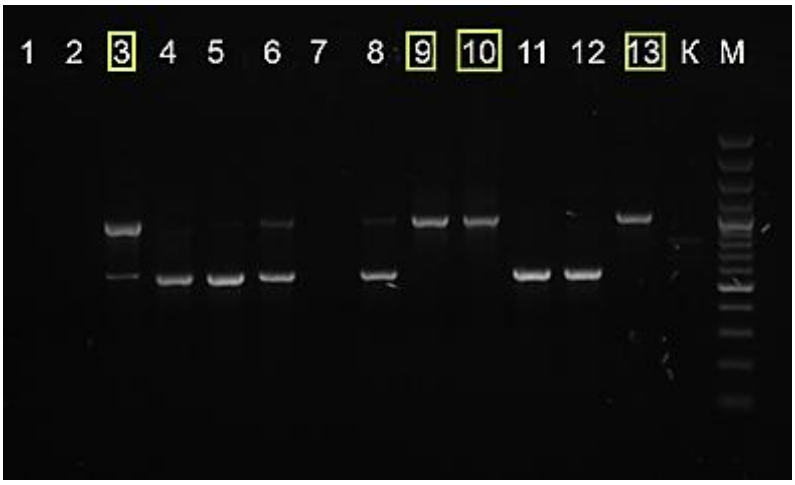


Рисунок 14. Фотография электрофореза.

Затем с образцами было проведено секвенирование, которое показало что последовательности образцов 3, 9, 10 и 13 с величиной продукта 1000 п.о. соответствуют оомицету *Phytopythium litorale,* но в некоторых образцах наблюдалась смесь патогенов (рисунок 15).

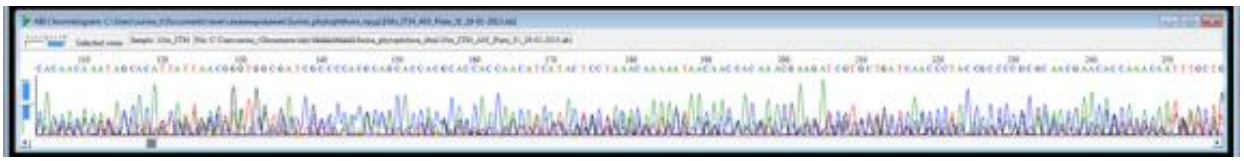


Рисунок 15. Анализ последовательностей в программе BioEdit.

Для разграничения патогенов находящихся в смеси проводили клонирование ДНК. В результате было установлено, что в смеси с *Phytopythium litorale* находился гриб *Fusarium solani*.

Для закладки в другие водоемы в качестве приманки использовали только листья рододендрона, так как в предыдущем опыте они показали наибольшую эффективность.

В озере Дубовом Московской области была выделена *Phytophthora megasperma.*

После проведения ПЦР с праймерами Yph1F/Yph2R (рисунок 16) образцов из водоёмов г. Пятигорска с последующим секвенированием были идентифицированы и выделены в чистую культуру следующие виды оомицетов: *Phytophthora megasperma* Drechsler, *Phytophthora polonica* и *Phytophthora gonapodyides* (таблица 18).

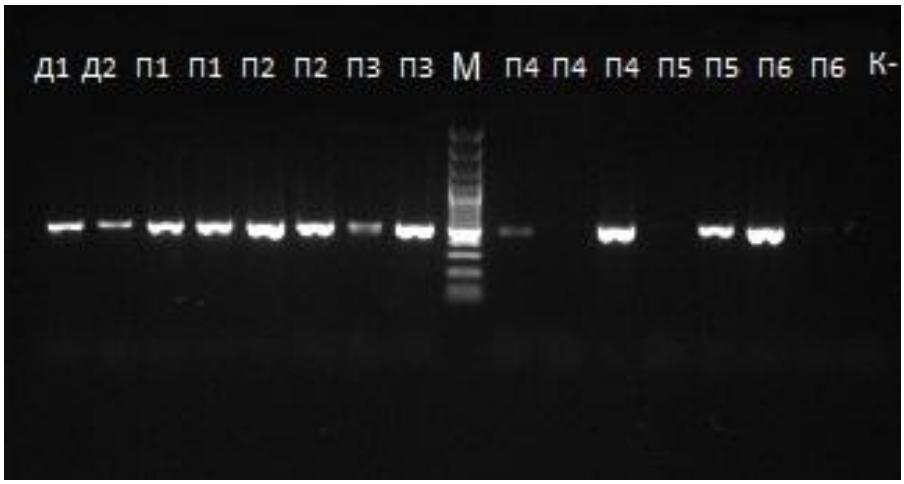


Рисунок 16. Фотография электрофореза образцов из Московской области и г. Пятигорска.

Таблица 18

Результаты применения метода биоприманок для выявления оомицетов рода *Phytophthora* в воде.

Регион России	Растение - приманка	Количество приманок	Выявленный вид	Количество случаев выявления
Московская область пруд на территории ФГБУ ВНИИКР	Калина	4	-	-
	Сирень	4	-	-
	Рододендрон	4	*Phytopythium litorale*	3
Московская область озеро Дубовое	Рододендрон	2	*P. megasperma*	2
Г. Пятигорск, 6 водоемов в черте города	Рододендрон	12	*P. megasperma* *P. gonapodyides* *P. polonica*	6 1 1

P. megasperma космополитный вид. Встречается на всех частях растения в зависимости от хозяина. Вызывает корневые гнили, воротниковые гнили, гнили хранения, выпревание рассады, внезапное увядание, задержку роста, хлороз, в зависимости от хозяина (Erwin, Ribeiro 1996).

P. gonapodyides вначале была известна на сосновых саженцах под названием *P. drechsleri* (Erwin и Ribeiro 1996). В настоящее время распространена в Северной Америке (США), Европе (Дания). Также есть сообщения из Австралии, Новой Зеландии и Южной Америки (Чили). Поражает корни саженцев, вызывая корневые гнили растений из 13 родов в том числе *Malus* spp., *Pseudotsuga menziesii*, *Abies* spp., и *Tsuga mertensiana*. В 2009 году в Испании *P. gonapodyides* была выявлена на дубе каменном из корней и почвы (Corcobado et al., 2010).

P. polonica была впервые выделена из почвы увядающего старого дерева ольхи (*Alnus glutinosa*) в Польше (Belbahri et al., 2006). *P. polonica*

при искусственном заражении ольхи, показывала не сильную патогенность. После 10 дней инкубации наблюдалась обесцвечивание тканей выше места укола. Патогенный статус *P. polonica* остается неясным и необходимы дальнейшие исследования.

Проведенные исследования показали, что для выявления фитофторозов древесных и кустарниковых растений в естественных условиях наиболее подходящими являлись листья рододендрона.

Применение листьев этого растения в качестве биоприманок позволило выявить *P. gonapodyides, P. polonica, P. megasperma* и *Phytopythium litorale* в водоемах естественных насаждений.

На листьях сирени и калины некрозы отсутствовали, следовательно, их не следует использовать в качестве приманок.

Секвенирование последовательностей Ypt1 и ITS, позволило установить видовую принадлежность фитопатогенов.

Таким образом, для выявления оомицетов рода *Phytophthora* более эффективным является метод биоприманок с последующим выделением на селективные питательные среды с антибиотиками. Для точной идентификации видового состава возбудителей, находящихся в смеси, целесообразно использовать метод клонирования.

4.4. Достоверность идентификации *P. ramorum* при использовании ранее разработанных методов классической ПЦР и ПЦР «в реальном времени».

В настоящее время существует ряд вариантов ПЦР с различными праймерами для диагностики *P. ramorum*. Для карантина растений очень важным является то, что используемые для диагностики методы гарантировали 100% достоверность. Поэтому нашей целью было проверить специфичность и точность предлагаемых праймеров и зондов для использования их в лабораторной экспертизе.

Для проверки были выбраны праймеры рекомендованные диагностическим протоколом ЕОКЗР: Phyto1/Phyto4; PramF1/PramR1 для классического ПЦР и праймеры и зонды Pram114-FC/Pram1527-190-R, Pram 1527-134-T; Pram5\Pram6, Pram7 для ПЦР «в реальном времени».

При проверке праймеров и зондов было использовано 10 изолятов культур (*P. ramorum* (2 изолята), *P. cactorum, P. cinnamomi, P. cryptogea, P. syringae, P. citricola, P. erytroseptica, P. infestans, P. megasperma).*

При постановке классической ПЦР с праймерами Phyto1/Phyto4 были получены следующие результаты. Как видно на рисунке 17, на электрофореграмме светятся только продукты амплификации *P. ramorum* размером 700 п.о. (номер 1 и 2). Все остальные культуры показали отрицательный результат.

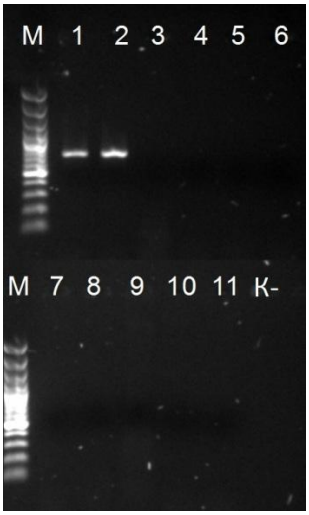


Рисунок 17. Результаты электрофореза с праймерами Phyto1/Phyto4.

В диагностическом протоколе ЕОКЗР написано, что положительным можно считать результат с величиной продукта равной 700 п.о. При постановке классической ПЦР с праймерами PramF1/PramR1были получены продукты с таким размером для всех вариантов кроме 4 и 8 (рисунок 18). По этим данным можно сделать вывод, что эта пара праймеров показывает ложноположительные результаты.

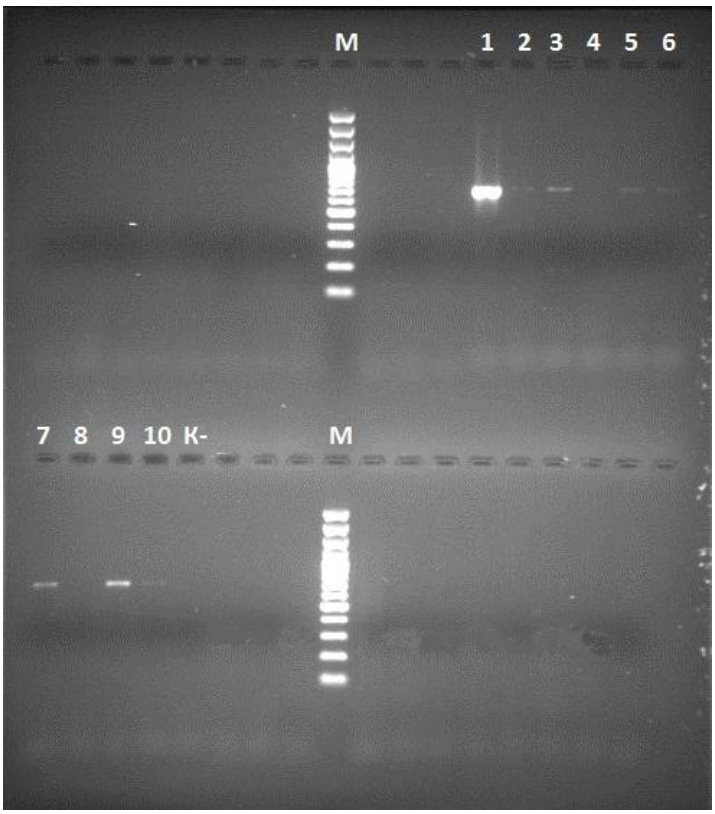


Рисунок 18. Результаты электрофореза с праймерами PramF1/PramR1.

Согласно данным из таблицы 19 видно, что праймеры Pram114-FC/Pram1527-190-R, Pram 1527-134-T и зонд дают перекрестные реакции с другими видами фитофтор, правда на более поздних циклах (от 34 и выше), по сравнению с 22 и 23 для *P.ramorum*. Авторы праймеров рекомендуют считать результат положительным, если значения Ct меньше 35, все что выше считается отрицательным. Но для нашей работы такой вариант не совсем подходит, так как есть вероятность ошибки. Если количество целевой ДНК в образце будет низким, то циклы будут более высокими, пограничными с допустимым.

Таблица 19

Специфичность праймеров Pram114-FC, Pram1527-190-R и зонда Pram 1527-134-T.

Краситель	Вид	Номер	Трешхолд цикл (Ct)
FAM	P. citricola	1	36,83
FAM	P. erythroseptica	2	N/A
FAM	P. infestans	3	36,54
FAM	P. cactorum	4	36,69
FAM	P. cryptogea	5	34,45

FAM	P. cinnamomi	6	36,32
FAM	P. syringae	7	37,50
FAM	P. ramorum	8	23,45
FAM	P. ramorum	9	22,78
FAM	P. megasperma	10	N/A
FAM	K-	11	N/A

N/A– отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат)
цифры – значения Ct (значение трешхолд цикла)

Вторая пара праймеров и зонд для ПЦР «в реальном времени», более специфичны к *P. ramorum,* и не дают перекрёстных реакций с другими видами фитофтор (таблица 20).

Таблица 20

Специфичность праймеров Pram5, Pram6 и зонда Pram7.

Краситель	Вид	Номер	Трешхолд цикл (Ct)
FAM	P. ramorum	1	21,04
FAM	P. ramorum	1	21,02
FAM	P. citricola	3	N/A
FAM	P. megasperma	4	N/A
FAM	P. syringae	5	N/A
FAM	P. infestans	6	N/A
FAM	P. cactorum	7	N/A
FAM	P. cinnamomi	8	N/A
FAM	P. cryptogea	9	N/A
FAM	P. erythroseptica	10	N/A
FAM	K-	11	N/A

N/A– отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат)
цифры – значения Ct (значение трешхолд цикла)

Таблица 21

Результаты проверки специфичности праймеров, рекомендованных протоколом ЕОКЗР.

№	Виды *Phytophthora*	Праймеры			
		Phyto1 Phyto4	PramF1 PramR1	Pram114-FC Pram1527-190-R Pram 1527-134-T	Pram5 Pram6 Pram7
1.	***P. ramorum***	+	+	23,45	21,04
2.	***P. ramorum***	+	+	22,78	21,02
3.	***P. citricola***	-	+	36,83	N/A
4.	***P. megasperma***	-	-	N/A	N/A
5.	***P. syringae***	-	+	37,50	N/A

6.	***P. infestans***	-	+	36,54	N/A
7.	***P. cactorum***	-	+	36,69	N/A
8.	***P. cinnamomi***	-	-	36,32	N/A
9.	***P. cryptogea***	-	+	34,45	N/A
10.	***P. erythroseptica***	-	+	N/A	N/A

+ наличие продукта амплификации (положительный результат)
- отсутствие продукта амплификации (отрицательный результат)
N/A– отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат)
цифры – значения Ct (значение трешхолд цикла)

Как видно из таблицы 21, из результатов проведенных тестирований можно сделать вывод, что рекомендованные праймеры и зонды не все можно использовать для экспертизы, так как очень высок риск получения ложноположительных результатов, что неприемлемо для фитосанитарной службы. Поэтому целесообразно разработать собственные праймеры и зонды для проведения лабораторной экспертизы подкарантинной продукции с целью выявления и идентификации фитофтороза древесных и кустарниковых растений.

