

Молекулярно-генетические методы, применяемые для детекции карантинных объектов. Инновации, вызовы и перспективы

* НИКИТИНСКИЙ Д.А.¹, НИКИТИНСКАЯ Е.В.²

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150

¹ ORCID: 0009-0009-1679-9893,
e-mail: denpreffect@gmail.com

² ORCID: 0009-0002-0991-9841,
e-mail: nikitinskajacat@yandex.ru

АННОТАЦИЯ

Карантинные объекты представляют глобальную угрозу для сельского хозяйства, вызывая потери урожая до 30% ежегодно. В связи с климатическими изменениями и развитой международной торговлей, появлением новых крупных поставщиков семенного и посадочного материала, а также готовой продукции требуется своевременно реагировать на новые вызовы – совершенствовать существующие подходы и разрабатывать новые решения для обеспечения продовольственной безопасности, анализа фитосанитарных рисков максимально точными и быстрыми методами. Традиционные методы детекции, такие как микробиологический посев и серологические тесты, требуют значительных временных затрат (до 14 дней) и часто недостаточно специфичны. Молекулярно-генетические подходы, основанные на анализе ДНК/РНК, позволяют решить эти проблемы, обеспечивая раннее обнаружение патогенов до появления симптомов, дифференциацию штаммов на уровне генома, мониторинг резистентности к антибиотикам и пестицидам, возможность оценки эффективности средств защиты, обнаружение латентных патогенов при отсутствии внешних проявлений. Современные молекулярно-генетические технологии революционизируют диагностику карантинных организмов, бактерий, грибов, оомицетов и вирусов. В статье представлен анализ методов, включая метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), изотермическую амплификацию (LAMP), секвенирование нового поколения (NGS) и CRISPR-системы, с акцентом на их уникальные преимущества, существующие ограничения и практическое применение. Особое внимание уделено интеграции этих технологий в фитосанитарный мониторинг для предотвращения распространения карантинных и сельскохозяйственно значимых организмов. Практические результаты, получаемые с использованием молекулярно-генетических методов, демонстрируют, что комбинация методов значительно повышает точность диагностики, а развитие

Molecular genetic methods used for detection of quarantine pests. Innovations, challenges and prospects.

* DENIS A. NIKITINSKY¹,
EKATERINA V. NIKITINSKAYA²

All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU "VNIIEKR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150

¹ ORCID: 0009-0009-1679-9893,
e-mail: denpreffect@gmail.com

² ORCID: 0009-0002-0991-9841,
e-mail: nikitinskajacat@yandex.ru

ABSTRACT

Quarantine pests pose a global threat to agriculture, causing annual crop losses of up to 30%. Due to climate change and developed international trade, the emergence of new large suppliers of seeds and planting material, as well as finished products, it is necessary to promptly respond to new challenges – to improve existing approaches and develop new solutions to ensure food security, analyze pest risks with the most accurate and rapid methods. Traditional detection methods, such as microbiological culture and serological tests, require significant time (up to 14 days) and are often not specific enough. Molecular genetic approaches based on DNA / RNA analysis can solve these problems, providing early detection of pathogens before symptoms appear, differentiation of strains at the genome level, monitoring resistance to antibiotics and pesticides, the ability to assess the effectiveness of protective equipment, and detection of latent pathogens in the absence of external manifestations. Modern molecular genetic technologies are revolutionizing the diagnosis of quarantine pests, bacteria, fungi, oomycetes and viruses. The article presents an analysis of methods, including the polymerase chain reaction (PCR), isothermal amplification (LAMP), next-generation sequencing (NGS) and CRISPR systems, with an emphasis on their unique advantages, existing limitations and practical applications. Particular attention is paid to the integration of these technologies into phytosanitary monitoring to prevent the spread of quarantine and agriculturally significant organisms. Practical results obtained using molecular genetic methods demonstrate that a combination of methods significantly improves the accuracy of diagnostics, and the

портативных платформ расширяет возможности полевых исследований.

Ключевые слова. Карантинные организмы, фитопатогены, ПЦР, LAMP, CRISPR-Cas, NGS, диагностика.

ВВЕДЕНИЕ



Непрерывный рост населения Земли и постоянно возрастающее потребление сельскохозяйственной продукции ставит перед производителями серьезные глобальные задачи. Использование интенсивного метода развития сельского хозяйства ограничено недостатком доступных посевных площадей во всем мире.

На территории РФ основными причинами снижения посевных площадей в последние десятилетия являются в первую очередь экономические факторы (ограничение финансирования, реорганизация коллективных хозяйств, нехватка квалифицированных кадров), перевод площадей в другие категории землепользования, недостаточные мероприятия по борьбе с эрозией почв. Принятая программа по возвращению залежных земель в севооборот показывает высокую эффективность применяемых государством мер регулирования, способствует возвращению залежных земель в севооборот (Barsukova et al., 2021).

Повышению урожайности находящихся в севообороте земель уделяется значительное внимание. Непрерывно разрабатываются новые высокоурожайные культуры, обладающие рядом целевых свойств, таких как устойчивость к засухе, температурам и фитопатогенам. Использование экстенсивного метода развития дает значительный прирост и является основным инструментом для увеличения объемов производства готовой продукции. Основным вызовом для хозяйств, вне зависимости от применяемого метода землепользования, являются патогенные для растений бактерии, вирусы, грибы и оомицеты. Своевременная диагностика и принятие эффективных мер для борьбы с фитопатогенами требуют серьезных затрат и высокой квалификации. Несмотря на значительные усилия, в настоящее время фитопатогены продолжают являться основной угрозой для сельскохозяйственной отрасли. Ежегодно из-за фитопатогенов и вредителей растений теряется до 40% готовой продукции экономически значимых культур (FAO, 2019).

Заболееваемость растений, связанная с погодными условиями и общим фитосанитарным состоянием посевов, может составлять до 80% от всей популяции, при этом урожайность – снижаться более чем на 80%. Чаще всего подобные цифры являются исключением из правил, но даже значительно меньшие значения потерь приводят к катастрофическим последствиям (Назаров и др., 2020).

Тем не менее, по оценкам, указанным в FAO за 2017 г., потери от фитопатогенов ежегодно превышают 220 млрд долларов США (FAO, 2017).

development of portable platforms expands the possibilities of field research.

Key words. Quarantine pests, phytopathogens, PCR, LAMP, CRISPR-Cas, NGS, diagnosis.

INTRODUCTION

The continuous growth of the world's population and the ever-increasing consumption of agricultural products pose serious global challenges for producers. The use of intensive agricultural development methods is limited by the lack of available sown areas worldwide. In the Russian Federation, the main reasons for the decline in sown areas in recent decades are primarily economic factors (limited funding, reorganization of collective farms, lack of qualified personnel), the transfer of areas to other land use categories, and insufficient measures to prevent soil erosion. The adopted program for the return of fallow lands to crop rotation demonstrates the high efficiency of regulatory measures applied by the state, and contributes to the return of fallow lands to crop rotation (Barsukova et al., 2021).

Considerable attention is paid to increasing the productivity of crop rotation lands. New high-yielding crops with some target properties, such as resistance to drought, temperatures and phytopathogens, are continuously developed. The use of an extensive development method provides a significant increase and is the main tool for increasing the volume of finished product production. The main challenge for farms, regardless of the land use method used, are plant-pathogenic bacteria, viruses, fungi and oomycetes. Timely diagnosis and effective measures to control phytopathogens require significant costs and high qualifications. Despite significant efforts, phytopathogens currently continue to be the main threat to the agricultural sector. Up to 40% of finished products of economically significant crops are lost annually due to phytopathogens and plant pests (FAO, 2019). Plant diseases associated with weather conditions and the general phytosanitary condition of crops can be up to 80% of the entire population, while yields can decrease by more than 80%. Most often, such figures are an exception to the rule, but even significantly lower loss values lead to catastrophic consequences (Nazarov et al., 2020).

Nevertheless, according to estimates provided by the FAO for 2017, losses due to phytopathogens exceed US\$220 billion annually (FAO, 2017).

The spread of phytopathogenic organisms is actively facilitated by the globalization of world trade relations, which expands the geography of the presence of invasive pathogens and leads to a significant

Распространению фитопатогенных организмов активно способствует глобализация мировых торговых взаимоотношений, что расширяет географию присутствия инвазивных патогенов и приводит к существенному увеличению последствий заражения и, как следствие, увеличивает потери урожая. Культуры, обладающие высокими потребительскими качествами, вытесняют менее привлекательные, что приводит к сокращению семенного фонда и еще больше увеличивает скорость распространения фитопатогенов.

Необходимо использование комплексной стратегии и современных методов для уменьшения последствий воздействия фитопатогенов, которые помогут предупредить болезни, контролировать качество посадочного материала, эффективность и своевременность использования препаратов и методов, направленных на борьбу с возбудителями болезней и переносчиками.

Чтобы соответствовать целям эффективности, достаточности и безопасности, применяемые методы должны соответствовать критериям специфичности, точности, повторяемости, скорости, доступности и обладать необходимой чувствительностью. Методы должны обеспечивать возможность детекции организмов практически во всех возможных видах образцов, включая растения, почвы, посадочный материал, экстракты и жидкости (Marc Venbrux et al., 2023). Дополнительное практическое требование, предъявляемое к методам детекции, – способность работать с образцами, собранными за некоторое время до исследования и перенесшими транспортировку.

Визуальные, оптические, магнитные и спектральные методы для точного определения фитопатогенов

Для поиска и идентификации традиционно используется визуальный метод обнаружения фитопатогенов. Этот метод имеет как ряд преимуществ, так и ряд существенных недостатков. Несомненным преимуществом является стоимость метода и его относительная простота. Но целый ряд существенных недостатков заставляет использовать более точные методики детекции. К недостаткам можно отнести необходимость практического опыта наблюдателя и глубины знаний в области фитопатологии, возможные ошибки при определении и невозможность определения болезней, не проявляющих себя в момент осмотра (скрытые, латентные заболевания) (Riley et al., 2002). Достаточно простым, но значительно более быстрым решением являются оптические методы. При планировании мероприятий по борьбе с фитопатогенами принято считать, что равномерное внесение препаратов на единицу площади обеспечивает наибольшую эффективность. Оптический метод, напротив, основан на неравномерности проявлений заболеваний и влияния факторов окружающей среды на здоровье растений. Оптические и спектральные методы мониторинга позволяют достаточно точно определять изменения, вызванные заболеваниями, и оптимизировать использование средств для борьбы с ними. Возможность использования для обработки данных такого мониторинга, специализированных программ позволяет быстро анализировать значительные площади посевов, обнаруживать очаговые проявления

increase in the consequences of infection and, as a result, increases crop losses. Crops with high consumer qualities displace less attractive ones, which leads to a reduction in the seed fund and further increases the rate of spread of phytopathogens.

It is necessary to use an integrated strategy and modern methods to reduce the effects of phytopathogens, which will help prevent diseases, control the quality of planting material, the effectiveness and timeliness of the use of drugs and methods aimed at controlling pathogens and vectors.

To meet the objectives of efficiency, adequacy and safety, the methods used should meet the criteria of specificity, accuracy, repeatability, speed, availability and have the necessary sensitivity. The methods should be able to detect pests in almost all possible types of samples, including plants, soils, planting material, extracts and liquids (Marc Venbrux et al, 2023). An additional practical requirement for detection methods is the ability to work with samples collected some time before the study and having undergone transportation.

Visual, optical, magnetic and spectral methods for accurate detection of phytopathogens

The visual detection method is traditionally used for searching and identifying phytopathogens. This method has both advantages and significant disadvantages. The undoubted advantage is the cost and its relative simplicity. However, some significant disadvantages force the use of more accurate detection methods. The disadvantages include the need for the observer's practical experience and profound phytopathology knowledge, possible errors in detection and the impossibility of detecting diseases that do not manifest themselves at the time of inspection (hidden, latent diseases) (Riley et al., 2002). Optical methods are a fairly simple but much faster solution. When planning measures to control phytopathogens, it is generally accepted that uniform application of preparations per unit area provides the greatest efficiency. The optical method, on the contrary, is based on the unevenness of disease manifestations and the influence of environmental factors on plant health. Optical and spectral monitoring methods allow for fairly accurate determination of changes caused by diseases and optimization of the use of means to control them. The ability to use specialized software to process the data from such monitoring allows for rapid analysis of large areas of crops, detection of focal manifestations of diseases, and timely action to prevent the development of diseases (Anne-Katrin Mahlein, 2016). The article by Martinelli in 2015 and Zubler and Yoon in 2020 present data on objective monitoring of the condition of plants exposed to external factors, such as diseases and adverse environmental factors. The spectral characteristics of plants differ significantly from those of healthy plants, making it possible to use the method to detect phytopathogens (Martinelli

заболеваний и своевременно принимать меры для предотвращения развития заболеваний (Anne-Katrin Mahlein, 2016). В статье Martinelli за 2015 г. и Zubler and Yoon за 2020 г. приводятся данные объективного мониторинга состояния растений, находящихся под воздействием внешних факторов, таких как заболевания и неблагоприятные факторы окружающей среды. Спектральные характеристики растений значительно отличаются от характеристик здоровых растений и позволяют применять метод для выявления фитопатогенов (Martinelli et al., 2015; Zubler and Yoon, 2020). Ранее в исследовании Tanner была описана реакция растений на стрессы в виде изменения характера движений, а также изменение содержания хлорофилла в больных растениях, детектируемое тепловым излучением. Современные датчики позволяют активно использовать спектральные методы для определения изменений в электромагнитном излучении, отражаемом или испускаемом живыми организмами (Tanner et al., 2022). Благодаря развитию искусственного интеллекта и возможности его обучения в реальных условиях спектральный анализ получил новые возможности развития. Значительно повысилась точность за счет обучения программ на географически схожих или идентичных площадях, а также увеличились масштабы обследуемых территорий за счет увеличения скорости обработки данных. Практика использования беспилотных летательных аппаратов показывает, что метод эффективен и позволяет экономить значительные финансовые средства благодаря своевременности детекции и минимизации влияния человеческого фактора на точность мониторинга и получаемые результаты. Накопленные базы данных на сегодняшний день позволяют достаточно быстро внедрять метод на различных территориях и быстро специализировать методику для конкретной местности.

Иммунологические или серологические методы

Для определения сложнокультивируемых и некультивируемых организмов были разработаны серологические методы. Бактерии, грибы и вирусы можно обнаруживать без культивирования благодаря использованию моноклональных и поликлональных антител. Продуцируемые микроорганизмами антигенные молекулы могут быть использованы для специфической реакции «антиген – антитело». Связывание антител с антигенами определяется косвенно, с помощью специфических антител, которые конъюгированы с флуорофором или наночастицами. Наиболее часто используемый метод иммуноферментного анализа (ИФА) стал таким популярным благодаря достаточно высокой точности. Реже используются блоттинг и серологически специфическая электронная микроскопия (SSEM). Достоверность и точность иммуноферментного анализа зависит от многих факторов: условий хранения антител, свежести исследуемой пробы и специфических особенностей исследуемого организма. Системы, основанные на использовании поликлональных антител, получившие изначально широкое распространение, часто давали ложноположительные результаты, поэтому возникла необходимость в совершенствовании

et al., 2015; Zubler and Yoon, 2020). Earlier, Tanner's study described the response of plants to stress in the form of changes in the nature of movements, as well as changes in the chlorophyll content of diseased plants, detected by thermal radiation. Modern sensors make it possible to actively use spectral methods to determine changes in electromagnetic radiation reflected or emitted by living organisms (Tanner et al., 2022). Thanks to the development of artificial intelligence and the ability to train it in real conditions, spectral analysis has received new development opportunities. Accuracy has increased significantly due to training programs on geographically similar or identical areas, and the scale of the surveyed areas has increased due to increased data processing speed. The practice of using unmanned aerial vehicles shows that the method is effective and allows saving significant financial resources due to the timeliness of detection and minimization of the influence of the human factor on the accuracy of monitoring and the results obtained. The accumulated databases today make it possible to quickly implement the method in various territories and quickly specialize the methodology for a specific area.

Immunological or serological methods

Serological methods have been developed to detect difficult-to-cultivate and non-culturable organisms. Bacteria, fungi, and viruses can be detected without culturing using monoclonal and polyclonal antibodies. Antigenic molecules produced by microorganisms can be used for a specific antigen-antibody reaction. Binding of antibodies to antigens is determined indirectly using specific antibodies conjugated to a fluorophore or nanoparticles. The most commonly used method is enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), which has become so popular due to its relatively high accuracy. Less commonly used are blotting and serologically specific electron microscopy (SSEM). The reliability and accuracy of ELISA depends on many factors: storage conditions of antibodies, freshness of the sample, and specific features of the organism being studied. Systems based on the use of polyclonal antibodies, which were initially widely used, often gave false-positive results, so there was a need to improve the method. Monoclonal antibodies specific to individual parts of antigen macromolecules – epitopes – have significantly increased the accuracy of tests. Today, there are systems that use both monoclonal and polyclonal antibodies. Both individual tests and ready-made commercial kits for detecting groups of organisms are used. The use of polyclonal antibodies allows detecting multiple epitopes, unlike monoclonal ones, and therefore this approach seems economically justified, despite the existing disadvantages. In addition, the sensitivity of polyclonal antibodies is higher than that of monoclonal ones. The sensitivity of ELISA tests is increased by additional thermal preparation of the sample or by treatment with an enzyme that destroys bacterial cell walls by

метода. Моноклональные антитела, специфичные к отдельным частям макромолекул антигена – эпитопам, позволили значительно повысить точность тестов. На сегодняшний день существуют системы, использующие и моноклональные, и поликлональные антитела. Применяются как отдельные тесты, так и готовые коммерческие наборы для детекции групп организмов. Использование поликлональных антител позволяет детектировать множество эпитопов, в отличие от моноклональных, и поэтому такой подход выглядит экономически оправданным, несмотря на существующие недостатки. Кроме того, чувствительность поликлональных антител выше, чем у моноклональных. Чувствительность ИФА-тестов повышают за счет дополнительной термической подготовки образца или за счет обработки ферментом, разрушающим клеточные стенки бактерий гидролизом пептидогликана – лизоцимом (Martinelli et al., 2015; Mehetre et al., 2021). Существует еще ряд методов, приводящих к увеличению чувствительности теста с помощью предварительного обогащения (инкубация для повышения концентрации патогена). Дополнительное разделение с применением магнитных частиц, покрытых специфичными к мишени антителами, дополнительно очищает пробу и также увеличивает точность (Kohn, 1999; Välimaa et al., 2015). ИФА-метод нашел широкое применение в клинической диагностике из-за сравнительно невысокой стоимости и высокой скорости исследования. Ниже подробно рассмотрим методы, которые используются для исследования растений.

Исследования на основе использования аптамеров

Одной из самых удачных альтернатив применению антител и ПЦР в диагностике патогенов принято считать использование аптамеров. ПЦР – достаточно точный и быстрый метод детекции, но при исследовании загрязненных образцов возможно снижение чувствительности и ингибирование реакции. Использование аптамеров в качестве альтернативы позволяет повысить чувствительность по сравнению с антителами за счет более высокой плотности иммобилизации, простоты введения меток и низкой стоимости синтеза. Синтезированные аптамеры могут быть нацелены на целые организмы, на определенные токсины и прочие специфичные, продуцируемые целевыми организмами биомолекулы. Возможно одновременно использовать несколько мишеней из-за высокой специфичности аптамеров, что позволяет значительно увеличить точность исследования. Аптамеры, представляющие собой сравнительно короткие олигонуклеотиды размером от 10 до 100 букв, проще специализировать к анализу целых организмов, чем к отдельным биомолекулам. Так как использование аптамеров основано на том же принципе, что и использование антител, они могут быть применены для анализа (ИФА). К недостатку систем детекции, основанных на использовании аптамеров, можно отнести чувствительность к вязкости, изменению кислотности и температуры. Активно ведутся разработки систем детекции патогенов растений на основе аптамеров, но на данный момент они применяются не так часто как ИФА или ПЦР (Колесников и др., 2012).

hydrolysis of peptide glycan – lysozyme (Martinelli et al., 2015; Mehetre et al., 2021). There are other methods that increase the sensitivity of the test using preliminary enrichment (incubation to increase the concentration of the pathogen). Additional separation using magnetic particles coated with target-specific antibodies further purifies the sample and also increases accuracy (Kohn, 1999; Välimaa et al., 2015). The ELISA method has found wide application in clinical diagnostics due to its relatively low cost and high speed of research. Below we will consider in detail the methods used for plant research.

Aptamer-based detection systems

One of the most successful alternatives to the use of antibodies and PCR in pathogen diagnostics is considered to be the use of aptamers. PCR is a fairly accurate and fast detection method, but when studying contaminated samples, sensitivity may decrease and the reaction may be inhibited. The use of aptamers as an alternative allows for increased sensitivity compared to antibodies due to higher immobilization density, ease of labeling, and low cost of synthesis. Synthesized aptamers can be targeted at whole organisms, certain toxins, and other specific biomolecules produced by target organisms. It is possible to use several targets simultaneously due to the high specificity of aptamers, which allows for a significant increase in the accuracy of the study. Aptamers, which are relatively short oligonucleotides ranging from 10 to 100 letters in length, are easier to specialize in the analysis of whole organisms than in individual biomolecules. Since the use of aptamers is based on the same principle as the use of antibodies, they can be used for analysis (ELISA). The disadvantage of detection systems based on the use of aptamers is their sensitivity to viscosity, changes in acidity and temperature. Aptamer-based plant pathogen detection systems are being actively developed, but at the moment they are not used as often as ELISA or PCR (Kolesnikov et al., 2012).

Nucleic acid detection assays

The use of modern equipment for first- and next-generation sequencing has made it possible to read the nucleotide sequences of many bacteria, viruses, fungi, and oomycetes. The data obtained is accumulated, and based on a large number of sequences studied, global databases with free access have been created. There are also highly specialized databases focused on target pest groups. Having free access to such databases allows us to constantly improve the storage facilities themselves, data processing methods, expand the databases at the expense of users, and create software to simplify the work of creating microorganism detection systems based on targets focused on nucleic acid sequences – DNA and RNA.

This method has many advantages, but also some disadvantages: it is quite difficult to determine the concentration of the microorganisms being

Анализы на основе детекции нуклеиновых кислот

Использование современного оборудования для секвенирования первого и следующего поколения позволило прочитать нуклеотидные последовательности множества бактерий, вирусов, грибов и оомицетов. Полученные данные аккумулируются, и на основе большого количества исследованных последовательностей созданы общемировые базы со свободным доступом. Также существуют узкоспециализированные базы данных, ориентированные на целевые группы организмов. Наличие свободного доступа к таким базам позволяет постоянно совершенствовать сами хранилища, методы обработки данных, расширять базы за счет пользователей и создавать программное обеспечение для упрощения работы по созданию систем детекции микроорганизмов, основанных на мишенях, ориентированных на последовательности нуклеиновых кислот – ДНК и РНК.