4.5. Разработка диагностики *P. ramorum* и близких видов с использованием ПЦР «в реальном времени».

Для карантинных лабораторий очень важно использовать в работе не только точные методы диагностики, дающие 100% результат, но и достаточно быстрые. В среднем лабораторная экспертиза на выявление фитофторозов древесных и кустарниковых растений занимает от 7 до 14 дней, что является весьма длительным сроком. Подкарантинная продукция не может находиться все это время на таможенных пунктах. Использование методов ПЦР, которые обладают более высокой чувствительностью и специфичностью по сравнению с другими методами, может значительно ускорить проведение лабораторной экспертизы. ПЦР позволяет идентифицировать фитопатогенов непосредственно в растительном материале без получения чистой культуры возбудителя, что сокращает время проведения экспертизы. Такой метод является наиболее подходящим при диагностике медленнорастущих патогенов, требующих сложных

условий культивирования, к которым относятся и возбудители фитофторозов.

ПЦР «в реальном времени» по сравнению с классическим ПЦР сокращает время проведения исследования, упрощает сам метод диагностики, снижает вероятность получения недостоверных результатов, так как детекция результатов проходит в закрытой пробирке.

При постанове ПЦР «в реальном времени» наличие целевой мишени в образце определяется ростом сигнала флуоресценции определенного красителя в реакционной смеси. Флуоресценция от каждого исследуемого образца начинает пересекать величину пороговой линии (threshold line) на определенном цикле амплификации (Ct – threshold cycle). Чем меньше исходное количество ДНК в анализируемом образце, тем на большем цикле амплификации будет достигнуто пороговое значение. И наоборот: чем меньше величина Ct, определенная для данного образца, тем выше изначальная концентрация ДНК-мишени (Ребриков и др., 2009).

Мультиплексная ПЦР «в реальном времени» позволяет в одной пробирке идентифицировать более 2 патогенов, если используются зонды, меченные различными флуоресцентными красителями. Мультиплексная ПЦР позволяет сократить количество затрачиваемого времени и реагентов.

Результаты тестирования специфичности праймеров и зондов, полученные в предыдущей главе, показали, что имеющиеся методы не совсем подходят для работы карантинной лаборатории. Таким образом, задача разработки собственных праймеров и зондов, специфичных к *P. ramorum,* весьма актуальна.

В связи с тем, что специалисты фитосанитарной службы регулярно проводят мониторинг на выявление и других фитофторозов древесных и кустарниковых растений, перед нами встала задача разработать мультиплексную ПЦР для одновременного выявления в исследуемых образцах основных опасных возбудителей фитофторозов.

4.5.1. Подбор праймеров и зондов.

При анализе литературных данных о методах диагностики видов рода *Phytophthora* было отмечено, что большинство молекулярно-генетических методов идентификации фитофторозов разработаны на основе внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) рибосомальной ДНК. Последовательность этого участка недостаточно изменчива и поэтому имеет ограниченное применение для идентификации видов *Phytophthora*, которые могут совместно присутствовать в образце.

Для разработки видоспецифичных праймеров и зондов нами был выбран ras-related protein (Ypt1) ген (Chen, Roxby, 1996). Некодирующий участок гена Ypt1 обладает достаточной изменчивостью, он пригоден для разработки молекулярных маркеров практически для всех видов рода *Phytophthora* (Schena, Cooke, 2006).

Для подбора праймеров и зондов использовали нуклеотидные последовательности гена Ypt1 возбудителей фитофторозов из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), а также последовательности ДНК чистых культур *Phytophthora sp*. из коллекции ФГБУ «ВНИИКР». Всего было проанализировано около 40 нуклеотидных последовательностей возбудителей фитофторозных гнилей корней. Анализ последовательностей и подбор праймеров и зондов проводили с помощью программ “BioEdit”, “Primer 3”, основываясь на наименьшей комплементарности конкретного участка гена аналогичным участкам других видов фитофтор.

Подбор специфичных праймеров и зонда к *P. ramorum* основан на принципе наименьшей комплементарности участков гена Ypt1 разных видов фитофторозов (рисунки 19, 20, 21). В анализируемых последовательностях выбирали участки с наибольшим количеством несовпадений по нуклеотидам между видами.

Расчетная длина фрагмента ДНК, амплифицируемого подобранными праймерами – 431 п.о. При подборе пар олигонуклеотидов учитывали количество A/T G/C-оснований, которое должно быть не более 50% в

последовательности. Температура отжига праймеров должна быть ниже температуры отжига зонда. Разница в температуре плавления каждого из праймеров не более 6°С. При подборе зондов в программе Primer Express руководствовались общими требованиями к зондам, используемым в ПЦР: температура отжига зонда превышала температуру отжига праймеров примерно на 10°С, соотношение GC-оснований составляло не более 50%.

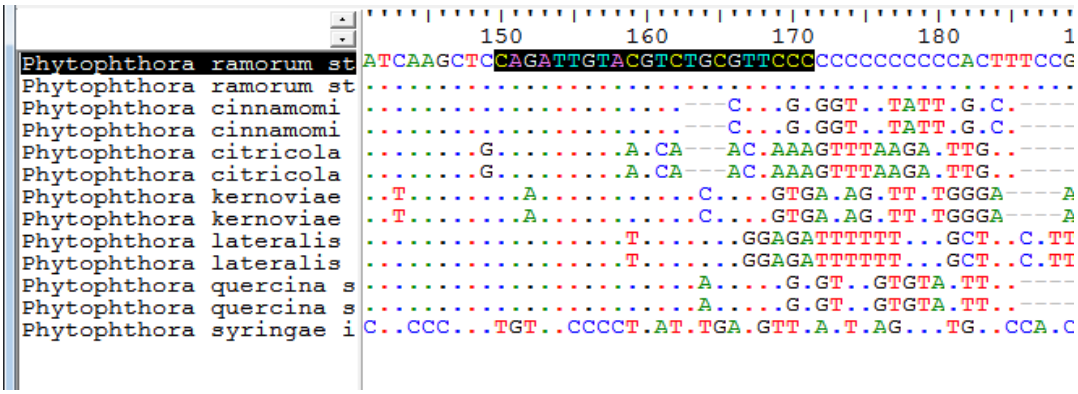


Рисунок 19. Подбор прямого праймера для диагностики *Phytophthora ramorum* в режиме реального времени (точками обозначено идентичность нуклеотидов в последовательностях).

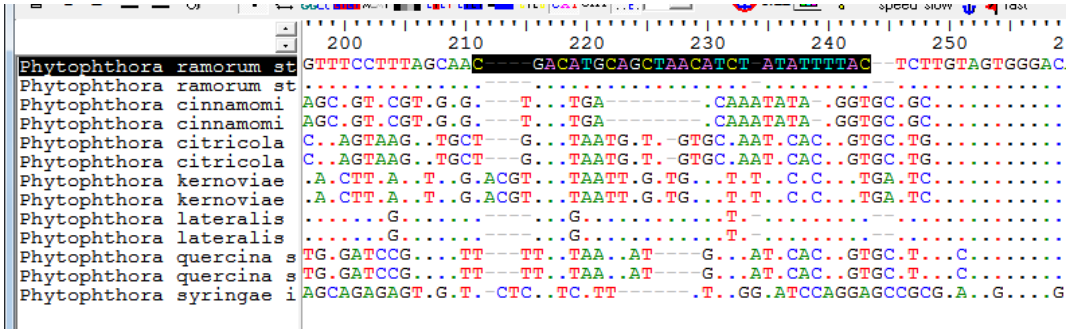


Рисунок 20. Подбор обратного праймера для диагностики *Phytophthora ramorum* в режиме реального времени.

Рисунок 21. Подбор зонда для диагностики *Phytophthora ramorum* в режиме реального времени.

Специфичность подобранных олигонуклеотидов была изучена с помощью приложения PrimerBLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). В результате была показана специфичность подобранных маркеров к *P. ramorum* и не обнаружено гомологии с нуклеотидными последовательностями других близкородственных или сопутствующих патогенов.

На основании выровненных последовательностей были подобраны праймеры: PramF: 5’-ATT GTA TGT ACG TCT GCG TTC CC-3’, PramR: 5’-GTA AAA TAA GAT GTT AGC TGC ATG TCG-3’ и меченый флуоресцентным красителем FAM зонд PramP: 6-FAM- CCA CTT TCC GTG GGT GA-MGBNFQ специфичные к *P. ramorum*.

Подбор универсальных праймеров для нескольких видов рода *Phytophthora* был основан на принципе комплементарности участков гена Ypt1 данных фитофторозов (рисунки 22, 23). В анализируемых последовательностях были определены участки (для подбора прямого и обратного универсальных праймеров) с наибольшей гомологией нуклеотидов между ними.

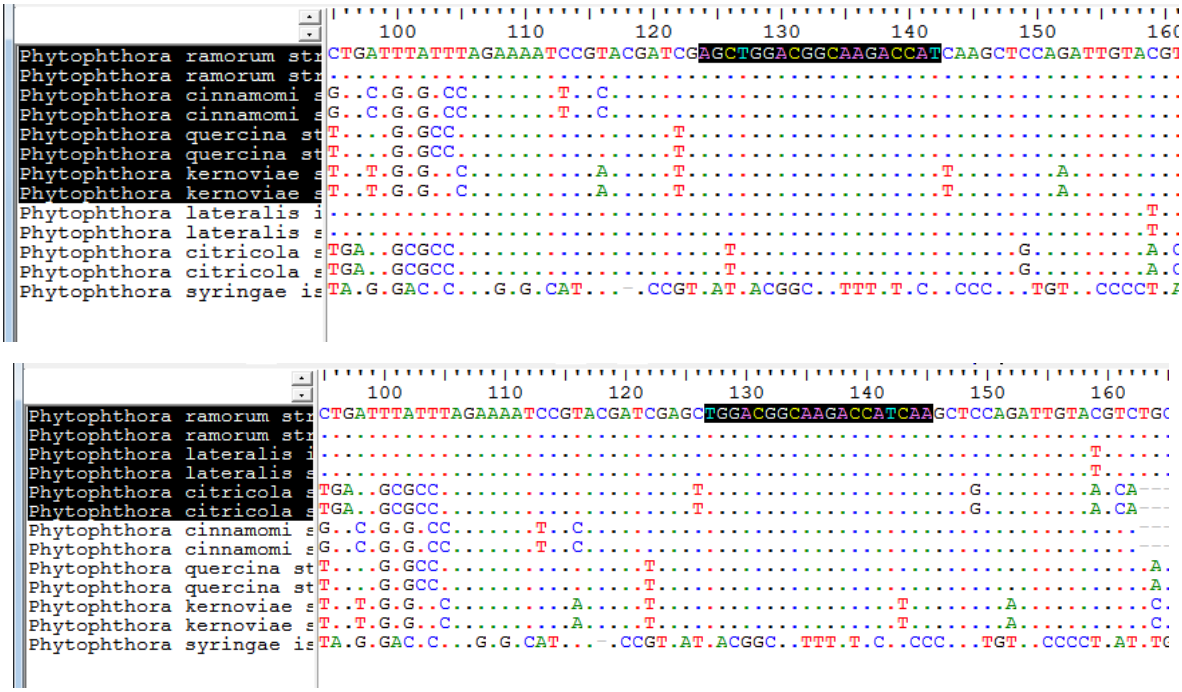


Рисунок 22. Подбор двух вариантов прямого праймера для мультиплексной диагностики *Phytophthora sp.* в режиме реального времени.

Рисунок 23. Подбор двух вариантов обратного праймера для мультиплексной диагностики *Phytophthora sp.* в режиме реального времени.

Были подобраны зонды, специфичные для определенного вида возбудителя фитофтороза. Подбор зондов специфичных для *P. ramorum*, *P. kernoviae*, *P. cinnamomi*, *P. quercina*, *P. citricola*, *P. lateralis* основывался на принципе наименьшей комплементарности конкретного участка гена Ypt1 аналогичным участкам других видов (рисунок 24). В анализируемых последовательностях выбирали участки с наибольшим количеством несовпадений по нуклеотидам между видами.

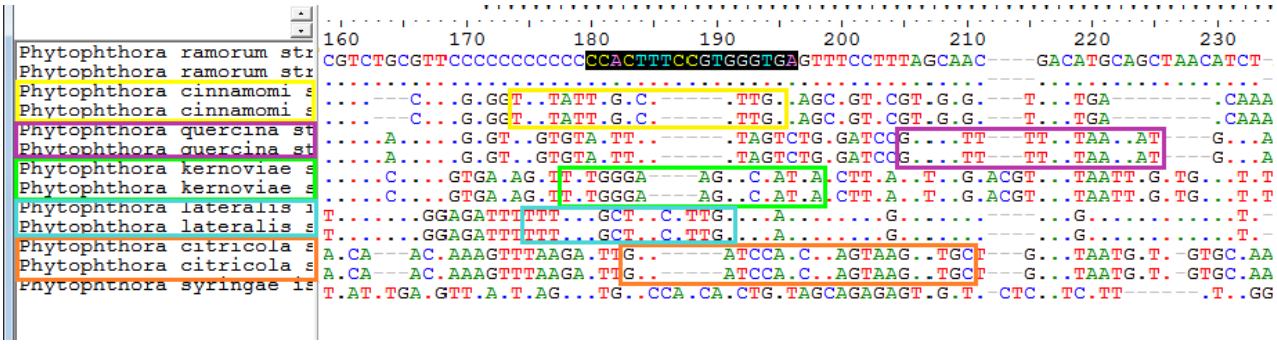


Рисунок 24. Подбор специфичных зондов для диагностики видов *Phytophthora* в режиме реального времени.

На основе выровненных нуклеотидных последовательностей Ypt1 гена были подобраны два варианта праймеров и зондов MGB (Minor groove binder), меченых разными флуоресцентными красителями (FAM, VIC, NED) для видов рода *Phytophthora*. Детекция флуоресцентного сигнала от каждого красителя происходила в определенном для него диапазоне. Применение зондов типа MGB позволяет добиться высокой точности и достоверности результатов, т.к. они могут быть очень короткими (обычно 13-20) по сравнению со стандартными зондами (18-40 нуклеотидов). Небольшой размер зонда позволяет проводить подбор олигонуклеотидов в пределах малых участков целевой последовательности.

Первый вариант мультиплексной ПЦР для идентификации комплекса *P. ramorum*, *P. kernoviae*, *P. cinnamomi*, *P. quercina*: праймеры PhytoYptF: 5'-AGC TGG ACG GCA AGA CCA T-3'; PhytoYptR: 5'-CTG CTA GTG ATC GTG CGG AA-3' и зонды PhytoYptRamP: 6-FAM – CCA CTT TCC GTG GGT GA – MGBNFQ; PhytoYptKerP: VIC – TCT GGG AAG GGC TAT GA – MGBNFQ; PhytoYptCinP: NED – GTC CTA TTC GCC TGT TGG – MGBNFQ; PhytoYptQuerP: NED – GAG CAT TTT ACT AAC AAT G – MGBNFQ.