У данного метода множество преимуществ, но есть и некоторые недостатки: достаточно сложно определить концентрацию исследуемых микроорганизмов, невозможно в рамках данной методики определить количество жизнеспособных и нежизнеспособных микроорганизмов в образце. Основной причиной является разная скорость нарастания флуоресценции для различных микроорганизмов в сочетании с разными определяемыми участками и то, что нуклеиновые кислоты нежизнеспособных микроорганизмов способны сохранять длительное время без существенных изменений в образце (Lievens and Tomma, 2005; Lopes et al., 2009; Narayanasamy, 2011).

Классическая ПЦР и ее варианты

Принцип ПЦР был открыт в 1980 г. За разработанный в 1983 г. метод через 10 лет его автор К. Мюллис был удостоен Нобелевской премии. В основе метода классической ПЦР лежит принцип чтения нуклеиновых кислот. Подбираются праймеры из искусственно синтезированной последовательности нуклеотидов таким образом, чтобы в результате реакции можно было достоверно амплифицировать целевой фрагмент ДНК. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы и определяет начало и конец амплифицируемого участка. Недорогой, быстрый и достаточно точный метод основан на воспроизведении целевого участка в термоциклере по заданной программе с использованием фермента ДНК-полимеразы. Очень важна точность подбора праймеров, имеющих, как правило, размер от 15 до 40 п.н. и специально подобранных так, чтобы соответствовать участкам ДНК-мишени. Обнаружение участка целевого размера подтверждает наличие мишени в образце.

Реакция проходит в три этапа:

1. Денатурация. В процессе реакции денатурации две цепи ДНК, связанные водородными связями и являющиеся комплементарными друг другу, разделяют на пару одноцепочечных полинуклеотидных молекул за счет нагревания до температур в диапазоне от 94 до 96 °C.

2. Отжиг. На втором этапе происходит связывание синтезированных праймеров с полученными одноцепочечными ДНК. На этом этапе температуры в амплификаторе снижаются до 45–60 °C.

studied, it is impossible to determine the number of viable and non-viable microorganisms in the sample within the framework of this method. The main reason is the different rate of fluorescence increase for different microorganisms in combination with different areas being determined and the fact that nucleic acids of non-viable microorganisms can persist for a long time without significant changes in the sample (Lievens and Tomma, 2005; Lopes et al., 2009; Narayanasamy, 2011).

Classical PCR and its variants

The principle of PCR was discovered in 1980. For the method developed in 1983, its author K. Mullis was awarded the Nobel Prize 10 years later. The classical PCR method is based on the principle of reading nucleic acids. Primers are selected from an artificially synthesized nucleotide sequence in such a way that the target DNA fragment can be reliably amplified as a result of the reaction. Each of the primers is complementary to one of the strands of the double-stranded matrix and determines the beginning and end of the amplified region. An inexpensive, fast and fairly accurate method is based on reproducing the target region in a thermal cycler according to a given program using the DNA polymerase enzyme. The accuracy of primer selection is very important; as a rule, they are from 15 to 40 bp in size and are specially selected to correspond to the target DNA regions. Detection of a region of the target size confirms the presence of the target in the sample.

The reaction has three stages:

1. Denaturation. In the denaturation reaction, two DNA strands, linked by hydrogen bonds and complementary to each other, are separated into a pair of single-stranded polynucleotide molecules by heating to temperatures in the range of 94 to 96 °C.

2. Annealing. At the second stage, the synthesized primers bind to the obtained single-stranded DNA. At this stage, the temperature in the amplifier is lowered to 45–60 °C.

3. Synthesis. The final stage involves the synthesis of a new DNA chain at a temperature of 72 °C. Synthesis begins from the primer along the DNA chain.

Then all three stages (cycles) are repeated.

At each cycle, the target site is doubled, thus generating the reaction product (Antonova et al., 2011).

When performing classical PCR, the presence or absence of the target site can be assessed by performing electrophoresis in an agarose gel due to the separation of reaction products. The two main disadvantages of the method are the duration of electrophoresis and the possibility of cross-contamination of reagents and materials with amplification products (Maurer, 2011, Kralik, Ricchi, 2017). Despite the additional time required for electrophoresis, the method is faster than traditional cultivation. Ready results can be obtained within a few hours.

The sensitivity and specificity of PCR are assessed separately for each new primer system. Due

3. Синтез. На последнем этапе происходит синтез новой цепи ДНК при температуре 72 °С. Синтез начинается от праймера вдоль цепи ДНК.

Затем все три этапа (цикла) повторяются.

На каждом цикле происходит удвоение целевого участка, таким образом нарабатывается продукт реакции (Антонова и др., 2011).

При проведении классической ПЦР можно оценить наличие или отсутствие целевого участка с помощью проведения электрофореза в агарозном геле за счет разделения продуктов реакции. Двумя основными недостатками метода считаются длительность проведения электрофореза и возможность перекрестного загрязнения реактивов и материалов продуктами амплификации (Mauger, 2011; Kralik, Ricchi, 2017). Несмотря на дополнительное время на проведение электрофореза, метод является более быстрым, чем традиционное культивирование. Готовые результаты могут быть получены в течение нескольких часов.

Чувствительность и специфичность ПЦР оценивается в каждой новой праймерной системе отдельно. Из-за того что при проведении классической ПЦР может возникнуть ингибирование реакции, в некоторых случаях возможны ложноотрицательные результаты. К недостаткам метода относят: невозможность различить жизнеспособные и нежизнеспособные клетки, невозможность одновременного поиска нескольких патогенов и, что самое важное, невозможность амплифицировать целевые участки, общие для всех РНК-вирусов. По этой причине возникла необходимость усовершенствования метода для идентификации патогенов растений (Lopes et al., 2009).

ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени, ПЦР-РВ (qPCR), использует те же самые подходы, что и в классической ПЦР. Целевой участок амплифицируется за счет изменения температуры рабочей смеси, включающей полимеразу и праймеры к целевому участку. Разница между этими методами заключается в том, что за счет добавления в реакцию красителя или зондов появляется возможность регистрировать его свечение в процессе проведения ПЦР. В отличие от классического метода, позволяющего оценивать результаты только по конечной точке, появляется возможность определить количество продукта после каждого цикла (Shen, 2019). В качестве красителя чаще всего используется SYBR green, надежный и доступный по стоимости. Также можно дополнительно оценить процесс, дополнив программу анализом кривых плавления. Принципы и методы подбора праймеров для проведения ПЦР-РВ, а также методы оценки подобранных праймеров на сегодняшний день широко известны и активно применяются в области детекции фитопатогенов, например для определения патогенов злаковых культур (Slovareva et al., 2024). Значительным преимуществом данного метода является возможность применения мультиплексной реакции, основанной на добавлении к праймерам флуоресцентных зондов. Постановка мультиплексной реакции позволяет детектировать одновременно несколько организмов, разделять близкородственные виды и/или штаммы. Для проведения мультиплексной реакции существует ряд

то the fact that inhibition of the reaction may occur during classical PCR, false negative results are possible in some cases. The disadvantages of the method include: the inability to distinguish between viable and non-viable cells, the inability to simultaneously search for several pathogens and, most importantly, the inability to amplify target regions common to all RNA viruses. For this reason, there was a need to improve the method for identifying plant pathogens (Lopes et al., 2009).

Real-time PCR

Real-time PCR, qPCR, uses the same approaches as classical PCR. The target region is amplified by changing the temperature of the working mixture, which includes polymerase and primers to the target region. The difference between these methods is that by adding a dye or probes to the reaction, it becomes possible to record its glow during the PCR process. Unlike the classical method, which allows you to evaluate the results only at the end point, it becomes possible to determine the amount of product after each cycle (Shen, 2019). SYBR green is most often used as a dye, it is reliable and affordable. You can also further evaluate the process by supplementing the program with melting curve analysis. The principles and methods of selecting primers for real-time PCR, as well as the methods for evaluating the selected primers, are now widely known and are actively used in the field of phytopathogen detection, for example, to determine pathogens of cereal crops (Slovareva et al. 2024). A significant advantage of this method is the ability to use a multiplex reaction based on the addition of fluorescent probes to primers. Setting up a multiplex reaction allows you to simultaneously detect several organisms, separate closely related species and / or strains. There are limitations for carrying out a multiplex reaction: in the amplified region, the objects of study must have differences in nucleotide composition or length. Probes, due to their greater specificity compared to SYBR Green and other dyes, release a fluorophore only when binding to the target fragment. TaqMan probes are most often used to create multiplex systems. Modern devices allow you to simultaneously determine 4-6 glow variants and record data in real time. For example, the method was adapted for the detection of *Erwinia amylovora* and allows for high-precision differentiation of several target objects with similar symptoms or having common host plants (Svircev et al. 2009).

The main obstacle to the use of probes is their cost and complexity of selection. The more probes are added to the test tube, the higher the probability of a non-specific reaction (Mirmajlessi et al., 2015). Another important advantage of the method is the ability to determine the number of amplified regions initially present in the sample. Their number in the sample is determined mathematically, based on the deviations of the obtained curve from the standard (reference

ограничений: на амплифицированном участке объекты исследования должны иметь различия в нуклеотидном составе или длине. Зонды за счет большей специфичности по сравнению с SYBR Green и другими красителями высвобождают флюорофор только при связывании с целевым фрагментом. Чаще всего для создания мультиплексных систем применяются зонды TaqMan. Современные приборы позволяют одновременно определять 4–6 вариантов свечения и в режиме реального времени фиксировать данные. Например, метод был адаптирован для детекции *Erwinia amylovora* и позволяет с высокой точностью дифференцировать сразу несколько целевых объектов со сходными симптомами или имеющих общие растения-хозяева (Svircev et al. 2009).

Главным препятствием для использования зондов является их стоимость и сложность подбора. Чем больше зондов добавляется в пробирку, тем выше вероятность неспецифической реакции (Mirzajlessi et al., 2015). Еще одним важным преимуществом метода является возможность определения количества амплифицируемых участков, находящихся в образце изначально. Их число в образце определяется математически, основываясь на отклонениях полученной кривой от стандартной (эталонной кривой). Точность расчетов подтверждается классическими методами разведений (Simon G. et al., 2002; Shen, 2019; Rajagopal et al., 2019).

Цифровая ПЦР

Рассмотренная ранее количественная ПЦР является достаточно совершенным методом, но существует его модернизированная версия, получившая название «цифровая капельная ПЦР» (ddPCR). Этот метод за счет разведений, разделяющих образец на большое количество отдельных образцов (около 20 000 капель), позволяет сделать анализ более точным по сравнению с обычной ПЦР (Hindson et al., 2011; Zhao et al., 2016). Для разделения реакционной смеси, также называемой эмульсионной цифровой ПЦР, используется принцип создания монодисперсных капель вода/масло. Для получения капель можно использовать принцип Т-образной инъекции, метод струй или метод использующий для разделения образца шарики гидрогеля (Лебедева и др., 2024). Метод получил свое название за счет детекции наличия или отсутствия сигнала, результаты которого схожи с двоичным кодом. Разведение образца должно быть подобрано таким образом, чтобы в ячейке оказалась одна ДНК-матрица. Если ДНК-матрица оказалась в ячейке не одна, то результаты могут быть скорректированы статистическим методом Пуассона (Hayden et al., 2013). Добавление интеркалирующих красителей и флуоресцентных зондов позволяет определять наличие и интенсивность реакции. Флуоресценция фиксируется при последовательном пропускании капель через микрофлюидную систему прибора (Hoshino and Inagaki, 2012; Chen et al., 2021).