Второй вариант для идентификации комплекса P. *ramorum*, *P. citricola*, *P. lateralis*: Phyto2YptF: 5'-TGG ACG GCA AGA CCA TCA A-3'; Phyto2YptR: 5'-CRG CCG TGT CCC ACT ACA-3'; PhytoYptRamP: 6-FAM – CCA CTT TCC GTG GGT GA – MGBNFQ; Phyto2YptCitP: VIC – GTT ATC CAA CTT AGT AAG AGT GC – MGBNFQ; Phyto2YptLatP: NED – TTT CCC GCT TTC CTT GG – MGBNFQ.

Подобранные праймеры и зонды были проанализированы с помощью сервера Primer BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) для определения их пригодности для идентификации трех видов фитофторозов одновременно.

4.5.2. Оптимизация ПЦР «в реальном времени».

Для оптимизации ПЦР «в реальном времени» были учтены следующие факторы: температура отжига каждого из зондов и его концентрация, необходимая для реакции.

На специфичность амплификации влияет правильно подобранная температура отжига зондов, при которой они взаимодействуют с комплементарными участками целевого патогена. При температуре в пределах 50-60°C зонды гибридизуются с комплементарными последовательностями на матричных цепочках ДНК. Температура отжига зонда ниже или выше оптимальной может привести к получению ложноположительных результатов. Это связано с гибридизацией зондов с неспецифичными последовательностями, которые могут обладать частичной гомологией с целевым участком ДНК (Ребриков и др., 2009).

Эффективность ПЦР зависит и от вносимой в реакцию концентрации зонда, которая влияет на температуру отжига и поэтому должна учитываться в процессе подбора зонда. Высокая или низкая концентрация зонда может приводить к повышению или понижению значения порогового цикла Ct и как следствие получение недостоверных результатов.

Определение оптимальных условий ПЦР «в реальном времени» для *P. ramorum* проводили на амплификаторе i-Cycler iQ 5, изменяя следующие параметры: температуру отжига зонда (от 50°C до 68°C); концентрацию зонда (от 5 пМ до 15 пМ на реакцию, объемом 25 мкл). Количество остальных компонентов реакционной смеси не изменяли. Амплификацию проводили в следующем режиме: преденатурация 1 цикл 96°C– 15 мин; 40 циклов: денатурация 95°C – 15 с., элонгация и отжиг 50^{0}C – 68°C – 1 мин. Количество циклов амплификации не изменяли, т.к. это увеличило бы риск появления ложноположительных или ложноотрицательных результатов.

Экспериментальный подбор оптимальной температуры отжига каждого зонда проводили с использованием градиента температуры отжига (50°C -68°C). В таблице представлены результаты ПЦР «в реальном

времени» с зондом PramP. Как видно из таблицы, значения порогового цикла детекции флуоресценции различались при использовании различных температур отжига зондов. Минимальные значения порогового цикла (Ct) соответствовали температурам отжига от 51°C до 56°C. С увеличением температуры отжига зондов начинало повышаться значение Ct, что означало уменьшение специфичности системы. После повторного проведения ПЦР в данном диапазоне температур стало видно, что наиболее подходящей является температура 51°C (таблица 22, 23).

Таблица 22

Влияние температуры отжига зонда на значение Ct.

Краситель	ДНК возбудителя	Пороговый цикл (Ct)	Температура
FAM	*P.ramorum*	N/A	68
FAM	вода	N/A	68
FAM	*P.ramorum*	N/A	66,784
FAM	вода	N/A	66,784
FAM	*P.ramorum*	36,68	64,648
FAM	вода	N/A	64,648
FAM	*P.ramorum*	31,27	61,378
FAM	вода	N/A	61,378
FAM	*P.ramorum*	30,44	56,838
FAM	вода	N/A	56,838
FAM	*P.ramorum*	28,95	53,596
FAM	вода	N/A	53,596
FAM	*P.ramorum*	29,07	51,384
FAM	вода	N/A	51,384
FAM	*P.ramorum*	31,67	50
FAM	вода	N/A	50

N/A– отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат)
цифры – значения Ct (значение трешхолд цикла)

Таблица 23

Влияние температуры отжига зонда на значение Ct.

Краситель	ДНК возбудителя	Пороговый цикл (Ct)	Температура
FAM	*P.ramorum*	29,22	56
FAM	вода	N/A	56
FAM	*P.ramorum*	27,87	55,714
FAM	вода	N/A	55,714
FAM	*P.ramorum*	27,15	55,014

FAM	вода	N/A	55,014
FAM	*P.ramorum*	27,91	53,912
FAM	вода	N/A	53,912
FAM	*P.ramorum*	27,23	52,378
FAM	вода	N/A	52,378
FAM	*P.ramorum*	26,38	51,296
FAM	вода	N/A	51,296
FAM	*P.ramorum*	26,76	50,534
FAM	вода	N/A	50,534
FAM	*P.ramorum*	27,20	50
FAM	вода	N/A	50

N/A– отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат)
цифры – значения Ct (значение трешхолд цикла)

При подборе оптимальной температуры отжига для других зондов использовали описанную выше схему. В результате определили, что для зонда PhytoYptRamP оптимальным является 51°C. Для зонда Phyto2YptCitP изменение температуры отжига от 51 до 53°C практически не влияет на значение Ct, поэтому оптимальной была определена температура 51°C, так как эти два зонда будут использоваться в мультиплексной ПЦР.

При оптимизации температуры отжига зонда PhytoYptRamP в концентрации 5 пмоль наблюдался слишком низкий уровень флуоресценции, поэтому была увеличена его концентрация до 10 и 15 пмоль.

Таблица 24

Подбор оптимальной концентрации зонда.

Краситель	**Образец**	**Значение порогового цикла (Ct)**	**Концентрация зонда (пмоль на реакцию)**
FAM	вода	N/A	10
FAM	вода	N/A	10
FAM	Ram I	32,48	10
FAM	Ram I	32,79	10
FAM	Cit I	N/A	10
FAM	Cit I	N/A	10
FAM	вода	N/A	15
FAM	вода	N/A	15
FAM	Ram II	32,09	15
FAM	Ram II	32,05	15

FAM	Cit II	N/A	15
FAM	Cit II	N/A	15

N/A– отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат)
цифры – значения Ct (значение трешхолд цикла)

При концентрациях зонда 10 и 15 пмоль уровень флуоресценции увеличился до 894,80, в то время как при внесении 5 пмоль зонда он составлял 83,89. Значения порогового цикла при разных концентрациях зонда практически не изменялись (таблицы 24).

При постановке ПЦР «в реальном времени» с зондами PhytoYptRamP и Phyto2YptCitP оптимальной является температуры отжига 51°C. Для зонда PhytoYptRamP следует использовать концентрацию от 10 до 15 пмоль на реакцию, а для Phyto2YptCitP – 10 пмоль.

4.5.3. Определение специфичности ПЦР «в реальном времени» при диагностики *P. ramorum* и близких видов.

Проверку специфичности подобранных зондов и праймеров проводили на коллекционных культурах возбудителей фитофторозов ФГБУ «ВНИИКР». Для этого проводили ПЦР «в реальном времени» с использованием зонда, специфичного для одного возбудителя рода *Phytophthora* с образцами ДНК разных видов.

При определении специфичности зонда PramP установлено, что флуоресценция по красителю FAM (*P. ramorum)* регистрировалась только в образцах ДНК чистых культур этого возбудителя. При тестировании других видов фитофтор зафиксирован отрицательный результат, что свидетельствует об отсутствии ложноположительных результатов. Данные представлены в таблице 25.

Таблица 25

Специфичность ПЦР «в реальном времени» с зондом PramP (*P. ramorum*).

Краситель	ДНК возбудителя	Пороговый цикл (Ct)
FAM	*P. ramorum*	27,39
FAM	*P. ramorum*	28,70

FAM	*P. citricola*	N/A
FAM	*P. megasperma*	N/A
FAM	*P. syringae*	N/A
FAM	*P. infestans*	N/A
FAM	*P. cactorum*	N/A
FAM	*P. cinnamomi*	N/A
FAM	*P. cryptogea*	N/A
FAM	*P. erythroseptica*	N/A
FAM	*P. nicotiana*	N/A
FAM	*F. oxysporum*	N/A
FAM	*Pyt. intermedium*	N/A
FAM	*Pyt. intermedium*	N/A
FAM	вода	N/A
FAM	вода	N/A

N/A– отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат)
цифры – значения Ct (значение трешхолд цикла)

При определении специфичности зондов PhytoYptRamP и Phyto2YptCitP установлено, что флуоресценция по красителю FAM - для *P. ramorum* и HEX – для *P. citricola* регистрировалась только в образцах ДНК чистых культур этих возбудителей. При тестировании других видов фитофтор зафиксирован отрицательный результат, что свидетельствует об отсутствии ложноположительных результатов. Данные представлены в таблице 26.

Таблица 26

Специфичность ПЦР «в реальном времени» с зондами PhytoYptRamP и Phyto2YptCitP.

Краситель	ДНК возбудителя	Пороговый цикл (Ct)
FAM	*P. ramorum*	26,92
FAM	*P. ramorum*	26,89
FAM	*P. citricola*	N/A
FAM	*P. megasperma*	N/A
FAM	*P. syringae*	N/A
FAM	*P. insolita*	N/A
FAM	*P. cactorum*	N/A
FAM	*P. cinnamomi*	N/A
FAM	*P. cryptogea*	N/A
FAM	*P. erythroseptica*	N/A
FAM	*P. kernoviae*	N/A
FAM	*P. lateralis*	N/A

FAM	H2O	N/A
HEX	*P. ramorum*	N/A
HEX	*P. ramorum*	N/A
HEX	*P. citricola*	25,12
HEX	*P. megasperma*	N/A
HEX	*P. syringae*	N/A
HEX	*P. insolita*	N/A
HEX	*P. cactorum*	N/A
HEX	*P. cinnamomi*	N/A
HEX	*P. cryptogea*	N/A
HEX	*P. erythroseptica*	N/A
HEX	*P. kernoviae*	N/A
HEX	*P. lateralis*	N/A
HEX	H2O	N/A

N/A– отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат)
цифры – значения Ct (значение трешхолд цикла)

При тестировании зондов PramP и Phyto2YptCitP в одной пробирке флуоресценция по красителю FAM - для *P. ramorum* и HEX – для *P. citricola* регистрировалась только в образцах с ДНК чистых культур этих возбудителей, даже если они находились в смеси. Результаты представлены в таблице 27.

Таблица 27

Специфичность ПЦР «в реальном времени» с зондами PramP и Phyto2YptCitP.

Краситель	ДНК возбудителя	Пороговый цикл (Ct)
FAM	Вода	N/A
FAM	Вода	N/A
FAM	*P. ramorum*	32,44
FAM	*P. ramorum*	31,50
FAM	*P. citricola*	N/A
FAM	*P. citricola*	N/A
FAM	*P. ramorum* + *P. citricola*	31,09
FAM	*P. ramorum* + *P. citricola*	36,65
HEX	Вода	N/A
HEX	Вода	N/A
HEX	*P. ramorum*	N/A
HEX	*P. ramorum*	N/A
HEX	*P. citricola*	29,33
HEX	*P. citricola*	32,29
HEX	*P. ramorum* + *P. citricola*	30,38

HEX	*P. ramorum + P. citricola*	29,16

N/A– отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат)
цифры – значения Ct (значение трешхолд цикла)

В результате проделанной работы нами были подобраны праймеры и зонды для ПЦР «в реальном времени», которые позволяют идентифицировать *P. ramorum* и *P. citricola* как по отдельности, так и вместе в одной пробирке. Для каждого зонда подобрана экспериментальным путем оптимальная температура отжига и концентрация. Разработанные зонды с исследованными культурами не давали ложноположительных результатов, в связи с чем после дополнительной проверки могут быть рекомендованы для использования в карантинных лабораториях.

ГЛАВА V. ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФУНГИЦИДОВ В ОТНОШЕНИИ *P. RAMORUM*

5.1. Определение биологической эффективности фунгицидов на питательной среде.

Определение биологической эффективности препаратов проводили на твердой питательной среде CPA, в которую предварительно добавляли фунгициды в трех концентрациях: рекомендуемой производителем, в два раза большей и в два раза меньшей. Для контроля использовали среду без добавления фунгицида. Полученную среду засевали культурой *Phytophthora ramorum* диском диаметром 10 мм (рисунок 25).

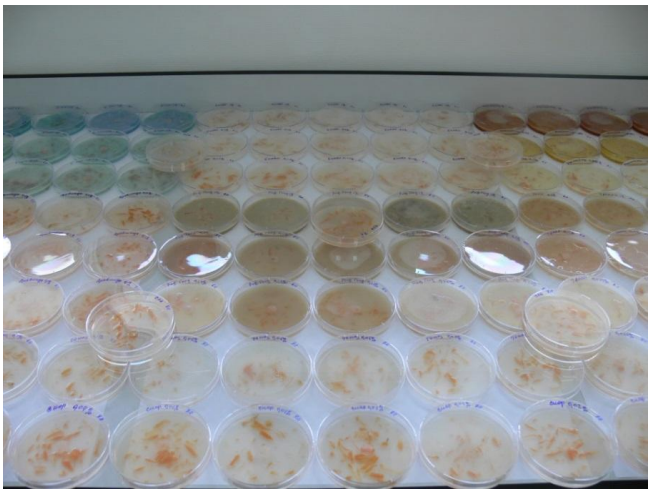


Рисунок 25. Чашки Петри засеянные *P. ramorum*.

Каждый препарат и концентрацию оценивали в 5-ти кратной повторности, измеряя диаметр колоний на 3, 5, 7 и 10 сутки. Оценку результатов проводили по методу Дункан. При выявлении ошибки выше или равном 5% (≥0.05), подтверждается гипотеза о равенстве средних значений, а при уровне ошибки ниже или равном 5% (≤0.05) подтверждается гипотеза о различии средних значений (Приложение 2).

Таблица 28

Динамика роста культуры на 3-е, 5-е, 7-е и 10-е сутки.