Существенными преимуществами метода являются: экономичный расход реактивов и малое количество поступающего на исследование образца, устойчивость к примесям, которые потенциально могут ингибировать реакцию ПЦР, отсутствие необходимости стандартной кривой для проведения количественного анализа (Taylor et al., 2017).

curve). The accuracy of the calculations is confirmed by classical dilution methods (Simon G. et al. 2002; Shen, 2019; Rajagopal et al., 2019).

Digital PCR

The previously discussed quantitative PCR is a fairly advanced method, but there is a modernized version called digital droplet PCR (ddPCR). This method, due to dilutions that divide the sample into a large number of individual samples (about 20,000 droplets), allows for more accurate analysis compared to conventional PCR (Hindson et al., 2011; Zhao et al., 2016). To separate the reaction mixture, also called emulsion digital PCR, the principle of creating monodisperse water/oil droplets is used. To obtain droplets, you can use the T-shaped injection principle, the jet method, or a method using hydrogel beads to separate the sample (Lebedeva et al., 2024). The method got its name due to the detection of the presence or absence of a signal, the results of which are similar to a binary code. The sample dilution should be selected in such a way that one DNA matrix is in the cell. If there is more than one DNA template in the cell, the results can be corrected using the Poisson statistical method (Hayden et al., 2013). The addition of intercalating dyes and fluorescent probes allows one to determine the presence and intensity of the reaction. Fluorescence is recorded by sequentially passing droplets through the microfluidic system of the device (Hoshino and Inagaki, 2012; Chen et al., 2021).

The significant advantages of the method are: economical consumption of reagents and a small amount of sample received for study, resistance to impurities that can potentially inhibit the PCR reaction, no need for a standard curve for quantitative analysis (Taylor et al., 2017).

Isothermal amplification of nucleic acids

Diagnostic solutions used to detect pathogens using molecular methods are in high demand, but there is an even greater need for solutions that can be used in non-laboratory settings, in fields, and in protected soil conditions. The effectiveness of plant disease control directly depends on the ability to diagnose on-site and its speed. The use of isothermal amplification of nucleic acids allows us to reduce the requirements for DNA quality and conduct research without the use of bulky amplifiers used for qPCR. In the field, it is enough to use heating elements, simple devices that are much less bulky than an amplifier (Ivanov et al., 2021; Lau and Botella, 2017).

The use of the isothermal amplification method, despite the existing limitations, allows you to quickly and accurately identify phytopathogens, which helps not only to control them, but also prevents the spread of pests.

LAMP isothermal amplification

The principle of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) has found wide application in

Изотермическая амплификация нуклеиновых кислот

Диагностические решения, используемые для детекции патогенов молекулярными методами, широко востребованы, но еще более острая необходимость возникает в решениях, которые можно применять во внелабораторных условиях, на полях и в условиях защищенного грунта. От возможности диагностики на месте и ее скорости напрямую зависит эффективность борьбы с болезнями растений. Использование изотермической амплификации нуклеиновых кислот позволяет снизить требования к качеству ДНК и проводить исследования без использования громоздких амплификаторов, используемых для qPCR. В полевых условиях достаточно применять нагревательные элементы, простые устройства, гораздо менее громоздкие, чем амплификатор (Иванов и др., 2021; Lau and Botella, 2017).

Использование метода изотермической амплификации, несмотря на существующие ограничения, позволяет быстро и точно определять фитопатогены, что помогает не только бороться с ними, но и предупреждает распространение вредных организмов.

LAMP изотермическая амплификация

Принцип петлевой изотермической амплификации (LAMP) нашел широкое применение в сельском хозяйстве и медицине как надежный и достаточно чувствительный полевой и лабораторный метод (Зубик и др., 2021). Для пробоподготовки, также как и для других рассмотренных методов, образец должен быть отобран, гомогенизирован и лизирован для высвобождения ДНК. Гомогенизация вполне успешно может проходить в полевых условиях с помощью механического разрушения клеток в образце. После чего желательно дополнительно лизировать клетки для увеличения итоговой концентрации нуклеиновых кислот. Применение готовых коммерческих наборов позволяет получить ДНК, пригодную для реакции в течении часа, сама реакция тоже занимает около часа, что является достаточно быстрым и приемлемым для анализа растений на фитопатогены в полевых условиях (Ivanov et al., 2021). Основное отличие состоит в том, что при использовании метода LAMP требуется четыре праймера: два праймера, в результате реакции образующие петлю (что дало название этому методу), и пара праймеров, которые будут использоваться для вытеснения получаемых цепей, а также полимеразы. Например, **Bst ДНК-полимераза** – большой фрагмент ДНК-полимеразы *Bacillus stearothermophilus* (полипептид размером 67 кДа). Фермент обладает 5'-3' полимеразной активностью, но не имеет 5'-3' и 3'-5' экзонуклеазных активностей. За счет сильной вытесняющей активности Bst ДНК-полимераза может быть использована для проведения изотермальной амплификации, в том числе петлевой изотермальной амплификации LAMP. Полимераза, благодаря полимеразной активности, формирует одноцепочечную ДНК. За счет комплиментарности внутренних праймеров образуется петлевая структура, по форме напоминающая гантель. Вновь образованные структуры в форме гантели служат удобным объектом для проведения амплификации. Результатом процесса амплификации являются длинные контиги, которые позволяют идентифицировать

agriculture and medicine as a reliable and sufficiently sensitive field and laboratory method (Zubik A. et al., 2021). For sample preparation, as well as for other methods considered, the sample must be collected, homogenized and lysed to release DNA. Homogenization can be quite successfully carried out in the field by mechanically destroying the cells in the sample. After which, it is advisable to additionally lyse the cells to increase the final concentration of nucleic acids. The use of ready-made commercial kits allows you to obtain DNA suitable for the reaction within an hour, the reaction itself also takes about an hour, which is fast enough and acceptable for analyzing plants for phytopathogens in the field (Ivanov et al., 2021). The main difference is that the LAMP method requires four primers: two primers that form a loop in the reaction (which gives the method its name), a pair of primers that will be used to displace the resulting strands, and a polymerase. For example, **Bst DNA polymerase** is a large fragment of *Bacillus stearothermophilus* DNA polymerase (a 67 kDa polypeptide). The enzyme has 5'-3' polymerase activity, but lacks 5'-3' and 3'-5' exonuclease activities. Due to its strong displacement activity, Bst DNA polymerase can be used to perform isothermal amplification, including looped isothermal amplification (LAMP). The polymerase, due to its polymerase activity, forms single-stranded DNA. Due to the complementarity of internal primers, a loop structure is formed, resembling a dumbbell. The newly formed dumbbell-shaped structures serve as a convenient object for amplification. The result of the amplification process are long contigs, which allow for the identification of microorganisms and the detection of pathogens (Craw and Balachandran, 2012; Becherer et al., 2020). The reaction is carried out at a constant temperature of 60–65 °C, usually for 30 to 40 min, and varies slightly depending on the primers used and the size of the region. Also, the analysis time can be reduced by selecting two additional primers for the dumbbell loops, creating additional sites for the polymerase to work. The results of the loop amplification are assessed using traditional electrophoresis, the fluorescence method of dyes, probes, or by assessing turbidity (Mori et al., 2001; Craw and Balachandran, 2012).

Recombinase polymerase amplification

Recombinase polymerase amplification (RPA) is another alternative to classical PCR developed in the UK. This method involves the use of DNA recombinase, primers, single-stranded DNA binding proteins, and strand-displacing polymerase (Piepenburg et al., 2006). The main advantage of the method is that the reaction occurs at temperatures of 37–42 °C. Formally, the reaction can be carried out at normal ambient temperature, but this will require significantly more time. Another significant advantage is the ability to detect not only DNA but also RNA when adding reverse transcriptase directly to the reaction mixture, eliminating the need for cDNA synthesis. The ability

микроорганизмы и определить патогены (Craw and Balachandran, 2012; Becherer et al., 2020). Реакция проводится при постоянной температуре 60–65 °C, как правило от 30 до 40 мин, и незначительно варьируется в зависимости от используемых праймеров и размера участка. Также время анализа может быть уменьшено при подборе двух дополнительных праймеров для петель гантели, создавая дополнительные участки работы полимеразы. Результаты проведенной петлевой амплификации оцениваются с использованием традиционного электрофореза, методом флуоресценции красителей, зондов или с помощью оценки мутности (Mori et al., 2001; Craw and Balachandran, 2012).

Рекомбиназная полимеразная амплификация

Рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA) представляет собой еще одну альтернативу классической ПЦР, разработанную в Великобритании. Это метод, который включает использование ДНК-рекомбиназы, праймеров, белков, связывающих одноцепочечную ДНК, и полимеразы, смещающей цепочки (Piepenburg et al., 2006). Основным преимуществом метода является протекание реакции при температурах 37–42 °C. Формально можно проводить реакцию и при нормальной температуре окружающей среды, но для этого потребуются значительно больше времени. Еще одним существенным преимуществом является возможность при добавлении обратной транскриптазы непосредственно в реакционную смесь детектировать не только ДНК, но и РНК, что избавляет от необходимости синтеза кДНК. Возможность работы с РНК очень важна при работе с растительным материалом. В процессе амплификации рекомбиназы взаимодействуют с праймерами, совмещаясь с целевой последовательностью. При обнаружении целевого участка связанные праймер и рекомбиназа соединятся с комплементарным участком. Полимераза при смещении цепи наращивает гибридный праймер. Процесс протекает в двух направлениях, за счет чего происходит быстрая амплификация целевого участка (Li et al., 2018; Lobato and O'Sullivan, 2018). Амплификация происходит очень быстро и достаточное количество продукта может быть наработано в течение 20 мин. Для оценки результата по конечной точке традиционно используется метод электрофореза в агарозном геле. Также можно использовать флуоресцентные зонды для оценки в реальном времени (Li et al., 2018; Lobato and O'Sullivan, 2018).

Гибридизационные матрицы

В основе метода гибридизации лежит связывание одноцепочечной ДНК/РНК с комплементарной последовательностью (зондом) по принципу Уотсона-Крика (А-Т, G-С). Если используются зонды, подобранные таким образом, чтобы связываться с целевым участком патогена, то флуорофор высвобождается, позволяя определить наличие патогена или его отсутствие, если реакция не происходит.

Известны несколько типов методов, использующих указанные принципы гибридизации.

Саузерн-блоттинг (ДНК) – детекция специфических фрагментов ДНК после электрофореза.

to work with RNA is very important when working with plant material. During the amplification process, recombinases interact with primers, combining with the target sequence. Upon detection of the target region, the bound primer and recombinase will combine with the complementary region. The polymerase extends the hybridized primer during strand displacement. The process occurs in two directions, resulting in rapid amplification of the target region (Li et al., 2018; Lobato and O'Sullivan, 2018). The amplification occurs very quickly and a sufficient amount of product can be produced within 20 min. Agarose gel electrophoresis is traditionally used to evaluate the endpoint result. Fluorescent probes can also be used for real-time evaluation (Li et al., 2018; Lobato and O'Sullivan, 2018).

Hybridization matrices

The hybridization method is based on the binding of single-stranded DNA/RNA to a complementary sequence (probe) according to the Watson-Crick principle (A-T, G-C). If probes are selected in such a way as to bind to the target site of the pathogen, the fluorophore is released, allowing the presence of the pathogen to be determined or its absence if the reaction does not occur.

There are several types of methods using the above hybridization principles.

Southern blotting (DNA) is the detection of specific DNA fragments after electrophoresis. Northern blotting (RNA) is the analysis of gene expression via RNA. Dot blotting is the point application of samples to a membrane without electrophoresis. Microarrays (DNA chips) allow high-throughput analysis of thousands of genes simultaneously.

But the most interesting for the purposes of working with plant material are hybridization matrices. The matrix is a solid-phase support (for example, a nylon membrane or a glass chip) onto which probes are applied. This design allows for the simultaneous detection of many pathogens, the possibilities are practically unlimited (Thies, 2015).

Array-based methods, such as the Luminex system, a high-tech platform for the simultaneous detection of multiple biomolecules (DNA, RNA, proteins, antibodies) in a single sample, involve the immobilization of multiple probes to capture specific sequences on a solid support. The system is based on a combination of hybridization arrays and coded bead cytometry (Narayananamy, 2011). These assays use the principle of reverse hybridization, in which the target DNA is labeled instead of the probes. The target can be labeled using enzymes, radioisotopes, or fluorescence. The sample DNA is isolated and amplified with universal genes, and the recognized regions are labeled using one of the specified methods. The amplification products are then hybridized on a solid support with oligonucleotides. The amplicon-labeled regions indicate the sequences of which pathogens were detected in the sample.

Нозерн-блотинг (РНК) – анализ экспрессии генов через РНК. Дот-блотинг – точечное нанесение образцов на мембрану без электрофореза. Микрочипы (ДНК-чипы) позволяют осуществлять высокопроизводительный анализ тысяч генов одновременно.

Но наиболее интересными для целей работы с растительным материалом являются гибридационные матрицы. Матрица – твердофазная подложка (например, нейлоновая мембрана или стеклянный чип), на которую нанесены зонды. Такая конструкция позволяет одновременно обнаруживать множество патогенов, возможности практически не ограничены (Thies, 2015).

Методы, основанные на матрицах, например система LumineX – высокотехнологичная платформа для одновременного детектирования множества биомолекул (ДНК, РНК, белков, антител) в одном образце, предполагают иммобилизацию множества зондов для захвата специфичных последовательностей на твердой подложке. В основе системы лежит комбинация гибридационных матриц и цитометрии с кодированными микросферами (Narayananasamy, 2011). В таких анализах используется принцип обратной гибридизации, при котором помечаются не зонды, а целевая ДНК мишень. Мишень может быть помечена с помощью ферментов, радиоизотопов или флуоресценции. ДНК образца выделяется и амплифицируется с универсальными генами, распознанные участки помечаются одним из указанных способов. Затем продукты амплификации на твердой подложке гибридизуются с олигонуклеотидами. Меченные ампликоном участки указывают последовательности, какие патогены определились в образце.

Системы обнаружения на основе CRISPR-Cas

Системы детекции, основанные на пришедшем из геномного редактирования методе CRISPR-Cas, обладают высокой чувствительностью и специфичностью. В основе принципа работы системы обнаружения на основе CRISPR-Cas лежит способность Cas нуклеаз направленно расщеплять нуклеиновые кислоты. Принцип геномного редактирования, основанный на системе CRISPR-Cas, активно применяется для редактирования организмов в различных целях (Волков и др., 2022; Doudna and Charpentier, 2014). Наиболее широкое применение метод нашел в редактировании с/х культур для придания растениям новых свойств, таких как устойчивость к температурным изменениям, вредителям, засухе, повышение сроков хранения плодов, увеличению урожайности, улучшению органолептических свойств готовой продукции и других полезных характеристик. Уникальная специфичность и простота применения приводят к тому, что CRISPR-Cas все чаще используется для применения системы в области детекции фитопатогенов (Kaminski et al., 2021; Huang et al., 2022). Существует целый ряд подходов для разработки систем детекции, использующих различные Cas наборы. В процессе выделяется ДНК, специфичные Cas наборы связываются с целевыми участками ДНК. Подобранные эффекторный и адаптационный модуль внедряют в массив новые спейсеры и расщепляют целевую мишень. Чаще всего первый модуль состоит из нуклеаз, способных расщепить мишень, а второй состоит из белков Cas1 и Cas2.

CRISPR-Cas-based detection systems

Detection systems based on the CRISPR-Cas technique, which came from genome editing, have high sensitivity and specificity. The operating principle of the CRISPR-Cas-based detection system is based on the ability of Cas nucleases to specifically cleave nucleic acids. The principle of genome editing based on the CRISPR-Cas system is actively used to edit organisms for various purposes (Volkov et al., 2022; Doudna and Charpentier, 2014). The method has found the widest application in editing agricultural crops to impart new properties to plants, such as resistance to temperature changes, pests, drought, increasing the shelf life of fruits, increasing yields, improving the organoleptic properties of finished products and other useful characteristics. The unique specificity and ease of use lead to the fact that CRISPR-Cas is increasingly used for the application of the system in the field of detection of phytopathogens (Kaminski et al., 2021; Huang et al., 2022). There are some approaches to the development of detection systems using different Cas sets. In the process, DNA is isolated, specific Cas sets bind to target DNA regions. The selected effector and adaptation modules introduce new spacers into the array and cleave the target. Most often, the first module consists of nucleases capable of cleaving the target, and the second consists of Cas1 and Cas2 proteins. When the target is destroyed, it becomes possible to detect the emitted signal, the presence of which indicates the presence of pathogen DNA. Detection can be done using a fluorescence, electrochemical, colorimetric or visual method (Wang et al., 2020). A sufficiently detailed review of various methodologies based on CRISPR-Cas technology cannot be included within the scope of this review article. Some of the methods are well presented and described in detail in works on the analysis of diagnostic systems (Kaminski et al., 2021). The need for preliminary amplification to increase the sensitivity of diagnostics at low DNA concentrations in the sample or the possibility of avoiding an additional step at concentration values close to 6×10^5 is also described in detail. Human matrix, genomic and micro RNA also do not require additional amplification.

CRISPR-Cas-based techniques are sensitive and specific enough for use in the field. The method does not require the use of complex equipment, which further reduces the cost of the study, allowing it to be carried out in 2 hours (Wang et al., 2020). The possibility of multiplexing and the above-mentioned advantages make CRISPR-Cas a **promising technology** for rapid, accurate and inexpensive detection of phytopathogens, especially in conditions where speed and ease of analysis are important (farms, quarantine services, field studies).

Nucleic acid sequencing methods

One of the most accurate and popular methods for screening and accurate detection of microorganism DNA today is rightfully the method of nucleic

При разрушении целевой мишени появляется возможность детектировать испускаемый сигнал, наличие которого говорит о присутствии ДНК патогена. Для детекции может быть применен флуоресцентный метод, электрохимический, колориметрический или визуальный (Wang et al., 2020). Достаточно подробный обзор различных методологий, базирующихся на технологии CRISPR-Cas, не может быть вменен в рамки этой обзорной статьи. Часть методов хорошо представлена и подробно описана в работах по анализу диагностических систем (Kaminski et al., 2021). Также подробно описывается необходимость предварительной амплификации для повышения чувствительности диагностики при малых концентрациях ДНК в образце или возможность избежать дополнительного этапа при значениях концентрации близких к 6×10^5 . Матричная, геномная и микроРНК человека также не требуют дополнительной амплификации.

Методики, основанные на применении CRISPR-Cas, достаточно чувствительны и специфичны для применения в полевых условиях. Метод не требует использования сложного оборудования, что дополнительно снижает стоимость исследования, позволяя проводить его за 2 ч (Wang et al., 2020). Возможность мультиплексирования и выше перечисленные преимущества делают CRISPR-Cas **перспективной технологией** для быстрой, точной и дешевой детекции фитопатогенов, особенно в условиях, где важны скорость и простота анализа (фермерские хозяйства, карантинные службы, полевые исследования).

Методы секвенирования нуклеиновых кислот

Одним из самых точных и востребованных методов для скрининга и точной детекции ДНК микроорганизмов сегодня по праву является метод секвенирования нуклеиновых кислот. С помощью секвенирования целевых последовательностей и сравнения полученных последовательностей нуклеиновых кислот с эталонными последовательностями, например с последовательностями, размещенными в базе NCBI, можно достоверно детектировать полученный микроорганизм (Barghouthi, 2011; Beye et al., 2017). Таким образом, в отличие от ПЦР, секвенирование не только определяет наличие мишени косвенным методом, но и позволяет находить новые и измененные участки. Секвенирование – значительно более точный метод идентификации микроорганизмов по сравнению с традиционными визуальными методами, основанными на определении морфологии объекта и фенотипировании (Reller et al., 2007; Tewari et al., 2011). Использование секвенирования сводит к минимуму влияние человеческого фактора на результаты определения. Стоимость одного исследования неуклонно снижается на протяжении всей истории использования метода. А простота интерпретации данных позволяет оперировать все большими объемами информации и открывает перед нами новые возможности.

Самое большое применение в диагностике патогенов нашло секвенирование первого поколения – секвенирование по Сэнгеру. Методика обеспечивает достаточно высокую скорость и при низкой стоимости предъявляет не очень высокие требования

acid sequencing. By sequencing target sequences and comparing the obtained nucleic acid sequences with reference sequences, for example, with sequences posted in the NCBI database, it is possible to reliably detect the obtained microorganism (Barghouthi, 2011; Beye et al., 2017). Thus, unlike PCR, sequencing determines not only the presence of the target by an indirect method, but also allows you to find new and modified areas. Sequencing is a much more accurate method for identifying microorganisms compared to traditional visual methods based on determining the morphology of the object and phenotyping (Reller et al., 2007; Tewari et al., 2011). The use of sequencing minimizes the influence of the human factor on the results of the determination. The cost of one study has been steadily decreasing throughout the history of the method's use. And the simplicity of data interpretation allows us to operate with ever larger volumes of information and opens up new opportunities for us.

The most widely used method in pathogen diagnostics is first-generation sequencing – Sanger sequencing. The method provides a fairly high speed and, at a low cost, does not impose very high requirements on the sample being studied. Sanger sequencing allows generating relatively long reads of up to 1.5–2 thousand letters, but with a limited amount of generated data. Second-generation sequencers (for example, Illumina and IonTorrent) generate relatively short reads (150–600 nucleotides), but with a huge throughput and a large amount of data obtained. Generating long reads on second-generation sequencers is a technically challenging task; most sequencers work well with lengths of up to 200 nucleotides; longer reads lead to a decrease in the quality of the obtained data.

There are a number of promising domestic developments in the field of NGS sequencing, but such solutions have not yet been widely adopted. Third-generation sequencers, such as minION, GridION, and PromethION from Oxford Nanopore or PacBio sequencing sequencers from Pacific Biosciences, allow you to obtain individual molecules at the output and generate ultra-long reads quite quickly. Sequencing using PacBio devices is a highly accurate system, but the cost of the equipment is quite high, as is the cost of organizing a specialized laboratory. Nanopore sequencing can be a promising solution for detecting phytopathogens. The portable MinION system is easy to use and requires virtually no initial investment (Loit et al., 2019). The cost of one study is nevertheless significantly higher than the cost of Sanger sequencing due to the cost of consumables. Also, there is a domestic device on the Russian market – Nanoporus, which is not inferior in quality and provides full compatibility with MinION flow cells, adapter and Flongle flow cells. The interface displays the number of readings, their length, the percentage of working pores and additional statistics. The data obtained on Nanoporus allows you to determine the sequence of nucleic acids (DNA, RNA), as well as obtain information about modifications.

к исследуемому образцу. Секвенирование по Сенгеру позволяет генерировать относительно длинные считывания до 1,5–2 тыс. букв, но с ограниченным количеством генерируемых данных. Секвенаторы же второго поколения (например, Illumina и IonTorrent) генерируют относительно короткие считывания (150–600 нуклеотидов), но с огромной пропускной способностью и большим количеством получаемых данных. Генерирование на секвенаторах второго поколения длинных прочтений – технически сложная задача, большинство секвенаторов хорошо работают с длинами до 200 нуклеотидов, более длинные прочтения приводят к снижению качества получаемых данных.