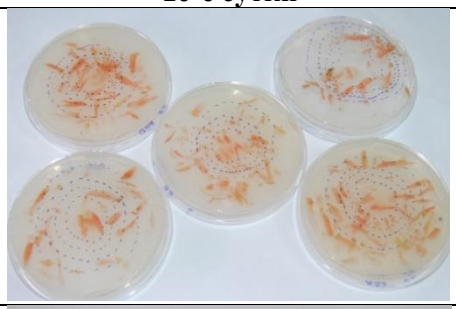
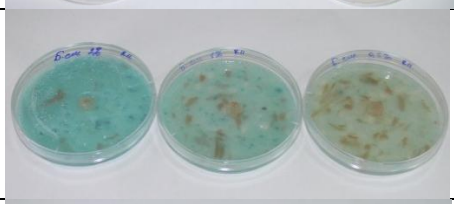
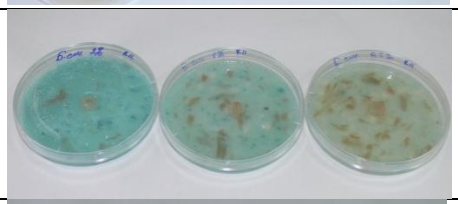
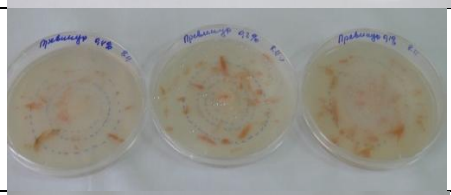
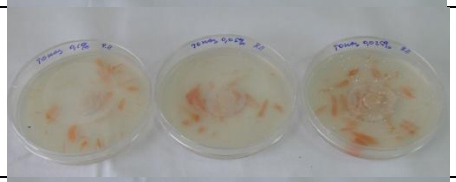
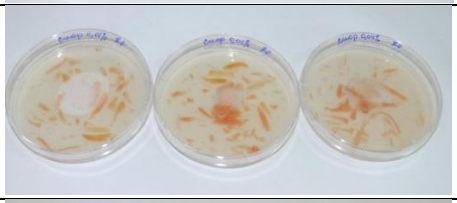
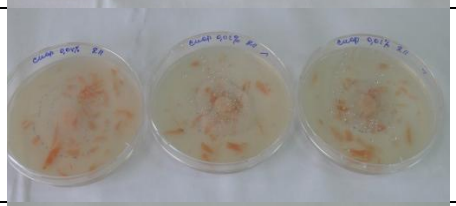
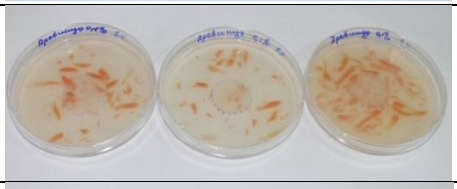
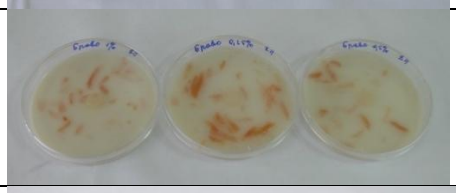
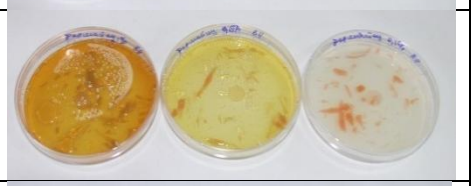
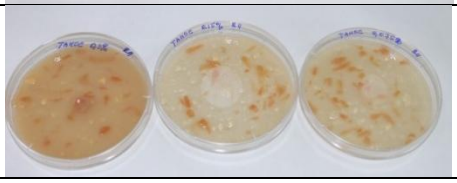
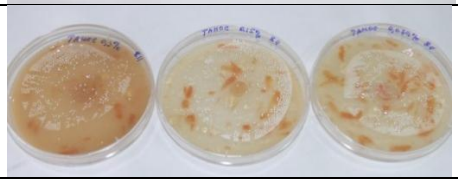
Препарат, концентрация препарата		**Среднее значение диаметра колоний из 5 повторностей, мм ± стандартное отклонение**			
		3-е сутки	**5-е сутки**	**7-е сутки**	**10-е сутки**
Контроль		27,4 ± 2,1	35,4 ± 2,5	40,6 ± 2,5	55,8 ± 2,8
Бордоская смесь	2%	-	-	-	-
	1%	-	-	-	-
	0,5%	-	-	-	-
Превикур	0.4%	22 ± 2	32,2 ± 1,96*	39,6 ± 1,5*	53,4 ± 2,2*
	0.2%	21 ± 1,9	28 ± 1,3	38,2 ± 1,5*	51 ± 2,45
	0.1%	18,4 ± 0,8	26,4 ± 0,7	34,8 ± 0,2	46,6 ± 2,6
Топаз	0,1%	-	12,2 ± 0,5	15,2 ± 1,07	16,4 ± 1,1
	0,05%	10 ± 0	15 ± 0,45	17,2 ± 0,8	22,6 ± 0,7
	0,025%	13,8 ± 0,5	18,8 ± 0,4	22,4 ± 0,7	32,8 ± 1,4
Скор	0,04%	16 ± 0,7	25 ± 0,8	31,6 ± 0,98	47,8 ± 0,97
	0,02%	14,8 ± 0,7	20,4 ± 0,7	25 ± 0,95	38,2 ± 1,7
	0,01%	11,8 ± 2,7	19,8 ± 0,6	24,8 ± 0,2	36 ± 1,3
Браво	1%	-	8,2 ± 2,1	11,6 ± 0,2	17,2 ± 1,3
	0,5%	9,2 ± 2,3	12 ± 0,3	12,8 ± 0,2	17,6 ± 0,5
	0,25%	6,6 ± 2,7	11,4 ± 0,25	13 ± 0,3	18 ± 0,45
Ридомил Голд МЦ	1%	-	-	-	-
	0,5%	-	-	-	-
	0,25%	-	-	-	-
Фарма йод	1%	-	-	-	-
	0,5%	-	-	-	-
	0,25%	-	-	-	-
Танос	0,3%	-	-	-	-
	0,15%	-	-	10 ± 0,0	11 ± 0,0
	0,075%	10 ± 0,0	10 ± 0,0	11 ± 0,0	16 ± 0,45

“ – “ – означает отсутствие роста
* – ошибка более 0,05

Как видно из таблицы 28, на питательной среде с препаратами Бордоская смесь, Ридомил Голд МЦ и Фарма йод рост культуры полностью отсутствовал. Следовательно, препараты ингибировали рост мицелия патогена. Эти данные совпадают и с результатами зарубежных исследователей. Гарбелотто (2002) писал о положительном влиянии медь-содержащих препаратов на подавление роста *P. ramorum*, а Тернер (2006) в своих опытах установил, что мефеноксам и манкоцеб, которые являются действующими веществами препарата Ридомил Голд МЦ, полностью подавляли рост мицелия и прорастание спор. Препараты Превикур, Топаз и Скор замедляли рост патогена, но не существенно, так как диаметр колоний на 10-е сутки не на много отличался от контроля. Кроме того, у фунгицида превикур для первой концентрации на 5,7 и 10 сутки и для второй концентрации на 7-е сутки ошибка при сравнении средних значений была более 0,05, следовательно, средние значения диаметра колоний в этих вариантах равны с контролем, и препарат не эффективен. В работах иностранных исследователей действующее вещество превикура пропамокарб гидрохлорид также не оказывало ингибирующего действия на мицелий патогена даже при высоких концентрациях (Heungens et al., 2005). Браво и Танос проявили себя лучше по сравнению с предыдущими веществами, так как диаметр колоний на 10- сутки был намного меньше, чем в контроле. Танос в концентрации 0,3% полностью подавлял рост оомицета. По данным Хюнгенса и его коллег (2005) хлороталонил (действующее вещество препарата Браво) вызывал не полное подавление роста мицелия, цимоксанил (одно из действующих веществ препарата Танос) ингибировал рост патогена при средних и высоких концентрациях (Heungens et al., 2005).

Таблица 29

Фотографии роста колоний на 5-е и 10-е сутки.

Препарат	5-е сутки	10-е сутки
Контроль		
Бордоская смесь		
Превикур		
Топаз		
Скор		
Браво		
Ридомил Голд МЦ		
Фарма-йод		
Танос		

После замера колоний проводили расчет биологической эффективности (Б) по формуле: Б = (К-В / К) х 100%, где К – диаметр колонии в контроле, В – диаметр колонии на среде с добавлением фунгицида.

Таблица 30

Биологическая эффективность препаратов.

Название препарата, его концентрация		БЭ на 3-е сутки	БЭ на 5-е сутки	БЭ на 7-е сутки	БЭ на 10-е сутки	Средняя БЭ
Бордоская смесь	2%	100%	100%	100%	100%	100%
	1%	100%	100%	100%	100%	100%
	0,5%	100%	100%	100%	100%	100%
Превикур	0.4%	18%	9%	2,5%	4,3%	8,5%
	0.2%	22,2%	20%	5,9%	8,6%	14,2%
	0.1%	31,8%	25,4%	14,3%	16,5%	22%
Топаз	0,1%	100%	65,5%	62,6%	70,6%	74,7%
	0,05%	63%	57,6%	57,6%	59,5%	59,5%
	0,025 %	48,9%	46,9%	44,8%	41,2%	45,5%
Скор	0,04%	40,7%	29,4%	22,2%	14,3%	26,7%
	0,02%	45,2%	42,4%	38,4%	31,5%	39,4
	0,01%	47,4%	44,1%	38,9%	35,5%	41,5%
Браво	1%	100%	76,8%	71,4%	69,2%	79,4%
	0,5%	65,9%	66,1%	68,5%	68,5%	67,3%
	0,25%	75,6%	67,8%	68%	67,7%	69,8%
Ридомил Голд МЦ	1%	100%	100%	100%	100%	100%
	0,5%	100%	100%	100%	100%	100%
	0,25%	100%	100%	100%	100%	100%
	1%	100%	100%	100%	100%	100%
	0,5%	100%	100%	100%	100%	100%
	0,25%	100%	100%	100%	100%	100%
Танос	0,3%	100%	100%	100%	100%	100%
	0,15%	100%	100%	75,4%	80,3%	88,9%
	0,075 %	63%	71,8%	72,9%	71,3%	69,8%

Биологическая эффективность Бордосской смеси, Ридомила Голд составила 100% для всех вариантов концентраций. Эти препараты показали наилучшие результаты. Препарат Танос также оказывал действие на рост культуры, его биологическая эффективность в концентрации 0,3% составила 100%. С понижением концентрации препарата в среде эффективность падала и составляла 88,9% и 69,8% для концентраций 0,15% и 0,075% соответственно. Браво в концентрации 1% оказывал наибольший подавляющий эффект на рост культуры, его биологическая эффективность

составила 79,4%. Остальные препараты оказывали меньшее действие на развитие патогена. Превикур, несмотря на то, что его рекомендуют как противофитофторозный препарат, практически не подавлял рост фитофторы. Его биологическая эффективность в концентрации 0,1% составила всего 22%. Эффективность Топаза была лучше в концентрации 0,1%, а Скора в 0,01% и составила 74,7% и 41,5% соответственно (таблица 30).

По этим данным можно сделать вывод, что наиболее эффективные препараты подавляющие рост мицелия *P. ramorum* на питательной среде это – Бордоская смесь, Ридомил Голд МЦ, и Танос.

5.2. Определение биологической эффективности фунгицидов на листьях.

Для определения биологической эффективности на листьях рододендрона их помещали во влажную камеру и опрыскивали фунгицидами в двух концентрациях, затем поводили искусственное заражение суспензией зооспорангиев *P. ramorum* методом укола в центральную жилку листа (рисунок 26).

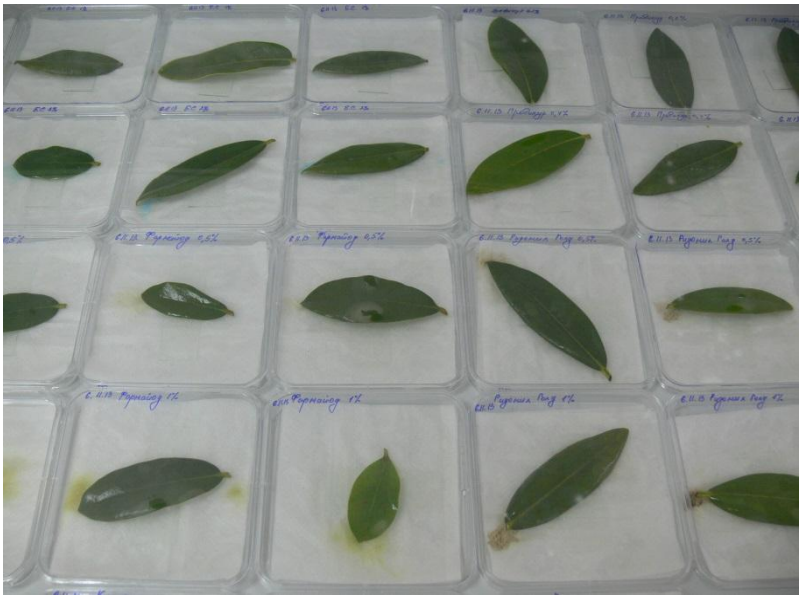


Рисунок 26. Листья рододендрона заражённые *P.ramorum*.

Концентрацию каждого препарата оценивали по 3-х кратной повторности. Отмечали степень развития некрозов на 5, 7, 9 и 12 сутки, оценивая их по 5-ти бальной шкале.

Шкала: 0 – здоровые; 1 – поражено до 25% листа; 2 – до 50%; 3 – до 75%; 4 - до 100% (Методы мониторинга вредителей и болезней леса, Том III, Справочник, М., 2004).

Систематическую оценку результатов проводили по методу Дункан. При выявлении ошибки выше или равном 5% (≥0.05), подтверждается гипотеза о равенстве средних значений. А при уровне ошибки ниже или равном 5% (≤0.05) подтверждается гипотеза о различии средних значений (Приложение 3).

Данные по степени развития некрозов приведены в таблице 31.

Таблица 31

Развитие некрозов на 5-е, 7-е, 9-е и 12-е сутки в баллах.

Препарат, концентрация препарата		**Размер некроза (баллы) ± стандартное отклонение**			
		5 сутки	**7 сутки**	**9 сутки**	**12 сутки**
Контроль		1,0 ± 0,6	1,3 ± 0,3	1,7 ± 0,3	2,7 ± 0,3
Танос	0,15%	0,0 ± 0*	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,3
	0,3%	0,0 ± 0*	0,0 ± 0*	0,0 ± 0*	0,0 ± 0
Скор	0,02%	1,0 ± 0,6*	1,0 ± 0,6*	1,0 ± 0,6*	1,3 ± 0,9
	0,04%	0,7 ± 0,3*	1,3 ± 0,3*	1,3 ± 0,3*	2,0 ± 0,6*
Бордоская смесь	1%	0,0 ± 0*	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3*	0,7 ± 0,3
	2%	0,3 ± 0,3*	0,7 ± 0,3*	0,7 ± 0,3*	1,3 ± 0,7
Фарма Йод	0,5%	0,3 ± 0,3*	1,3 ± 0,3*	1,7 ± 0,3*	2,7 ± 0,3*
	1%	1,0 ± 0*	1,3 ± 0,3*	1,7 ± 0,3*	2,7 ± 0,3*
Превикур	0.2%	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3*	0,7 ± 0,7
	0.4%	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3*	0,7 ± 0,7
Ридомил Голд МЦ	0,5%	0,0 ± 0*	0,0 ± 0*	0,0 ± 0	0,0 ± 0
	1%	0,0 ± 0*	0,0 ± 0*	0,0 ± 0	0,0 ± 0
Браво	0,5%	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3*	0,7 ± 0,7
	1%	0,3 ± 0,2*	0,3 ± 0,3*	0,7 ± 0,7*	0,7 ± 0,7
Топаз	0,05%	0,7 ±	0,7 ± 0,3*	1,3 ± 0,7*	1,7 ± 0,9*

		0,3*			
	0,1%	1,0 ± 0*	1,0 ± 0*	1,7 ± 0,3*	2,7 ± 0,3*

*- ошибка более 0,05

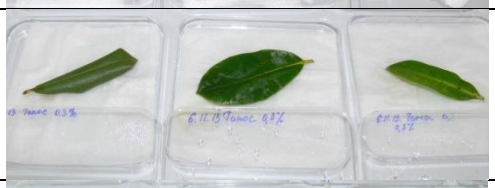
По данным статистической оценки (Приложение 3) варианты с препаратами на 5-е и 7-е сутки не имеют различий по сравнению с контролем, так как величина ошибки средних значений больше 0,05. На 9-е сутки средний балл некроза отличается от контроля только в вариантах с Таносом в первой концентрации и с Ридомил Голд МЦ в обеих концентрациях. На 12-е сутки различий с контролем показали больше препаратов, только Топаз, Фарма йод и Скор во второй концентрации не имеют различий средних баллов некрозов по сравнению с контролем. Возможно, это связано с тем, что бальная система оценки развития некрозов имеет маленькую вариабельность между показателями. Различие между 0 и 1 невелико для систематической оценки. Кроме того, было взято всего 3 повторности, что также сказалось на систематике результатов. Учитывая это, эффективность препаратов будем оценивать на 12-е сутки, где различия между вариантами и контролем максимальны.