Существует ряд перспективных отечественных разработок в области секвенирования NGS, но массовое распространение такие решения пока не получили. Секвенаторы третьего поколения, такие как minION, GridION и PromethION от Oxford Nanopore или секвенаторы PacBio sequencing от компании Pacific Biosciences, позволяют получать на выходе отдельные молекулы и генерировать сверхдлинные считывания достаточно быстро. Секвенирование с использованием приборов PacBio является высокоточной системой, но стоимость оборудования достаточно высока, как и стоимость организации специализированной лаборатории. Нанопоровое секвенирование может быть перспективным решением для детекции фитопатогенов. Портативная система MinION удобна в использовании и практически не требует первоначальных вложений (Loit et al., 2019). Стоимость одного исследования тем не менее значительно выше, чем стоимость секвенирования по Сенгеру за счет стоимости расходных материалов. Также на рынке РФ появился отечественный прибор – Нанопорус, не уступающий по качеству и обеспечивающий полную совместимость с проточными ячейками MinION, адаптером и проточными ячейками Flongle. Интерфейс отображает количество прочтений, их длину, процент работающих пор и дополнительную статистику. Данные, полученные на Нанопорусе, позволяют определить последовательность нуклеиновых кислот (ДНК, РНК), а также получить информацию о модификациях.

Метагеномное секвенирование Shot-Gun

Метагеномика предполагает использование параллельного секвенирования коротких фрагментов нуклеиновых кислот методом дробовика (Shot-gun) всех микроорганизмов в пробе одновременно (Venbrux et al., 2023). Метод дробовика нашел широкое применение в медицине (чтение полных геномов, экзомов, микробиомов, анализ биологических жидкостей), в последнее время чаще используется в ветеринарии (чтение микробиомов, анализ биологических жидкостей). Данный метод позволяет эффективно выявлять патогенные бактерии, грибы и вирусы (Nikitinskaya et al., 2025). В рамках метода сначала выделяется вся присутствующая в пробе ДНК, далее она обрабатывается фрагментазой для получения более мелких цепочек нуклеотидов. Также для фрагментации могут применяться приборы, использующие ультразвук. Излишне длинные и слишком короткие фрагменты отбрасываются. После этого происходит параллельное секвенирование наработанного материала (Sharpton, 2014).

Shot-Gun Metagenomic Sequencing

Metagenomics involves the use of parallel sequencing of short fragments of nucleic acids using the shot-gun method, all microorganisms in a sample simultaneously (Venbrux et al., 2023). The shot-gun method has found wide application in medicine (reading of complete genomes, exomes, microbiomes, analysis of biological fluids), and has recently been used more often in veterinary medicine (reading of microbiomes, analysis of biological fluids). This method allows for the effective detection of pathogenic bacteria, fungi, and viruses (Nikitinskaya et al., 2025). Within the framework of the method, all DNA present in the sample is first isolated, then it is treated with fragmentase to obtain smaller nucleotide chains. Devices using ultrasound can also be used for fragmentation. Excessively long and too short fragments are discarded. After that, parallel sequencing of the accumulated material occurs (Sharpton, 2014). Due to the fact that each such region is read multiple times, it becomes possible (with multiple overlap) to assemble contigs – long sections of DNA. The resulting metagenome of the sample is used to identify organisms and / or to analyze functional genes (Quince et al., 2017). The use of the metagenomic sequencing method allows you to obtain high-quality contigs due to the overlap and multiple reading of all fragments. The resulting contigs make it possible to assemble and analyze the genomes or sections of the genomes of new plants that were previously absent from the databases; high-quality contigs and a large number of reads allow you to identify bacteria, fungi, oomycetes and viruses down to the subspecies, strain; there is no need to sequence each organism separately – all organisms are detected simultaneously; the ability to analyze seed and planting material for latent infections is especially relevant; it is not necessary to rely on external manifestations and signs of diseases; you can track the state of target organisms in samples (Piombo et al., 2021). In the case of virus analysis, it is quite difficult to create test systems based on amplicons, so Shot-Gun sequencing helps to avoid additional labor-intensive studies and detect new viruses (Adams et al., 2009; Roossinck et al., 2009). The use of metagenomics can be of particular importance for screening seed and planting material. The method allows one to determine the pathogenic load in seed, planting material, fruits, and soil and water samples. This allows one to determine the suitability of seeds and material for use, select the best samples, determine the routes of spread of phytopathogens, and identify diseases in the absence of external manifestations. Today, the scope of metagenomics has expanded significantly, but this method is rarely used in the field of identifying plant pathogens. Along with the traditional reasons mentioned by Sharpton (the need to obtain a large number of coatings, high cost, the need for additional expensive equipment to get rid of the DNA of the plant being studied, the difficulty of detecting pathogen species present in small concentrations),

За счет того, что каждый такой участок многократно считывается, появляется возможность (с многократным перекрытием) собрать контиги – продолжительные участки ДНК. Полученный метагеном образца используется для идентификации организмов и/или для анализа функциональных генов (Quince et al., 2017). Использование метагеномного метода секвенирования позволяет получать контиги высокого качества, за счет перекрытия и многократного прочтения всех фрагментов. Полученные контиги дают возможность собирать и анализировать геномы или участки геномов новых растений, до этого момента отсутствующих в базах данных; высокое качество контигов и большое количество прочтений позволяют идентифицировать бактерии, грибы, оомицеты и вирусы до подвида, штамма; не требуется секвенировать отдельно каждый организм – все организмы детектируются одновременно; особенно актуальна возможность анализа семенного и посадочного материала на скрытые инфекции; не обязательно опираться на внешние проявления и признаки заболеваний; можно отслеживать состояние целевых организмов в образцах (Piombo et al., 2021). В случае анализа на вирусы достаточно затруднительно создавать тестовые системы на основании ампликонов, поэтому секвенирование методом Shot-Gun помогает избежать дополнительных трудоемких исследований и обнаруживать новые вирусы (Adams et al., 2009; Roossinck et al., 2009). Особую значимость использование метагеномики может иметь для скрининга семенного и посадочного материала. Метод позволяет определить патогенную нагрузку в семенном, посадочном материале, плодах и образцах почв и воды. Это позволяет определить пригодность семян и материала для использования, выбрать лучшие образцы, определить пути распространения фитопатогенов, выявить заболевания при отсутствии внешних проявлений. На сегодняшний день сферы использования метагеномики значительно расширились, но в области выявления патогенов растений данный метод используется нечасто. Наряду с традиционными причинами, о которых упоминает Sharpton (необходимость получения большого количества покрытий, высокая стоимость, необходимость в дополнительном дорогостоящем оборудовании для избавления от ДНК самого исследуемого растения, сложность обнаружения видов патогенов, присутствующих в небольших концентрациях), существенно влияет на использование метода нехватка доступных эталонных геномов (Sharpton, 2014). На самом деле уже сегодня большое количество прочтений в большинстве случаев не является критичным показателем, стоимость секвенирования значительно снизилась и сравнима со стоимостью исследования другими молекулярными методами, появились более совершенные наборы для выделения ДНК и синтеза кДНК, а мировые базы геномов постоянно расширяются и дополняются. Наряду с использованием в медицине метагеномика прочно входит в практику обнаружения фитопатогенов, болезней животных и научных исследований во многих областях.

Секвенирование отдельных участков

Секвенирование отдельных участков, обладающих достаточной вариабельностью для определения

the use of the method is significantly affected by the lack of available reference genomes (Sharpton, 2014). In fact, today a large number of reads in most cases is not a critical indicator, the cost of sequencing has significantly decreased and is comparable to the cost of research using other molecular methods, more advanced kits for DNA extraction and cDNA synthesis have appeared, and the world's genome databases are constantly expanding and supplemented. Along with its use in medicine, metagenomics is firmly entering the practice of detecting phytopathogens, animal diseases and scientific research in many areas.

Sequencing of individual regions

Sequencing of individual regions with sufficient variability to identify the target organism is one of the most popular methods for detecting phytopathogens. The principle of the method is based on the fact that microorganisms have variable regions along with conservative ones. Having detected such variable regions and selected oligonucleotides for the adjacent conservative regions, we can amplify the target fragments. Having an insignificant size compared to the genome, such regions allow us to distinguish microorganisms to the genus, to the species, significantly saving resources. The barcoding method allows us to reliably differentiate microorganisms based on existing databases (Hugerth and Andersson, 2017; Bush et al., 2019). There are universal regions suitable for sequencing by the barcoding method. For prokaryotic organisms, the 16S rDNA region is used, its size is suitable for reading by devices that provide a reading length of 500 nucleotides. For fungi and oomycetes, the internal transcribed spacer ITS rRNA is most often sequenced (Abdelfattah et al., 2018; Piombo et al., 2021). Modern databases provide accurate identification of organisms by comparing the obtained reading with the same reference from the database. However, there are closely related organisms that require reading additional regions, since they cannot be identified by reading the considered standard targets.

Biosensor systems

Biosensors are devices that use enzymes, antibodies, DNA, or even whole cells as a detection element. The elements bind either to cells and cell fragments, or to nucleic acids, or to the resulting amplification products present in solution in combination with a signal transduction mechanism. A biosensor system, including electrochemical sensors, mass sensors, or optical sensors, converts the detected signal into selective quantitative or semi-quantitative analytical information. Due to their low cost, simplicity, and speed of operation, biosensors are widely used in medicine (Fang and Ramasamy, 2015; Hameed et al., 2018; Bridle and Desmulliez, 2021). The main disadvantages of biosensor systems are the instability of materials in the field and insufficient standardization. Various methods can be used to detect plant pathogens, for example, immunosensors with antibodies

целевого организма, является одним из самых популярных методов детекции фитопатогенов. Принцип метода основан на том, что микроорганизмы обладают вариабельными участками наряду с консервативными. Обнаружив такие вариабельные участки и подобрав к граничащим с ними консервативным участкам олигонуклеотиды, мы можем амплифицировать целевые фрагменты. Обладая незначительным размером по сравнению с геномом, такие участки позволяют различить микроорганизмы до рода, до вида, значительно экономя ресурсы. Метод баркодирования позволяет достоверно дифференцировать микроорганизмы, опираясь на имеющиеся базы данных (Hugerth and Andersson, 2017; Bush et al., 2019). Существуют универсальные участки, подходящие для секвенирования методом баркодирования. Для прокариотических организмов используется участок 16S рДНК, его размеры подходят для чтения приборами, обеспечивающими длину прочтения от 500 нуклеотидов. Для грибов и оомицетов чаще всего секвенируют внутренний транскрибируемый спейсер ITS рДНК (Abdelfattah et al., 2018; Piombo et al., 2021). Современные базы данных обеспечивают точное определение организмов при сравнении полученного прочтения с таким же эталонным из базы данных. Но есть близкородственные организмы, которые требуют прочтения дополнительных участков, так как не могут быть определены прочтением рассмотренных стандартных мишеней.