По данным таблицы 31 наилучшими подавляющими развитие патогена свойствами обладает фунгицид Ридомил Голд МЦ, о чем свидетельствует отсутствие некрозов на листьях. Эти данные подтверждают результаты, полученные иностранными исследователями. Действующие вещества фунгицида снижали развитие болезни на побегах хвойных (Abies sp.) и подавляли развитие болезни на листьях рододендрона и калины (Chastagner et al., 2007; Turner et al.,2006). Танос также подавлял развитие *P. ramorum*, но только в концентрации 0,3%. Браво и Превикур оказывали ингибирующее действие на патогена, но не подавляли полностью его развитие, причем различий между концентрациями нет. В исследованиях Тернера (2006) действующее вещество превикура пропамокарб гидрохлорид подавлял развитие болезни на листьях рододендрона, хлороталонил действующее вещество Браво в тестах Честегнера (2007) снижал степень

развития болезни только на побегах хвойных. Бордоская смесь также снижала развитие некрозов, но ниже чем предыдущие препараты. Фунгициды Скор, Топаз и Фарма йод не оказывали подавляющего эффекта.

Таблица 32

Образование некрозов на листьях рододендрона на 7-е сутки.

Препарат	Концентрация	
Контроль		
Танос		
Скор		
Бордоская смесь		
Фарма йод		
Превикур		
Ридомил Голд МЦ		
Браво		
Топаз		

После того, как некрозам были присвоены соответствующие баллы, вычисляли развитие болезни по формуле: R = ∑(a x b) x100 / N x K (см. Материалы и методы).

Согласно данным таблицы 33 видно, что большинство препаратов оказало замедляющее действие на развитие патогена, так как степень развития болезни была значительно ниже по сравнению с контролем. Такие препараты, как Танос в концентрации 0,3% и Ридомил Голд МЦ предотвратили заражение листа; некрозы в процессе опыта не образовались.

Таблица 33

Развитие болезни, %.

Препарат и его концентрация	Развитие болезни на 5 сутки	Развитие болезни на 7 сутки	Развитие болезни на 9 сутки	Развитие болезни на 12 сутки
Контроль	25%	33,3%	41,7%	66, 7%
Танос 0,3%	0%	0%	0%	0%
Танос 0,15%	0%	8,3%	8,3%	8,3%
Скор 0,02%	25%	25%	25%	33,3%
Скор 0,04%	16,7%	33,3%	33,3%	50%
Бордоская смесь 1%	0%	8,3%	8,3%	16,7%
Бордоская смесь 2%	8,3%	16,7%	16,7%	33,3%
Фарма йод 0,5%	8,3%	33,3%	41,7%	66,7%
Фарма йод 1%	25%	33,3%	41,75%	66,7%
Превикур 0.2%	8,3%	8,3%	8,3%	16,7%
Превикур 0.4%	8,3%	8,3%	8,3%	16,7%
Ридомил Голд МЦ 0,5%	0%	0%	0%	0%
Ридомил Голд МЦ 1%	0%	0%	0%	0%
Браво 0,5%	8,3%	8,3%	8,3%	16,7%
Браво 1%	8,3%	8,3%	16,7%	16,7%
Топаз 0,05%	16,7%	16,7%	33,3%	41,7%
Топаз 0,1%	25%	25%	41,7%	66,7%

После определения степени развития болезни вычисляли биологическую эффективность препаратов по формуле: Б = (Rк – Ro)x100% (см. Материалы и методы).

Данные по эффективности препаратов представлены в таблице 34. Препараты Ридомил Голд МЦ и Танос в концентрации 0,3% показали 100% биологическую эффективность. Эффективность Бордоской смеси в опыте на

листьях составила 82,8% и 56,7% для концентраций 1% и 2% соответственно, что несколько ниже чем в опыте на питательной среде, а препарат Превикур наоборот оказал большее подавляющее действие на развитие патогена, чем на питательной среде, его биологическая эффективность составила 74,5%. Меньше всего противо фитофторозное действия оказали Топаз, Скор и Фарма йод.

Таблица 34

Биологическая эффективность препаратов.

Препарат и его концентрация	БЭ на 5 сутки	БЭ на 7 сутки	БЭ на 9 сутки	БЭ на 12 сутки	Средняя БЭ
Танос 0,3%	100%	100%	100%	100%	100%
Танос 0,15%	100%	75,1%	81,1%	87,6%	86%
Скор 0,02%	0%	24,9%	40%	50%	28,7%
Скор 0,04%	33,2%	0%	20%	25%	19,6%
Бордоская смесь 1%	100%	76,3%	80%	75%	82,8%
Бордоская смесь 2%	66,8%	49,8%	60%	50%	56,7%
Фарма йод 0,5%	66,8%	0%	0%	0%	16,7%
Фарма йод 1%	0%	0%	0%	0%	0%
Превикур 0.2%	66,8%	76,3%	80%	75%	74,5%
Превикур 0.4%	66,8%	76,3%	80%	75%	74,5%
Ридомил Голд МЦ 0,5%	100%	100%	100%	100%	100%
Ридомил Голд МЦ 1%	100%	100%	100%	100%	100%
Браво 0,5%	66,8%	76,3%	80%	75%	74,5%
Браво 1%	66,8%	76,3%	60%	75%	69,5%
Топаз 0,05%	33,2%	49,8%	20%	37,5%	35,1%
Топаз 0,1%	0%	24,9%	0%	0%	6,2%

Обобщая данные, полученные из обоих экспериментов, можно сделать вывод, что наиболее эффективным препаратом, подавляющим развитие *P. ramorum,* является Ридомил Голд МЦ. Он показал 100% эффективность как на питательной среде, так и на листьях рододендрона. Этот фунгицид обладает контактным и системным действием и его можно рекомендовать к испытаниям на живых растениях. Танос - защитный и лечащий фунгицид контактного и системного действия - полностью подавлял развитие патогена на питательной среде и листьях в концентрации 0.3%.

Фунгицид Бордоская смесь полностью ингибировал рост патогена на питательной среде, но на листьях оказал не такое сильное влияние. Это связано с тем, что препарат имеет контактное действие, то есть он не проникает внутрь растения, а остается на поверхности листа и оказывает защитное действие, подавляя прорастание спор.

Браво оказал среднее ингибирующее действие на развитие патогена и на питательной среде, и на листьях рододендрона. Это защитный фунгицид контактного действия, который препятствует прорастанию и предотвращает заражение растений. Его можно использовать только для предотвращения заболевания, но не в качестве искореняющего препарата.

Фунгициды Превикур и Фарма йод показали неоднозначные данные. Превикур не оказывал ингибирующего действия на питательной среде, но показал неплохой эффект в опыте с листьями. Фарма йод 100% эффективен на питательной среде, но совсем не работает на листьях. Фарма йод не проникает внутрь растения, оставаясь на поверхности, поэтому не эффективен против фитофтор, которые находятся внутри ткани. Превикур же защитный фунгицид системного действия. Он проникает внутрь растения и частично сорбируется листьями.

Скор и Топаз в обоих опытах не оказывали подавляющего действия на *P. ramorum*, но эти препараты и не обладают такими свойствами. Они рекомендованы к применению против широкого круга патогенов из классов аскомицетов, базидиомицетов, дейтеромицетов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная работа показала, что возбудители фитофтороза вызывают поражения древесных растений в южных регионах России. Из литературы известно, что эти патогены могут вызывать эпифитотии на таких ценных породах деревьев, как дуб, бук, граб и некоторые другие. Поэтому возбудители фитофторозов древесных растений должны постоянно контролироваться как в привозном материале, так и в зеленых насаждениях.

Для проведения мониторинга необходима разработка методов диагностики. В результате данной работы разработаны праймеры и зонды для ПЦР «в реальном времени», протестированы на российских штаммах импортные диагностические системы, отработаны подходы к идентификации опасных возбудителей фитофторозов по морфолого-культуральным признакам. В целом, созданы методические подходы к проведению мониторинга фитофторозов в зеленых насаждениях, питомниках, посадочном материале.

Мы считаем, что мониторинг развития фитофторозов древесных растений должен быть продолжен; это единственно возможный путь избежать огромных потерь от массовой гибели самых ценных пород деревьев, как это уже было в некоторых странах мира.

ВЫВОДЫ

1. В результате мониторинга 19 питомников в 6 регионах России было отобрано и проанализировано 313 образцов вегетативных частей растений и почвы. В исследуемых образцах было выявлено 24 вида грибов; возбудителей фитофторозов выявлено не было. Также было проанализировано 407 проб из 24 естественных насаждений в 3 южных областях России. Всего в естественных насаждениях было выявлено 47 видов грибов, из них 4 вида фитопатогенных оомицетов рода *Phytophthora: P. cactorum, P. citricola, P. plurivora* и *P. pini*.
2. Подобраны праймеры и зонды для ПЦР «в реальном времени», которые позволяют идентифицировать *P. ramorum* и *P. citricola* как по отдельности, так и вместе в одной пробирке. Разработанные зонды не дают ложноположительных результатов и могут быть рекомендованы для использования в карантинных лабораториях. Определено, что оптимальным местом в образце растительной ткани для выделения ДНК является зона между здоровой и некротизированной тканями; наилучшими методами для выделения ДНК из растительной ткани являются метод Doyle и метод выделения ДНК на основе магнитных частиц.
3. Для выявления оомицетов рода *Phytophthora* в воде наиболее эффективным является метод биоприманок с последующим выделением на селективные питательные среды с антибиотиками. Применение листьев рододендрона в качестве биоприманок позволило выявить *P. gonapodyides, P. polonica, P. megasperma* и *Phytopythium litorale* в водоемах естественных насаждений.
4. Наиболее эффективными препаратами, подавляющими развитие патогена на листьях и в питательной среде, были Ридомил Голд МЦ МЦ и Танос. Бордоская смесь и Фарма-Йод полностью ингибировали рост патогена на питательной среде, но в опыте на листьях были малоэффективны. Превикур, напротив, не оказывал ингибирующего действия на питательной среде, но был эффективен в опыте с листьями. Препарат Браво оказал среднее ингибирующее действие на развитие патогена на питательной среде и на

листьях рододендрона. Скор и Топаз не оказывали подавляющего действия на *P. ramorum*.

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные результаты могут быть использованы в фундаментальных научных и прикладных исследованиях в профильных лабораториях, отделах и институтах системы Российской академии наук. Данные, полученные в ходе работы, могут использоваться при планировании фитосанитарных мониторингов древесных растений, а также для поведения карантинной лабораторной экспертизы растительного материала в ФГБУ ВНИИКР и могут быть рекомендованы для других лабораторий и научно-исследовательских организациях. Кроме этого, они могут быть полезны Российским фирмам, разрабатывающим тест-системы для диагностики фитопатогенов.

Результаты по эффективности фунгицидов в отношении *P. ramorum* могут использоваться при планировании системы защиты растений от этого патогена, а также, при разработке фитосанитарных мер в очагах заболевания, в случае возникновения таковых. Также, они могут быть интересны для компаний, занимающихся производством пестицидов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность и признательность научному руководителю С.Н. Еланскому за консультации, помощь в написании и определении основных направлений работы; заместителю директора ФГБУ ВНИИКР Е.С. Мазурину за консультации по научным вопросам; начальнику научно-экспериментального отдела ФГБУ ВНИИК И.О. Камаеву за помощь по систематической обработке данных; сотрудникам лаборатории микологии ФГБУ ВНИИКР О.В. Скрипка, М.Б. Копиной, И.П. Дудченко за помощь в проведении исследований; сотрудникам Пятигорского филиала В.В. Петиной, М.С. Чернову и сотрудникам Карельского и Ивановского филиалов ФГБУ ВНИИКР за помощь в проведении мониторинга, а также сотрудникам кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова за поддержку и помощь в проведении работы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах из перечня ВАК

Шероколава Н.А., Сурина Т.А., Скрипка О.В., Дудченко И.П., Александров И.Н. Усыхание дуба в Орловской области // Защита и карантин растений. 2007. №10. С. 33-35.

Александров И.Н., Скрипка О.В., Дудченко И.П., Сурина Т.А., Никифоров С.В. Фитофтороз земляники // Защита и карантин растений. 2007. №5. С. 32-34.

Сурина Т.А., Еланский С.Н., Мазурин Е.С. Мониторинг на выявление фитофтороза древесных и кустарниковых растений // Защита и карантин растений. 2015. №1. С. 42-43.

Статьи в других периодических изданиях и сборниках

Александров И.Н., Сурина Т.А., Скрипка О.В., Дудченко И.П. К вопросу об усыхании дуба на Русской Равнине// Международная организация по биологической борьбе с вредными животными и растениями. Бюллетень № 7. Пушкино. 2007. С. 9-11.

Тезисы и материалы конференций

Сурина Т.А., Копина М.Б. Диагностика возбудителей рода *Phytophthora* методом ПЦР «в реальном времени»// Современная микология России. Т3. Материалы 3-го Съезда микологов России. 2012. С. 318.

Скрипка, О. В. Сурина Т. А., Дудченко И. П., Никифоров С. В. Микромицеты посадочного материала сосны и дуба// Материалы всероссийской научной конференции с международным участием «Роль ботанических садов и охраняемых природных территорий в изучении и сохранении разнообразия растений и грибов. 13-16 октября 2011г., Ярославль. С .97-99.

Шероколава Н.А., Скрипка О.В., Александров И.Н., Дудченко И.П., Сурина Т.А., Никифоров С.В. Патогенная микофлора древесных культур в

Европейской части России// Современная микология в России. Т.2 Тезисы докладов II съезда микологов России. 2008. С. 213.

Kopina M., Surina T. Development molecular markers and probes for *P. ramorum, P. nicotianae, P. citricola, P. fragariae, P. cactorum* detection, The Sixth Meeting of the IUFRO Working Party 7-02-09. *Phytophthora* in Forts and Natural Ecosystems, Córdoba (Spain), 2012.

Surina T., Kopina M., Mazurin E.S. A combination of baits and molecular genetic methods for detection and identification of *Phytophthora* spp, 10th International Congress of Plant Pathology, Beijng, 2013.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров И.Н. Анализ фитосанитарного риска возбудителя фитофтороза древесных и кустарниковых растений *Phytophthora ramorum* для территории Российской Федерации. Утвержден 25 ноября 2007 г. ФГУ «ВНИИКР», М., 2007, 44 с.

2. Веденяпина Е. Г. Популяция *Phytophthora cinnamomi* Rands в почвах различных фитоценозов // Микология и фитопатология. - 1985. - Т. 19. - Вып. 4. - С. 322–329.

3. Веденяпина Е. Г. *Phytophthora cinnamomi* Rands – почвообитающий патоген лесных пород // Экология грибов. Теоретические и прикладные аспекты. СПГУ. - 1992. - С. 13–26.

4. Веденяпина Е. Г. Почвообитающие фитофторы в оранжерейном комплексе Ботанического института РАН // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2010. - № 1. - С. 93–94.

5. Веденяпина Е. Г. Мониторинг почвенных популяций *Phytophthora cinnamomi* при обработке грунта оранжерей Ботанического института различными биопрепаратами / Веденяпина Е. Г., Варфоломеева Е. А. // Современная микология в России. Т. 3: Матер. 3 съезда микологов России. М.: Национал. акад. микол. - 2012. - С. 322–323.

6. Веденяпина Е.Г., Фирсов Г.А. Почвообитающие фитофторы в Ботаническом саду БИН РАН, Санкт-Петербург. II. Результаты двухлетнего мониторинга / Веденяпина Е.Г., Фирсов Г.А., Волчанская А.В., Воробьев Н.И. // Микология и фитопатология. - 2014. - Т. 48. - Вып. 4. - С. 263-273.

7. Жуков А. М., Гниненко Ю. И., Жуков П. Д. Опасные малоизученные болезни хвойных пород в лесах России : изд. 2-е, испр. и доп. / А. М. Жуков, Ю. И. Гниненко, П. Д. Жуков. – Пушкино: ВНИИЛМ. - 2013. – 128 с.

8. Методы мониторинга вредителей и болезней леса, Том III, Справочник, М., 2004.

9. Ребриков Д.В. ПЦР "в реальном времени"/ Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семёнов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. - М.:БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009 – 223 с.

10. Abad Z.G. Occurrence of *Phytophthora* species on various hosts in North Carolina / Abad Z.G., Creswell T., Jones R.K. and Shew H.D. // Plant Disease. 1994. 78(8): P. 830.

11. Akıllı S. Involvement of *Phytophthora* spp. in chestnut decline in the Black Sea region of Turkey / Akıllı S, Serçe U, Katırcıoğlu YZ, Maden S. // Forest Pathology. - 2012. - № 42. - P. 377–386.

12. Allardyce JA. Defining plant resistance to *Phytophthora cinnamomi*: a standardized approach to assessment / Allardyce JA, Rookes JE, Cahill DM. // Journal of Phytopathology. - 2012. - № 160. - P. 269–276.

13. Bakonyi J. PCR-based DNA markers for identifying hybrids within *Phytophthora alni* / Bakonyi J., Nagy Z. Á., and Érsek T. // J. Phytopathology. - 2006. - № 154. P. 168-177.

14. Balci Y. *Phytophthora* spp. associated with forest soils in eastern and north-central U.S. oak ecosystems / Balci Y, Balci S, Eggers J, MacDonald WL, Juzwik J, Long RP, Gottschalk KW. // Plant Disease. - 2007. - № 91. – P. 705-710.

15. Balci Y. First report of *Phytophthora quercina* from oak forests in Austria / Balci Y. and Halmschlager E. // Plant Pathology. - 2003. - № 52. P. 403.

16. Beales PA. A new threat to UK heathland from *Phytophthora kernoviae* on Vaccinium myrtillus in the wild / Beales PA, Giltrap PG, Payne A, Ingram N. // Plant Pathology. - 2009. - № 58. – P. 393–393.

17. Belbahri L. *Phytophthora polonica*, a new species isolated from declining Alnus glutinosa stands in Poland / Belbahri L., Moralejo E., Calmin G., Oszako T., Garcıa J. A., Descals E. and Lefort F. // FEMS Microbiol. Lett. - 2006. - № 261. P. 165–174.

18. Belisario A. First report of *Phytophthora cambivora* causing bleeding cankers and dieback on beech (Fagus sylvatica) in Italy / Belisario A, Maccaroni M, Vettorazzo M. // Plant Disease. - 2006. - № 90. – P. 1362-1362.

19. Bhat R. G. Genetic diversity in populations of *Phytophthora citricola* associated with horticultural crops in California / Bhat R. G., Browne G. T. // Plant Diseaseю - 2007. - № 91. – P. 1556-1563.

20. Bilodeau G. J. Molecular detection of *Phytophthora ramorum* by real-time polymerase chain reaction using TaqMan, SYBR Green, and molecular beacons / Bilodeau G. J., Lévesque C. A., De Cock A. W. A. M., Duchaine C., Brière S., Uribe P., Martin F. N., and Hamelin R. C // Phytopathology. - 2007. - № 97. – P. 632-642.

21. Bilodeau G. Multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death / Bilodeau G., Pelletier G., Pelletier F., Lévesque C. A., and Hamelin R.C. // Can. J. Plant Pathol. - 2009. - № 31. – P. 195-210.

22. Boersma J. G. A survey of wildflower farms in the south-west of Western Australia for *Phytophthora* spp. associated with root rots / Boersma J. G., Cooke D. E. L. and Sivasithamparam K. // Aust. J. Exp. Agric. - 2000. - № 40. – P. 1011-1019.

23. Brasier CM. Multiple new phenotypic taxa from trees and riparian ecosystems in *Phytophthora gonapodyides* - *P. megasperma* ITS Clade 6, which tend to be high-temperature tolerant and either inbreeding or sterile / Brasier CM, Cooke DE, Duncan JM, Hansen EM. // Mycological Research. - 2003. - № 107. – P. 277-290.

24. Brasier CM. *Phytophthora kernoviae* sp. nov., an invasive pathogen causing bleeding stem lesions on forest trees and foliar necrosis of ornamentals in the UK / Brasier CM, Beales PA, Kirk SA, Denman S, Rose J. // Mycological Research. - 2005. - № 109. – P. 853 - 859.

25. Brasier CM. Recent developments in *Phytophthora* diseases of trees and natural ecosystems in Europe / Brasier CM, Jung T. // Progress in Research

on *Phytophthora* Diseases of Forest Trees. Proceedings, 3rd Int. IUFRO Working Party. - 2006. – P. 11–17.

26. Brasier CM. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on Alnus trees / Brasier CM, Kirk SA, Delcan J, Cooke DEL, Jung T, Man In't Veld WA. // Mycological Research. - 2004. - № 108. – P. 1172-1184.

27. Brasier CM. *Phytophthora lateralis* discovered in an old growth Chamaecyparis forest in Taiwan / Brasier CM, Vannini A, Chang TT, Vettraino AM. // Plant pathology. - 2010. – № 59. – P. 595–603.

28. Cahill DM. *Phytophthora cinnamomi* and Australia's biodiversity: impacts, predictions and progress towards control / Cahill DM, Rookes JE, Wilson BA, Gibson L, McDougall KL. // Australian Journal of Botany. - 2008. - № 56. – P. 279–310.

29. Camele I. Detection and identification of *Phytophthora* species in southern Italy by RFLP and sequence analysis of PCR amplified nuclear ribosomal DNA / Camele I., Marcone C. and Cristinzio G. // European Journal of Plant Pathology. - 2005. – № 113. – P. 1-14.

30. Camilo-Alves C.S. Decline of Mediterranean oak trees and its association with *Phytophthora cinnamomi*: a review / Camilo-Alves C.S., Esteves da Clara M.I., Ribeiro N.M. // European Journal of Forest Research. - 2013. - № 132. – P. 411-432.

31. Causin R. An improved method for the detection of *Phytophthora cactorum* (L.C.) Schröeter in infected plant tissues using scar markers / Causin R., Scopel C., Grendene A., and Montecchio L. // J. Plant Pathology. - 2005. - № 87. – P. 25-35.

32. Cerny K. *Phytophthora cambivora* causing ink disease of sweet chestnut recorded in the Czech Republic / Cerny K, Gregorová B, Strnadová V, Tomsovsky M, Holub V, Gabrielová S. // Czech Mycol. - 2008. - № 60. – P. 265–274.

33. Chastagner G. Effectiveness of fungicides in protecting conifers and Rhododendrons from foliar infection by *Phytophthora ramorum* / Chastagner G, DeBauw A, Riley K, Dart N // Sudden Oak Death Science Symposium III, Santa Rosa, California, 5-9 March 2007.

34. Chen Y. Identification of a functional CT-element in the *Phytophthor*a infestans piypt1 gene promoter / Chen Y, Roxby R. // Gene. - 1997. - № 198(1–2). – P. 159–164.

35. Collins S. The long-term survival of *Phytophthora cinnamomi* in mature Banksia grandis killed by the pathogen / Collins S, McComb JA, Howard K, Shearer BL, Colquhoun IJ, Hardy SGEJ. // Forest Pathology. - 2012. - № 42. – P. 28–36.

36. Cooke DEL. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes / Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, Wagels G, Brasier CM. // Fungal Genetics and Biology. - 2000. - № 30. – P. 17 - 32.

37. Cooke D.E.L. Tools to detect, identify and monitor *Phytophthora* species in natural ecosystems / Cooke D.E.L., Schena L., Cacciola S.O. // Journal of Plant Pathology. - 2007. – 89. – P. 13-28.

38. Corcobado T. First report of *Phytophthora gonapodyides* involved in the decline of Quercus ilex in xeric conditions in Spain / Corcobado T, Cubera E, Pérez-Sierra A, Jung T, Solla A. // New Disease Reports. - 2010. - № 22. - P 33.

39. Crandall BS. The distribution and significance of the chestnut root rot *Phytophthoras, P. cinnamomi* and *P. cambivora* // Plant Disease Reporter. - 1950. - № 34. – P. 194–196.

40. Davidson JM. First report of *Phytophthora ramorum* on Douglas fir in California / Davidson JM, Garbelotto M, Koike ST, Rizzo DM. // Plant Disease. - 2002a. - № 86. – P. 1274.

41. Davidson J.M. Transmission of *Phytophthora ramorum* in coast live oak woodlands / Davidson J.M., Wickland A.C., Morse A.C., Tjosvold A., Chambers D.L., Jensen C.E., Slaughter G., Garbelotto M. and Rizzo D.M. //

Abstract, Sudden Oak Death Science Symposium, Monterey, California, 15-18 December 2002b.

42. Davidson JM. Forest type influences transmission of *Phytophthora ramorum* in California oak woodlands / Davidson JM, Patterson HA, Wickland AC, Fichtner EJ, Rizzo DM. // Phytopathology. - 2011. - № 101. – P. 492-501.

43. De Merlier D., Characterization of alder *Phytophthora* isolates from Wallonia and development of SCAR primers / De Merlier D., Chandelier A., Debruxelles N., Noldus M., Laurent F., Dufays E., Claessens H., and Cavelier M. // J. Phytopathol. - 2005. - № 153. – P. 99-107.

44. DeNitto GA. First report of *Phytophthora lateralis* on Pacific yew / DeNitto GA, Kliejunas JT. // Plant Disease. - 1991. - № 75. – P. 968.

45. Denman S. In vitro leaf inoculation studies as an indication of tree foliage susceptibility to *Phytophthora ramorum* in the UK / Denman S, Kirk SA, Brasier CM, Webber JF. // Plant Pathology. - 2005. - № 54. – P. 512–521.

46. Diagnostic protocols for regulated pests. *Phytophthora ramorum* / Bulletin OEPP/EPPO. - 2006. – P. 36-45.

47. Donahoo R. *Phytophthora foliorum* sp. nov., a new species causing leaf blight of azalea / Donahoo R., Blomquist C. L., Thomas, S. L. Moulton, J. K., Cooke D. E. L., and Lamour K. H. // Mycol. Res. - 2006. - № 110. – P. 1309-1322.

48. Doyle JJ. Isolation of plant DNA from fresh tissue / Doyle JJ, Doyle JL. // Focus. - 1990. - № 12. – P. 13-15.

49. Drenth A. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species / Drenth A., Wagels G., Smith B., Sendall B., O'Dwyer C., Irvine, G. and Irwin J. A. G. // Aust. Plant Pathology. - 2006. - № 35. – P. 147-159.

50. Durán A. *Phytophthora pinifolia* sp. nov. associated with a serious needle disease of Pinus radiata in Chile / Durán A., Gryzenhout M., Slippers B., Ahumada R., Rotella A., Flores F., Wingfield, B. D. and Wingfield M. J. // Plant Pathology. - 2008. - № 57. – P. 715-727.

51. Durán A. DNA-based method for rapid identification of the pine pathogen *Phytophthora pinifolia* / Durán A., Slippers B., Gryzenhout M., Ahumada R., Drenth A., Wingfield B. D. and Wingfield M. J. // Research letter. FEMS Microbiol. Lett. - 2009. - № 298. - P. 99-104.

52. Engelbrecht J. Development of a Nested Quantitative Real-Time PCR for Detecting *Phytophthora cinnamomi* in Persea americana Rootstocks / Engelbrecht J, Duong TA, van den Berg N. // Plant Disease. - 2013. - № 97(8). – P. 1012 - 1017.

53. Ersek, T. PCR amplification of species-specific DNA sequences can distinguish among *Phytophthora* species. Appl. Environ / Ersek, T., Schoelz, J. E., and English, J. T. // Microbiology. - 1994. - № 60. – P. 2616-2621.

54. Erwin D.C., Ribeiro O.K. *Phytophthora* diseases world-wide. 1996; APS Press, St Paul, USA.

55. Fichtner EJ. Infectivity and sporulation potential of *Phytophthora kernoviae* to select North American native plants / Fichtner EJ, Rizzo DM, Kirk SA, Webber JF. // Plant Pathology. - 2011. - № 61. – P. 224–233.

56. Gallegly ME, Hong C. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA fingerprints. St. Paul, MN: American Phytopathological Society (APS Press), 2008. p. 158.

57. Gallegly M. E. *Phytophthora pini* Leonian, a valid and distinct species / Gallegly M. E., Hong C., Richardson P. A., Kong P. // Phytopathology. - 2010. - № 100. – P. 207.