Биосенсорные системы

Биосенсоры – это устройства, использующие ферменты, антитела, ДНК или даже целые клетки как элемент детекции. Элементы связываются либо с клетками и фрагментами клеток, либо с нуклеиновыми кислотами, либо с полученными продуктами амплификации, присутствующими в растворе в сочетании с механизмом преобразования сигнала. Биосенсорная система, включающая электрохимические датчики, датчики массы или оптические датчики, преобразует распознаваемый сигнал в селективную количественную или полуколичественную аналитическую информацию. Благодаря невысокой стоимости, простоте и скорости работы биосенсоры активно применяются в медицине (Fang and Ramasamy, 2015; Hameed et al., 2018; Bridle and Desmulliez, 2021). Основными недостатками систем биосенсоров являются нестабильность материалов в полевых условиях и недостаточная стандартизация. Для обнаружения патогенов растений могут использоваться различные методы, например для детекции вирусов (TMV, PVY) – иммуносенсоры с антителами, для детекции бактериальных патогенов – ДНК-гибридизационные сенсоры, для детекции грибковых патогенов применяются ферментные биосенсоры на основе хитиназы (Buja et al., 2021).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ежегодные потери урожая из-за фитопатогенов (бактерий, вирусов, грибов, нематод и др.) оцениваются в диапазоне от 20 до 40% глобального производства сельскохозяйственных культур, что в денежном эквиваленте составляет **сотни миллиардов долларов**. Потери в Азии и Африке значительно выше из-за ограниченного применения методов ранней диагностики, малого числа специалистов и слабого

are used to detect viruses (TMV, PVY), DNA hybridization sensors are used to detect bacterial pathogens, and chitinase-based enzyme biosensors are used to detect fungal pathogens (Buja et al., 2021).

RESULTS AND DISCUSSION

Annual crop losses due to phytopathogens (bacteria, viruses, fungi, nematodes, etc.) are estimated to range from 20 to 40% of global agricultural production, which in monetary terms amounts to **hundreds of billions of dollars**. Losses in Asia and Africa are significantly higher due to the limited use of early diagnostic methods, a small number of specialists, and weak use of pesticides. In North America and Europe, losses are lower and amount to 15 to 30%, but due to the higher cost of finished agricultural products, they exceed them in monetary terms. This situation leads to the threat of famine in developing countries and contributes to the global growth in the cost of agricultural products. An obvious way to reduce losses is early diagnostics of pathogenic microorganisms. The most effective in terms of the methods considered is monitoring of seed and planting material, as well as selective monitoring of outwardly healthy plants that do not show signs of infection. In addition, it is possible to indirectly assess the effectiveness of the drugs and methods used to control phytopathogens. This will increase the effectiveness of measures and reduce the burden of using chemical pesticides. Correctly selected and implemented methods for detecting phytopathogens are a significant part of a comprehensive approach to reducing the use of chemical pesticides, ensuring increased sustainability of agriculture. Another important method for reducing losses is the use of phytosanitary measures in organized monitoring of imported and exported products. The use of only one of the methods for detecting phytopathogens will not be effective enough and may lead to unnecessary costs. The only possible solution is a combination of field control methods, laboratory methods and remote sensing methods.

Concluding observations

An analysis of modern diagnostic methods for plant pathogens, including viruses, bacteria, fungi and oomycetes, demonstrates significant advances in molecular genetic technologies. Traditional methods such as microbiological culture and serological tests, although still important, are gradually giving way to more accurate, rapid and sensitive approaches based on nucleic acid analysis. Methods such as PCR, isothermal amplification (LAMP), next-generation sequencing (NGS) and CRISPR systems are revolutionizing diagnostics by enabling early detection of pathogens, differentiation of strains and detection of latent infections.

The use of modern molecular methods has undeniable advantages. One of the most important criteria is the early detection of pathogens before the appearance of visible symptoms, which is especially important for preventing the spread of diseases.

использования пестицидов. В Северной Америке и Европе потери ниже и составляют от 15 до 30%, но из-за более высокой стоимости готовой сельскохозяйственной продукции превосходят их в денежном выражении. Такая ситуация приводит к угрозе голода в развивающихся странах и способствует общему росту стоимости сельскохозяйственной продукции. Очевидным способом для снижения потерь является ранняя диагностика патогенных микроорганизмов. Наиболее эффективным в разрезе рассмотренных методов представляется мониторинг семенного и посадочного материала, а также выборочный мониторинг внешне здоровых растений, не проявляющих признаков инфекции. Дополнительно можно косвенно оценить эффективность используемых препаратов и методов, применяемых для борьбы с фитопатогенами. Это позволит повысить эффективность мероприятий и снизить нагрузку от использования химических пестицидов. Правильно подобранные и реализуемые методы детекции фитопатогенов составляют значимую часть комплексного подхода сокращения использования химических пестицидов, обеспечивая повышение устойчивости сельского хозяйства. Также немаловажным методом снижения потерь является применение фитосанитарных мер при организованном мониторинге импортируемой и экспортируемой продукции. Применение только одного из методов детекции фитопатогенов не будет достаточно эффективным и может привести к излишним затратам. Единственным возможным решением представляется комбинация полевых методов контроля, лабораторных методов и методов дистанционного зондирования.

ВЫВОДЫ

Анализ современных методов диагностики патогенов растений, включая вирусы, бактерии, грибы и оомицеты, демонстрирует значительный прогресс в области молекулярно-генетических технологий. Традиционные методы, такие как микробиологический посев и серологические тесты, хотя и остаются важными, постепенно уступают место более точным, быстрым и чувствительным подходам, основанным на анализе нуклеиновых кислот. Методы, такие как ПЦР, изотермическая амплификация (LAMP), секвенирование нового поколения (NGS) и CRISPR-системы, революционизируют диагностику, позволяя выявлять патогены на ранних стадиях, дифференцировать штаммы и обнаруживать латентные инфекции.

Использование современных молекулярных методов имеет неоспоримые преимущества. Одним из важнейших критериев является раннее обнаружение патогенов еще до появления видимых симптомов, что особенно важно для предотвращения распространения заболеваний.

Высокая специфичность и чувствительность таких технологий, как NGS, qPCR и CRISPR, обеспечивают точность и воспроизводимость результатов даже при низких концентрациях патогенов.

Возможность создания и легкость применения мультиплексных систем, а также использование гибридационных матриц и NGS позволяет одновременно обнаруживать множество патогенов, что значительно повышает эффективность диагностики. Развитие портативных платформ, таких как LAMP

High specificity and sensitivity of technologies such as NGS, qPCR and CRISPR ensure the accuracy and reproducibility of results even at low concentrations of pathogens.

The possibility of creating and easy to use multiplex systems, as well as the use of hybridization matrices and NGS, allows for the simultaneous detection of many pathogens, which significantly increases the efficiency of diagnostics. The development of portable platforms such as LAMP and CRISPR expands the possibilities for field diagnostics, which is especially important for rapid response to threats. The possibility of field application of tests allows for the detection of phytopathogens directly on site, quickly and without sending them to a laboratory.

Limitations and Prospects:

The widespread use of molecular genetic methods in the detection of quarantine objects today still has a number of limitations. Sequencing of nucleic acids requires complex bioinformatics processing and the availability of reference sequences, as well as the ability to interpret the obtained data. Some methods, such as PCR, do not allow distinguishing viable microorganisms from non-viable ones. This can lead to false positive results.

Some methods, such as NGS and metagenomics, have become much more affordable, although they require specialized equipment and skills, which somewhat limits their mass application.

However, in the future, the mass integration of molecular genetic methods will lead to a significant increase in the accuracy and speed of diagnostics, and will allow timely detection of pathogenic organisms in seed and planting material. The mass use of these methods will further reduce their cost per sample. The development of the NGS method, including metagenomic sequencing, in diagnostics will contribute to further cost reduction, expansion and development of databases, and will open up new opportunities for monitoring plant diseases in real time. And the development of artificial intelligence will allow for quick and accurate interpretation of data. The requirements for server capacity and data storage will be reduced. The processes of developing diagnostic methods will be automated, which will save resources and reduce time costs.

CONCLUSION

Modern methods of plant pathogen diagnostics based on molecular genetic approaches are a powerful tool for controlling crop diseases. Their implementation in phytosanitary monitoring and integration with traditional methods will reduce economic losses associated with pathogens and contribute to sustainable agricultural development. However, for the widespread use of these technologies, the issues related to their cost, availability and data interpretation need to be addressed. Further research and

и CRISPR, расширяет возможности для полевой диагностики, что особенно важно для оперативно-го реагирования на угрозы. Возможность полевого применения тестов позволяет выявлять фитопатогены прямо на месте, быстро и без отправки в лабораторию.

Ограничения и перспективы

Широкое применение молекулярно-генетических методов в детекции карантинных объектов на сегодняшний день все же имеет ряд ограничений. Секвенирование нуклеиновых кислот требует сложной биоинформатической обработки и наличия референсных последовательностей, а также умения интерпретировать полученные данные. Некоторые методы, такие как ПЦР, не позволяют отличить жизнеспособные микроорганизмы от нежизнеспособных. Это может приводить к ложноположительным результатам.

Некоторые методы, такие как NGS и метагеномика, стали значительно доступнее по стоимости, хотя и требуют специализированного оборудования и навыков, что несколько ограничивает их массовое применение.

Однако в перспективе массовая интеграция молекулярно-генетических методов приведет к значительному повышению точности и скорости диагностики, позволит своевременно определять патогенные организмы в семенном и посадочном материале. Массовое применение данных методов еще больше снизит их стоимость в пересчете на образец.

Развитие метода NGS, в том числе метагеномного секвенирования, в диагностике будет способствовать дальнейшему снижению стоимости, расширению и развитию баз данных, откроет новые возможности для мониторинга заболеваний растений в реальном времени. А развитие искусственного интеллекта позволит быстро и точно интерпретировать данные. Снизятся требования к серверным мощностям и хранилищам данных. Автоматизируются процессы разработки диагностических методик, что позволит экономить ресурсы и снизит временные затраты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные методы диагностики патогенов растений, основанные на молекулярно-генетических подходах, представляя собой мощный инструмент для борьбы с заболеваниями сельскохозяйственных культур. Их внедрение в фитосанитарный мониторинг и интеграция с традиционными методами позволят снизить экономические потери, связанные с патогенами, и способствовать устойчивому развитию сельского хозяйства. Однако для широкого применения этих технологий необходимо решить ряд проблем, связанных с их стоимостью, доступностью и интерпретацией данных. Дальнейшие исследования и разработки в этой области будут способствовать созданию более эффективных и доступных решений для защиты растений и обеспечения глобальной продовольственной безопасности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонова О.С., Рудницкая Г.Е., Тупик А.Н., Буляница А.Л., Евстапов А.А., Курочкин В.Е.

development in this area will contribute to the creation of more effective and affordable solutions for plant protection and global food security.