58. Garbelotto M. Composting as a control for sudden oak death disease // Biocycle. - 2003a. - № 44. – P. 53-56.

59. Garbelotto M. Non-oak native plants are main hosts for sudden oak death pathogen in California / Garbelotto M, Davidson JM, Ivors K, Maloney PE, Huberli D, Koike ST, Rizzo DM. // California Agriculture. - 2003b. - № 57. – P. 18-23.

60. Garbelotto M. *Phytophthora ramorum* and Sudden Oak death in California: IV. Preliminary studies on chemical control / Garbelotto M, Rizzo

DM, Marais L. // Proceedings of the fifth symposium on oak woodlands: oaks in Californias' changing landscape. San Diego, CA. October 22-25, 2001, Albany, CA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Southwest Research Station. - 2002. - P. 811-817.

61. Garbelotto M. Efficacy of phosphonic acid, metalaxyl-M and copper hydroxide against *Phytophthora ramorum* in vitro and in planta / Garbelotto M, Harnik TY, Schmidt DJ. // Plant Pathology. - 2009. - № 58. – P. 111–119.

62. Garbelotto M. *Phytophthora ramorum* and sudden oak death in California: III. Preliminary studies in pathogen genetics / Garbelotto M., Rizzo D.M., Hayden K., Meija-Chang M., Davidson J.M. and Tjosvold S. // USDA Forest Service Gen. Tech. Rep. - 2002. - PSW-GTR-184. – P. 765-774.

63. Garbelotto M. Phosphite infections and bark applications of Phosphite + PentrabarkTM control sudden oak death in coast live oak / Garbelotto M., Schmidt D.J. and Harnik T.Y.// Arboriculture and Urban Forestry. - 2007. - № 33. – P. 309-317.

64. Ghimire S. R. An in-situ baiting bioassay for detecting *Phytophthor*a species in irrigation runoff containment basins / Ghimire S. R., Richardson P. A., Moorman G. W., Lea-Cox J. D., Ross D. S., Hong C. X. // Plant Pathology. - 2009. - № 58. – P. 577–583.

65. Green S. The destructive invasive pathogen *Phytophthora lateralis* found on Chamaecyparis lawsoniana across the UK / Green S, Brasier CM, Schlenzig A, McCracken A, MacAskill GA, Wilson M, Webber JF. // Forest Pathology. - 2012. - № 43(1). – P. 19–28.

66. Grote D. Specific and sensitive detection of *Phytophthora nicotianae* by simple and nested-PCR / Grote D., Olmos A., Kofoet A., Tuset J. J., Bertolini E. and Cambra M. // Eur. J. Plant Pathology. - 2002. - № 108. – P. 197-207.

67. Grünwald NJ. *Phytophthora obscura* sp nov, a new species that is a member of the novel *Phytophthora* subclade 8d / Grünwald NJ, Werres S, Goss EM, Taylor CR, and Fieland VJ. // Plant Pathology. - 2012. - № 61(3). – P. 610-622.

68. Grünwald NJ. Standardizing the nomenclature for clonal lineages of the sudden oak death pathogen, *Phytophthora ramorum* / Grünwald NJ, Goss EM, Ivors K, Garbelotto M, Martin FN, Prospero S, Hansen E, Bonants PJM, Hamelin RC, Chastagner G, et al. // Phytopathology. - 2009. - № 99. – P. 792-795.

69. Grünwald NJ. Phytophthora-ID.org: a sequence-based *Phytophthora* identification tool / Grünwald NJ, Martin FN, Larsen MM, Sullivan CM, Press CM, Coffey MD, Hansen EM, Parke JL. // Plant Disease. - 2011. - № 95. – P. 337-342.

70. Hansen E. *Phytophthora* species in oak forests of north-east France / Hansen E., Delatour C. // Ann. For. - 1999. - № 56. – P. 539–547.

71. Hansen E.M. Managing Port-Orford-cedar and the introduced pathogen *Phytophthora lateralis* / Hansen E.M.; Goheen D.J.; Jules E.S.; Ullian B. // Plant Disease. - 2000. - № 84(1). – P. 4-14.

72. Hansen E. M. *Phytophthora nemarosa* a new species causing cankers and leaf blight of forest trees in California and Oregon, U.S.A. / Hansen E. M.; Reeser P. W.; Davidson J. M.; Garbelotto M.; Ivors K.; Douhan L.; Rizzo D.M. // Mycotaxon. - 2003. - № 138. – P. 129–138.

73. Hansen E. M. *Phytophthora rosacearum* and *P. sansomeana*, new species segregated from the *Phytophthora megasperma*“complex” / Hansen E. M., Wilcox W. F., Reeser P. W. and Sutton W. // Mycologia. - 2009. - № 101. – P. 129-135.

74. Hardham A.R. *Phytophthora cinnamomi* // Molecular plant pathology. - 2005. - № 6(6). – P. 589–604.

75. Harnik, T.Y. and M. Garbelotto. Effect of Chemicals on Hyphal Growth, Sporangia production and Zoospore Germination of *Phytophthora ramorum* // Sudden Oak Death Science Symposium II, 18-21 January, 2005, Monterey, CA.

76. Hayden KJ. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California forests using a real-time polymerase chain reaction assay /

Hayden KJ, Rizzo D, Tse J, Garbelotto M. // Phytopathology. - 2004. - № 94. – P. 1075-1083.

77. Hayden K. TaqMan chemistry for *Phytophthora ramorum* detection and quantification, with a comparison of diagnostic methods / Hayden K., Ivors K., Wilkinson C. and Garbelotto M. // Phytopathology. - 2006. - № 96. – P. 846-854.

78. Heungens K.Fungicide Control of *Phytophthora ramorum* on rhododendron / Heungens K, De Dobbelaere I, Maes M. // Sudden Oak Death Science Symposium II, Monterey, California, 18-21 January 2005.

79. Ho H. H. A re-evaluation of *Phytophthora* species described by K. Sawada in Taiwan / Ho H. H. and Chang H. S. // Mycotaxon. - 1992. - № 43. – P. 297-316.

80. Hong C. X. *Phytophthora pini* Leonian resurrected to distinct species status / Hong C. X., Gallegly M. E., Richardson P. A., Kong P. // Mycologia. - 2011. - № 103. – P. 351-360.

81. Hong C. X. *Phytophthora hydropathica*, a new pathogen identified from irrigation water, Rhododendron catawbiense and Kalmia latifolia / Hong C. X., Gallegly M. E. Richardson P. A., Kong P., Moorman G. W., Lea-Cox J. D. and Ross D. S. // Plant Pathology. - 2010. - № 59. – P. 913-921.

82. Hong C. X. Pathogenicity to ornamental plants of some existing species and new taxa of *Phytophthora* from irrigation water / Hong C. X., Richardson P. A., Kong P. // Plant Disease. - 2008. - № 92. - P. 1201–1207.

83. Huang J. Detection of *Phytophthora nicotianae* in soil with real-time quantitative PCR / Huang J., Wu J., Li C., Xiao C. and Wang G. // J. Phytopathology. - 2010. - № 158. – P. 15-21.

84. Hughes KJD. Development of a one-step real-time polymerase chain reaction assay for diagnosis of *Phytophthora ramorum* / Hughes KJD, Tomlinson JA, Griffin RL, Boonham N, Inman AJ, Lane CR // Phytopathology. - 2006. - № 96. – P. 975-981.

85. Hughes KJD. Development of a real-time PCR assay for detection of *Phytophthora kernoviae* and comparison of this method with a conventional culturing technique / Hughes KJD, Tomlinson JA, Giltrap PM, Barton V, Hobden E, Boonham N, Lane CR. // European Journal of Plant Pathology. - 2011. - № 131. – P. 695-703.

86. Ilieva, E. *Phytophthora multivesiculata*, a new species causing rot in Cymbidium / Ilieva, E., Man In ‘t Veld, W. A., Veenbaas-Rijks, W., and Pieters, R. // Eur. J. Plant Pathology. - 1998. - № 104. – P. 677-684.

87. Ioos R. SCAR–based PCR primers to detect the hybrid pathogen *Phytophthora alni* and its subspecies causing alder disease in Europe / Ioos R, Husson C, Andrieux A, Frey P. // European Journal of Plant Pathology. - 2005. - № 112. – P. 323-335.

88. Ioos R. Usefulness of single copy genes containing introns in *Phytophthora* for the development of detection tools for the regulated species *P. ramorum* and *P. fragariae* / Ioos R., Laugustin L., Schenck N., Rose S., Husson C. and Frey P. // Eur. J. Plant Pathology. - 2006. - № 116. – P. 171-176.

89. Ippolito A. Real-time detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soil / Ippolito A., Schena L., Nigro F., Soleti Ligorio V. and Yaseen T. // Eur. J. Plant Pathology. - 2004. - № 110. – P. 833-843.

90. Irwin J. A. G. *Phytophthora macrochlamydospora*, a new species from Australia // Mycologia. - 1991. - № 83. – P. 517-519.

91. Jules E. S. Spread of an invasive pathogen over a variable landscape: a non-native root rot on Port Orford cedar / Jules E. S., M. J. Kaufmann W. Ritts and A. L. Carroll. // Ecology. - 2002. - № 83. – P. 3167–3181.

92. Jung, T. *Phytophthora quercina* sp. nov., causing root rot of European oaks / Jung, T., Cooke, D.E.L., Blaschke, H., Duncan, J.M. & Osswald, W. // Mycological Research. - 1999. - № 103. – P. 785-798.

93. Jung T. Involvement of soilborne *Phytophthora* species in Central European oak decline and the effect of site factors on the disease / Jung T., Blaschke H. and Oßwald W. // Plant Pathology. - 2000. - № 49. – P. 706-718.

94. Jung T. Re-evaluation of *Phytophthora citricola* isolates from multiple woody hosts in Europe and North America reveals a new species Phytophthora plurivora sp. nov. / Jung T., Burgess T. // Persoonia. - 2009. - № 22. – P. 95-110.

95. Jung T. Multiple new *Phytophthor*a species from ITS clade 6 associated with natural ecosystems in Australia: evolutionary and ecological implications / Jung T., Stukely M. J. C., Hardy G. E. S. J., White D., Paap T., Dunstan, W. A. and Burgess T. I. // Persoonia. - 2011. - № 26. – P.13-39.

96. Kanaskie A. Swiss Needle Cast Aerial Surveys, 1996 to 2006 / Kanaskie A., M. McWilliams K. Sprengel and D. Overhulser. // Swiss Needle Cast Cooperative Annual Report. College of Forestry, Oregon State University. - 2006. - P. 9-11.

98. Kelly M. Landscape dynamics of the spread of Sudden Oak Death / Kelly M. and R. Meentemeyer. // Photogrammetric Engineering and Remote Sensing. - 2002. - № 68(10). – P. 1001-1009.

99. Kong P. Rapid detection of *Phytophthora cinnamomi* using PCR with primers derived from the Lpv putative storage protein genes / Kong P., Hong C. X. and Richardson P. A. // Plant Pathology. - 2003. - № 52. – P. 681-693.

100. Kox L. F. F. Diagnostic values and utility of immunological, morphological, and molecular methods for in planta detection of *Phytophthora ramorum* / Kox L. F. F., Van Brouwershaven I. R., Van De Vossenberg B. T. L. H., Van Den Beld H. E., Bonants P. J. M. and De Gruyter J. // Phytopathology. - 2007. - № 97. – P. 1119-1129.

101. Kroon LP. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences / Kroon LP, Bakker FT, van den Bosch GB, Bonants PJ, and Flier WG. // Fungal Genetics and Biology. - 2004a. - № 41. – P. 766–782.

102. Kroon LPNM. A rapid diagnostic test to distinguish between American and European populations of *Phytophthora ramorum* / Kroon, L. P. N. M., Verstappen, E. C. P., Kox, L. F. F., Flier, W. G., and Bonants, P. J. M. // Phytopathology. - 2004b. - № 94. – P. 613-620.

103. Kroon LPNM. The genus *Phytophthora* anno 2012 / Kroon LPNM, Brouwer H, de Cock AWAM, Govers F. // Phytopathology. - 2012. - № 102(4). – P. 348 - 364.

104. LaCourt I. The use of nested primers in the polymerase chain reaction for the detection of *Phytophthora fragariae* and *P. cactorum* in strawberry / LaCourt I., Bonants P. J. M., Van Gent-Pelzer M. P. E., Cooke D. E. L., Hagnaar-De Weerdt M., Surplus L. and Duncan J. M. // Acta Hortic. - 1997. - № 439. - P. 829-838.

105. Lane C.R. Evaluation of a rapid diagnostic field test kit for identification of *Phytophthora* species, including *P. ramorum* and *P. kernoviae* at the point of inspection / Lane, C.R., Hobden, E., Walker, L., Barton, V.C., Inman, A.J., Hughes, K.J.D., Swan, H., Colyer, A., and Barker, I. // Plant Pathology. - 2007. - № 56. – P. 828-835.

106. Linderman R.G. Evaluation of chemical agents for control of *Phytophthora ramorum* and other species of *Phytophthora* on nursery crops / Linderman R.G. and Davis E.A. // Plant Health Progress. - 2008. - № 10. – P. 1094.

108. Martin FN. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material / Martin FN, Tooley PW, Blomquist C. // Phytopathology. - 2004. - № 94. – P. 621-631.

109. Martin FN. Phylogenetic relationships of *Phytophthora ramorum, P. nemorosa*, and *P. pseudosyringae*, three species recovered from areas in California with sudden oak death / Martin FN, Tooley PW. // Mycological research. - 2003. - № 107. – P. 1379–1391.

110. Meng J. Rapid detection of *Phytophthora nicotianae* in infected tobacco tissues and soil samples based on its Ypt1 gene / Meng J. and Wang Y. // J. Phytopathology. - 2010. - № 158. – P. 1-7.

111. Minerdi D. Conventional PCR and real time quantitative PCR detection of *Phytophthora cryptogea* on Gerbera jamesonii / Minerdi D., Moretti M., Li Y., Gaggero L., Garibaldi A. and Gullino M. L. // Eur. J. Plant Pathology. - 2008. - № 122. – P. 227-237.

112. Moralejo E. A new host and phenotypic variation of *Phytophthora hedraiandra* in Spain / Moralejo E, Belbahri L, García JA, Lefort F, Descals E // Spanish Journal of Agriculture Research. - 2007. - № 5. – P. 82–85.

113. Mrazkova M. First report of root rot of pedunculate oak and other forest tree species caused by *Phytophthora plurivora* in the Czech Republic / Mrazkova M., Cerny K., Tomsovsk, M., Holub V., Strnadova V., Zlatohlavek A., Gabrielova S., Tarouca S. // Plant Disease. - 2010. - № 94. – P. 272.

114. Murray MS. Susceptibility of Pacific Yew to *Phytophthora lateralis* / Murray MS, Hansen EM. // Plant Disease. - 1997. - № 81. – P. 1400-1404.

115. Nechwatal J. A combination of baiting and PCR techniques for the detection of *Phytophthora quercina* and *P. citricola* in soil samples / Nechwatal J., Schlenzig A., Jung T., Cooke D.E.L., Duncan J.M. and Oßwald W.F. // Forest Pathology. - 2001. - № 31. – P. 85- 97.

116. Nelson S. *Phytophthora morindae*, a new species causing black flag on Noni (Morinda citrifolia L) in Hawaii / Nelson S and Abad ZG. // Mycologia. - 2010. - № 102. – P. 122–134 95.

117. O'Brien, P. A. PCR primers for specific detection of *Phytophthora cinnamomi* // Aust. Plant Pathology. - 2008. - № 37. – P. 69-71.

118. Orlikowski LB. *Phytophthora* root and collar rot of mature Fraxinus excelsior in forest stands in Poland and Denmark / Orlikowski LB, Ptaszek M, Rodziewicz A, Nechwatal J, Thinggaard K, Jung T. // Forest Pathology. - 2011. - № 41. – P. 510–519.

119. Pérez-Sierra A. Previously unrecorded low-temperature *Phytophthora* species associated with Quercus decline in a Mediterranean forest in eastern Spain / Pérez-Sierra A, López-García C, León M, García-Jiménez J, Abad-Campos P, Jung T. // Forest Pathology. - 2013. - № 43(4). – P. 331–339.

120. Ramsfield TD. *Phytophthora kernoviae* – of southern hemisphere origin? / Ramsfield TD, Dick MA, Beever RE, Horner IJ. // 4th IUFRO Phytophthoras in Forests & Natural Ecosystems. - 2007.

121. Risk Analysis of *Phytophthora ramorum*, a Newly Recognised Pathogen Threat to Europe and the Cause of Sudden Oak Death in the USA (Acronym-RAPRA). EU Sixth Framework Project Contract Number 502672. 26 February 2009.

122. Ristaino JB. A Lucid key to the common species of *Phytophthora* // Plant Disease. - 2012. - № 96. – P. 897-903.

123. Rizzo DM. *Phytophthora ramorum*: integrative research and management of an emerging pathogen in California and Oregon forests / Rizzo DM, Garbelotto M, Hansen EM. // Annual Review of Phytopathology. – 2005. - № 43. – P. 309.

124. Scanu B. Occurrence of *Phytophthora cinnamomi* in cork oak forests in Italy Belbahri L / Scanu B, Linaldeddu BT, Franceschini A, Anselmi N, Vannini A, Vettraino AM. // Forest Pathology. - 2013. - № 43(4). – P. 340–343.

125. Schena L. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a ‘molecular tool box’ for the detection and characterization of *Phytophthora* species / Schena L, Cooke DEL // Journal of Microbiological Methods. - 2006a. - № 67. – P. 70–85.

126. Schena L. Detection and quantification of *Phytophthora ramorum, P. kernoviae, P. citricola* and *P. quercina* in symptomatic leaves by multiplex real-time PCR / Schena L., Hughes K. J. D. and Cooke, D. E. L. // Mol. Plant Pathology. - 2006b. - № 7. – P. 365-379.

127. Schena L. Development and application of a PCR-based ‘molecular tool box’ for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and

natural ecosystems / Schena L., Duncan J. M. and Cooke D. E. L. // Plant Pathology. - 2008. - № 57. – P. 64-75.

128. Schena L. Real-time PCR detection and quantification of soilborne fungal pathogens: the case of *Rosellinia necatrix, Phytophthora nicotianae, P. citrophthora*, and *Verticillium dahlia* / Schena L., Nigro F. and Ippolito A. // Phytopathology Mediterr. - 2004. - № 43. – P. 273-280.

129. Schmidt D. Effect of phosphate treatments on sudden oak death in tanoak and Shreve's oak In: Frankel, Susan J.; Shea, Patrick J.; and Haverty, Michael I., tech. cords / Schmidt D., M. Garbelotto, D. Chambers, S. Tjosvold. // Proceedings of the sudden oak death second science symposium: the state of our knowledge. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-196. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture. - 2006. – P. 263.

130. Schubert R. Detection and quantification of *Phytophthora* species which are associated with root-rot diseases in European deciduous forests by species-specific polymerase chain reaction / Schubert R, Bahnweg G, Nechwatal J, Jung T, Cooke DEL, Duncan JM, Muller-Starck G, Langebartels C, Sandermann J2H, Osswald W. // Forest Pathology. - 1999. - № 29(3). – P. 169 - 188.

131. Stamps DJ. Revised tabular key to the species of *Phytophthora* / Stamps DJ, Waterhouse GM, Newhook FJ, Hall GS. // Mycological papers. - 1990. - № 162. – P. 1-28.

132. Sutton W. Stream monitoring for detection of *Phytophthora ramorum* in Oregon tanoak forests / Sutton W, Hansen EM, Reeser PW, Kanaskie A. // Plant Disease. - 2009. - № 93. – P. 1182–1186.

133. Swiecki TJ. Evaluation of stem water potential and other tree and stand variables as risk factors for *Phytophthor*a canker development in coast live oak and tanoak / Swiecki TJ, Bernhardt EA. // Phytosphere Research. - 2003. – 31pp.

134. Tomlinson J. A. Faster, simpler, more specific methods for improved molecular detection of *Phytophthora ramorum* in the field / Tomlinson J. A., Barke, I. and Boonham N // Appl. Environ. Microbiol. - 2007. - № 73. – P. 4040-4047.

135. Tooley P. W. Development of PCR primers from internal transcribed spacer region 2 for detection of *Phytophthora* species infecting potatoes / Tooley P. W., Bunyard B. A., Carras M. M. and Hatziloukas E. // Appl. Environ. Microbiol. - 1997. - № 63. P. 1467-1475.

136. Tooley P. W. Real-time fluorescent polymerase chain reaction detection of *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora pseudosyringae* using mitochondrial gene regions / Tooley P. W., Martin F. N., Carras M. M. and Frederick R. D. // Phytopathology. - 2006. - № 96. – P. 336-345.

137. Turner JA. Management of outbreaks of *Phytophthora ramorum* through experimentation / Turner JA, Jennings P, Kaminski K, Wagner S. // RAPRA Project Work Package 3. - 2006a.

138. Turner JA. Chemical control of *Phytophthora ramorum* causing foliar disease in outdoor hardy nursery stock / Turner JA, Jennings P, McDonough S, Humphries G, McPherson M // Final Project Report HNS 123A. - 2006b. - 35pp.

139. Turner JA. Investigation of dry-heat treatment methods for sanitisation of *P. ramorum* and *P. kernoviae* on/in plants / Turner JA, Jennings P, McDonough S. // Internal quarterly reports 1 and 2. Defra Project. - 2006c.

140. Turner JA. Control of *Phytophthora ramorum* in nursery stock / Turner JA, Jennings P, McDonough S, Stonehouse J. // Final Project Report HNS 123. - 2004. - 37pp.

141. Vannini A. Ink disease in chestnuts: impact on the European chestnut / Vannini A, Vettraino AM. // For. Snow Landsc. Res. - 2001. - № 76. – P. 345–350.

142. Vettraino A. Occurrence and distribution of *Phytophthora* species in European chestnut stands, and their association with Ink Disease and crown

decline / Vettraino A, Morel O, Perlerou C, Robin C, Diamandis S, Vannini A. // European Journal of Plant Pathology. - 2005. - № 111. – P. 169-180.

143. Vettraino AM. Occurrence of *Phytophthora* species in oak stands in Italy and their association with declining oak trees / Vettraino AM, Barzanti GP, Bianco MC, Ragazzi A, Capretti P, Paoletti E, Luisi N, Anselmi N, Vannini A. // Forest Pathology. - 2002. - № 32. – P. 19–28.

144. Walters K. *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora kernoviae* in England and Wales—Public Consultation and New Programme Frankel SJ, Kliejunas JT, Palmieri KM / Walters K, Sansford C, Slawson D. // Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-229. - 2009. – P. 6-14.

145. Waterhouse GM. Key to the species of *Phytophthora* de Bary // Mycological Papers. - 1963. - № 92. – P. 1-22.

146. Werres S. *Phytophthora ramorum* sp. nov., a new pathogen on Rhododendron and Viburnum / Werres S, Marwitz R, Man_In't_veld WA, De Cock AWAM, Bonants PJM, De Weerdt M, Themann K, Ilieva E, Baayen RP. // Mycological Research. - 2001. - № 105. – P. 1155 - 1165.

147. Winton LM. Molecular diagnosis of *Phytophthora lateralis* in trees, water, and foliage baits using multiplex polymerase chain reaction / Winton LM, Hansen EM. // Forest Pathology. - 2001. - № 31. – P. 275 - 283.

148. Yakabe LE. Identification and frequency of *Phytophthora* species associated with foliar diseases in California ornamental nurseries / Yakabe LE, Blomquist CL, Thomas SL, MacDonald JD. // Plant Disease. - 2009. - № 93. – P. 883-890.

149. www.eppo.int

150. www.defra.gov.uk.

151. www.forestphytophthoras.org

152. www.forestry.gov.uk

153. www.ncbi.nlm.nih.gov

154. www.phytophthoradb.org/protocols.php

155. www.q-bank.eu

Приложение 1

Состав питательных сред для культивирования *Phytophthora* использованных в работе

Агар с соком 8 овощей (V8):

Овощной сок	250 мл
$CaCO_3$	5.0 г
Агар	15.0 г
Дистиллированная вода	До 1 л

Добавить $CaCO_3$ в сок и растворять в течении 15 минут. Центрифугировать смесь при 5000 об./мин. 20 минут. Супернатант довести до 1 л дистиллированной водой, добавить агар. Автоклавировать 20 мин при 120°C.

P_5ARP[H](Jeffers & Martin, 1986):

Кукурузный агар	17.0 г
Пимарицин	5.0 мг
Ампицилин (Na-соль)	250 мг
Рифампицин (растворенный в 1 мл 95% этанола)	10 мг
PCNB	100 мг
гимексазол	22.5 мг
Дистиллированная вода до	1 л

Кукурузный агар расплавляют в дистиллированной воде и стерилизуют автоклавированием при 121 ^{o}C в течение 15 мин. Далее его охлаждают на водяной бане до 50 ^{o}C и добавляют различные антибиотики. Взвешивают: пимарицин 5 мг; ампициллин (Na-соль) 250 мг; рифампицин 10 мг (растворяют в 1 мл 95% спирта); PCNB 100 мг и гексимидазол 75 мг

(30% активного вещества, конечная концентрация 22,5 мкл). Все компоненты растворяют в 10 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют в охлажденную очищенную среду. Питательную среду хранят при 4 ^{o}C в темноте и используют в течение 5 суток.

Агар с кусочками моркови (Werres *et al*., 2001):

Кусочки моркови	50.0 г
Агар	22.0г
Дистиллированная вода до	1л

Синтетическая среда (SNA):

KH_2PO_4	1.0 г
KNO3	1.0 г
MgSO4•7H2O	0.5 г
KCl	0.5 г
Глюкоза	0.2 г
Сахароза	0.2 г
Агар	15.0 г
Дистиллированная вода до	1 л

Овсяная среда

Овсяные хлопья	60 г
Глюкоза	10 г
Агар	20 г
Дистиллированная вода до	1 л

Приложение 2

Величина ошибки средних значений диаметра колоний с препаратами по сравнению с контролем

Препарат	Концентрация	Величина ошибки			
		3	5	7	10
		К	К	К	К
Бордоская смесь	2%	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Бордоская смесь	1%	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Бордоская смесь	0,5%	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Превикур	0.4%	0,004618	0,090976	0,579838	0,197704
Превикур	0.2%	0,000627	0,000040	0,197704	0,008977
Превикур	0.1%	0,000002	0,000002	0,002286	0,000004
Топаз	0,1%	0,000000	0,000001	0,000001	0,000001
Топаз	0,05%	0,000001	0,000001	0,000001	0,000001
Топаз	0,025%	0,000001	0,000002	0,000001	0,000002
Скор	0,04%	0,000002	0,000002	0,000002	0,000010
Скор	0,02%	0,000001	0,000002	0,000002	0,000002
Скор	0,01%	0,000001	0,000002	0,000002	0,000002
Браво	1%	0,000000	0,000001	0,000001	0,000001
Браво	0,5%	0,000001	0,000001	0,000001	0,000001
Браво	0,25%	0,000001	0,000001	0,000001	0,000001
Ридомил Голд МЦ	1%	0,000000	0,000001	0,000000	0,000000
Ридомил Голд МЦ	0,5%	0,000000	0,000001	0,000000	0,000000
Ридомил Голд МЦ	0,25%	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Фарма Йод	1%	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Фарма Йод	0,5%	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Фарма Йод	0,25%	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Танос	0,3%	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000
Танос	0,15%	0,000000	0,000000	0,000001	0,000000
Танос	0,075%	0,000001	0,000001	0,000001	0,000001

*- красным выделена ошибка более 0,05

Приложение 3.

Величина ошибки средних значений баллов некрозов с препаратами по сравнению с контролем

Препарат	Концентрация	Величина ошибки			
		5 сутки	7 сутки	9 сутки	12 сутки
		K	K	K	K
Танос	1	0,178489	0,070798	0,021390	0,000042
Танос	2	0,178126	0,169260	0,062545	0,000408
Скор	1	1,000000	0,616786	0,345054	0,046227
Скор	2	0,636004	1,000000	0,621577	0,280051
Бордоская смесь	1	0,176960	0,171957	0,066586	0,002984
Бордоская смесь	2	0,360293	0,356905	0,165950	0,047709
Фарма Йод	1	0,359240	1,000000	1,000000	1,000000
Фарма Йод	2	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000
Превикур	1	0,368656	0,174204	0,067540	0,003044
Превикур	2	0,363084	0,175194	0,068126	0,003325
Ридомил Голд МЦ	1	0,174204	0,068940	0,020954	0,000044
Ридомил Голд МЦ	2	0,173678	0,068406	0,020226	0,000041
Браво	1	0,354203	0,168498	0,065530	0,002923
Браво	2	0,368066	0,173678	0,167695	0,003378
Топаз	1	0,625489	0,345054	0,575858	0,137366
Топаз	2	1,000000	0,633918	1,000000	1,000000

*- красным выделена ошибка более 0,05

Приложение 4

Праймеры и зонды, использованные в работе

№	Название	5’-3’ последовательность
11.	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
12.	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
13.	Yph 1F	CGA CCA TKG GTG TGG ACT TT
14.	Yph 2R	ACG TTC TCM CAG GCG TAT CT
15.	Phyto 1	CAT GGC GAG CGC TTG A
16.	Phyto 4	GAA GCC GCC AAC ACA AG
17.	Pram F1:	CTA TCA TGG CGA GCG CTT GA
18.	Pram R1	GAA GCC GCC AAC ACA AG
19.	Pram-5	TTA GCT TCG GCT GAA CAA TG
20.	Pram-6	CAG CTA CGG TTC ACC AGT CA
21.	Pram-7	6-FAM ATG CTT TTT CTG CTG TGG GGG TAA - TAMRA
22.	Pram 114-FC	TCA TGG CGA GCG CTG GA
23.	Pram 1527-190-R	AGT ATA TTC AGT ATT TAG GAA TGG GTT TAA AAA GT
24.	Pram 1527-134-T	6-FAM TTC GGG TCT GAG CTA GTA G - TAMRA