REFERENCES

1. Antonova O.S., Rudnitskaya G.E., Tupik A.N., Bulyanitsa A.L., Evstrapov A.A., Kurochkin V.E. "Polymerase chain reaction: Instrumental and methodological implementation. Review of analytical characteristics" [Polimeraznaya tsepnaya reaktsiya: Pribornaya i metodicheskaya realizatsiya. Obzor analiticheskikh kharakteristik] // Scientific instrument making. 2011. 21 (4), 5–21. (In Russ.)
2. Volkov A.A., Dolgova A.S., Dedkov V.G. "Molecular diagnostic platforms created on the basis of CRISPR-Cas systems" [Molekulyarnyye diagnosticheskiye platformy, sozdannyye na baze sistem CRISPR-Cas] // Infection and Immunity. 2022. 1, 9–20. URL: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-SSV1843>. (In Russ.)
3. Zubik A., Rudnitskaya G.E., Evstrapov A. "Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method in a microdevice format (review)" [Metod petlevoiy izotermicheskoy amplifikatsii (LAMP) v formate mikroustroystva (obzor)] // SCIENTIFIC INSTRUMENTATION. 2021. 31(1):3–43. URL: <https://doi.org/10.18358/np-31-1-i343> (In Russ.)
4. Nazarov P. A., Baleev D. N., Ivanova M. I., Sokolova L. M., Karakozova M. V. "Infectious Plant Diseases: Etiology, Current Status, Problems and Prospects of Plant Protection" [Infektsionnyye bolezni rasteniy: etiologiya, sovremennoye sostoyaniye, problemy i perspektivy zashchity Rasteniy] // ACTA NATURAE. 2020. 12.3 (46). URL: <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11026>. (In Russ.)
5. Kolesnikov A.V., Kozyr A.V., Shemyakin I.G. "Prospects for the use of aptamers in the diagnostics of bacterial infections" [Perspektivy primeneniya aptamerov v diagnostike bakterial'nykh infektsiy] // Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2012. 2b 1–6. (In Russ.)
6. Lebedeva Yu.L., Cherkashin E.A., Akimkin V.G. "MODERN DIGITAL PCR PLATFORMS" [SOVREMENNYE PLATFORMY TSIFROVOY PTSR] // Biotechnology, 2024, Vol. 40, No. 1, pp. 61–83. URL: <https://doi.org/10.56304/S023427582401006X>. (In Russ.)
7. Ivanov A. V., Safenkova I. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. "Potential use of isothermal amplification assays for field diagnostics of plant pathogens." [Potentsial'noye ispol'zovaniye analizov izotermicheskoy amplifikatsii dlya polevoy diagnostiki patogenov rasteniy] // Plants (2021). 10 (11), 2424. URL: <https://doi.org/10.3390/plants10112424>. (In Russ.)
8. Abdelfattah A., Malacrinò A., Wisniewski M., Cacciola S. O., Schena L. Metabarcoding: A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies // Biol. Control. 2018. 120, 1–10. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.009>.
9. Adams I. P., Glover R. H., Monger W. A., Mumford R., Jackeviciene E., Navalinskiene M., et al.

«Полимеразная цепная реакция: Приборная и методическая реализация. Обзор аналитических характеристик» // Научное приборостроение. 2011. 21 (4), 5–21.

2. Волков А.А., Долгова А.С., Дедков В.Г. «Молекулярные диагностические платформы, созданные на базе систем CRISPR-Cas» // Инфекция и иммунитет. 2022. 1, 9–20. URL: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-CCB1843>.

3. Зубик А., Рудницкая Г.Е., Евстапов А. «Метод петлевой изотермической амплификации (LAMP) в формате микроустройства (обзор)» // НАУЧНОЕ ПРИБОРОСТРОЕНИЕ. 2021. 31(1):3–43. URL: <https://doi.org/10.18358/nr-31-1-i343>

4. Назаров П. А., Балеев Д. Н., Иванова М. И., Соколова Л. М., Каракозова М. В. «Инфекционные болезни растений: этиология, современное состояние, проблемы и перспективы защиты Растений» // АСТА NATURAE. 2020. 12.3 (46). URL: <https://doi.org/10.32607/astanaturae.11026>.

5. Колесников А.В., Козырь А.В., Шемякин И.Г. «Перспективы применения аптамеров в диагностике бактериальных инфекций» // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2012. 26 1–6.

6. Лебедева Ю.Л., Черкашин Е.А., Акимкин В.Г. «СОВРЕМЕННЫЕ ПЛАТФОРМЫ ЦИФРОВОЙ ПЦР» // БИОТЕХНОЛОГИЯ, 2024, Т. 40, № 1, СТР. 61–83. URL: <https://doi.org/10.56304/S023427582401006X>.

7. Иванов А. В., Сафенкова И. В., Жердев А. В., Дзантиев Б. Б. » Потенциальное использование анализов изотермической амплификации для полевой диагностики патогенов растений.» Растения (2021). 10 (11), 2424. URL: <https://doi.org/10.3390/plants10112424>.

8. Abdelfattah A., Malacrino A., Wisniewski M., Cacciola S. O., Schena L. Metabarcoding: A powerful tool to investigate microbial communities and shape future plant protection strategies // Biol. Control. 2018. 120, 1–10. URL: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.009>.

9. Adams I. P., Glover R. H., Monger W. A., Mumford R., Jackeviciene E., Navalinskiene M., et al. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: A universal diagnostic tool in plant virology // Mol. Plant Pathol. 2009. 10 (4), 537–545. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00545.x>.

10. Anne-Katrin Mahlein. Plant Disease Detection by Imaging Sensors – Parallels and Specific Demands for Precision Agriculture and Plant Phenotyping // Plant Disease. 2016. 241–251. URL: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0340-FE>.

11. Antonet M. Svircev, Won-Sik Kim, Susan M. Lehman, Alan Castle. Erwinia amylovora: Modern Methods for Detection and Differentiation // Methods in molecular biology Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2009. 508:115–29. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-062-1_10.

12. Ascoli C. A., Aggeler B. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies // BioTechniques 2018. 65 (3), 127–136. URL: <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0065>.

13. Barghouthi S. A. A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers // Indian J. Microbiol. 2011. 51 (4), 430–444. URL: <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0122-5>.

14. Barsukova G.N., Sheudzhn Z.R., Derevenets D.K. Reduction of the area of agricultural and arable land as a global trend of reducing part of resource potential of agricultural production // International agricultural

Next-generation sequencing and metagenomic analysis: A universal diagnostic tool in plant virology // Mol. Plant Pathol. 2009. 10 (4), 537–545. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00545.x>.

10. Anne-Katrin Mahlein. Plant Disease Detection by Imaging Sensors – Parallels and Specific Demands for Precision Agriculture and Plant Phenotyping // Plant Disease. 2016. 241–251. URL: <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0340-FE>.

11. Antonet M. Svircev, Won-Sik Kim, Susan M. Lehman, Alan Castle. Erwinia amylovora: Modern Methods for Detection and Differentiation // Methods in molecular biology Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2009. 508:115–29. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-062-1_10.

12. Ascoli C. A., Aggeler B. Overlooked benefits of using polyclonal antibodies // BioTechniques 2018. 65 (3), 127–136. URL: <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0065>.

13. Barghouthi S. A. A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers // Indian J. Microbiol. 2011. 51 (4), 430–444. URL: <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0122-5>.

14. Barsukova G.N., Sheudzhn Z.R., Derevenets D.K. Reduction of the area of agricultural and arable land as a global trend of reducing part of resource potential of agricultural production // International agricultural journal 2021. 6, 6–9. URL: <https://doi.org/10.22412/2588-0209-2021-10413>.

15. Becherer L., Borst N., Bakheit M., Frischmann S., Zengerle R., von Stetten F. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. Anal. Methods. 2020. 12 (6), 717–746. URL: <https://doi.org/10.1039/C9AY02246E>.

16. Bester R., Jooste A. E. C., Maree H. J., Burger J. T. Real-time RT-PCR high-resolution melting curve analysis and multiplex RT-PCR to detect and differentiate grapevine leafroll-associated virus 3 variant groups I, II, III and VI // Virol. J. 2012. 9 (1), 219. URL: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-219>.

17. Beye M., Fahsi N., Raoult D., Fournier P.-E. Careful use of 16S rRNA gene sequence similarity values for the identification of mycobacterium species // New Microbes New Infect. 2017. 22, 24–29. URL: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.12.009>.

18. Bridle H., Desmulliez M. Chapter 7–biosensors for the detection of waterborne pathogens, in Waterborne pathogens. 2021. 2nd ed. Ed. Bridle, H. (Academic Press), 189–235. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64319-3.00007-1>.

19. Buja I., Sabella E., Monteduro A. G., Chiriaco M. S., De Bellis L., Luvisi A., et al. Advances in plant disease detection and monitoring: From traditional assays to in-field diagnostics // Sensors. 2021. 21 (6). URL: <https://doi.org/10.3390/s21062129>.

20. Bush A., Compson Z. G., Monk W. A., Porter T. M., Steeves R., Emilson E., et al. Studying ecosystems with DNA metabarcoding: Lessons from bio-monitoring of aquatic macroinvertebrates // Front.

journal 2021. 6, 6-9. URL: <https://doi.org/10.22412/2588-0209-2021-10413>.

15. Becherer L., Borst N., Bakheit M., Frischmann S., Zengerle R., von Stetten F. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal. Methods*. 2020. 12 (6), 717–746. URL: <https://doi.org/10.1039/C9AY02246E>.

16. Bester R., Jooste A. E. C., Maree H. J., Burger J. T. Real-time RT-PCR high-resolution melting curve analysis and multiplex RT-PCR to detect and differentiate grapevine leafroll-associated virus 3 variant groups I, II, III and VI // *Virol. J.* 2012. 9 (1), 219. URL: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-219>.

17. Beye M., Fahsi N., Raoult D., Fournier P.-E. Careful use of 16S rRNA gene sequence similarity values for the identification of mycobacterium species // *New Microbes New Infect.* 2017. 22, 24–29. URL: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.12.009>.

18. Bridle H., Desmulliez M. Chapter 7–biosensors for the detection of waterborne pathogens, in *Waterborne pathogens*. 2021. 2nd ed. Ed. Bridle, H. (Academic Press), 189–235. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64319-3.00007-1>.

19. Buja I., Sabella E., Monteduro A. G., Chiriaco M. S., De Bellis L., Luvisi A., et al. Advances in plant disease detection and monitoring: From traditional assays to in-field diagnostics // *Sensors*. 2021. 21 (6). URL: <https://doi.org/10.3390/s21062129>.

20. Bush A., Compson Z. G., Monk W. A., Porter T. M., Steeves R., Emilson E., et al. Studying ecosystems with DNA metabarcoding: Lessons from biomonitoring of aquatic macroinvertebrates // *Front. Ecol. Evol.* 2019. 7. URL: <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00434>.

21. Chen B., Jiang Y., Cao X., Liu C., Zhang N., Shi D. Droplet digital PCR as an emerging tool in detecting pathogens nucleic acids in infectious diseases. // *Clinica Chimica Acta*. 2021. 517, 156–161. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.02.008>.

22. Craw P., Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: A critical review. *Lab // Chip*. 2021. 12 (14), 2469. URL: <https://doi.org/10.1039/c2lc40100b>.

23. Doudna J. A., Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 // *Science*. 2014. 346 (6213), 1258096. URL: <https://doi.org/10.1126/science.1258096>.

24. Duan Y., Zhou L., Hall D. G., Li W., Doddapaneni H., Lin H., et al. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, ‘Candidatus liberibacter asiaticus’ obtained through metagenomics // *Mol. Plant-Microbe Interactions*®. 2009. 22 (8), 1011–1020. URL: <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-1011>.

25. FAO. The future of food and agriculture: Trends and challenges // *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. 2017. p11–16.

26. FAO. New standards to curb the global spread of plant pests and diseases. 2019. Available at: <https://www.fao.org/news/story/en/item/1187738/icode/>.

27. Ferone M., Gowen A., Fanning S., Scannell A. G. M. Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2020. 19 (6), 3106–3129. URL: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12618>.

28. Fang and Ramasamy. Current and prospective methods for plant disease detection // *Biosensors*. 2015. 5, 537–561. URL: <https://doi.org/10.3390/bios5030537>.

Ecol. Evol. 2019. 7. URL: <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00434>.

21. Chen B., Jiang Y., Cao X., Liu C., Zhang N., Shi D. Droplet digital PCR as an emerging tool in detecting pathogens nucleic acids in infectious diseases. // *Clinica Chimica Acta*. 2021. 517, 156–161. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.02.008>.

22. Craw P., Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: A critical review. *Lab // Chip*. 2021. 12 (14), 2469. URL: <https://doi.org/10.1039/c2lc40100b>.

23. Doudna J. A., Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 // *Science*. 2014. 346 (6213), 1258096. URL: <https://doi.org/10.1126/science.1258096>.

24. Duan Y., Zhou L., Hall D. G., Li W., Doddapaneni H., Lin H., et al. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium, ‘Candidatus liberibacter asiaticus’ obtained through metagenomics // *Mol. Plant-Microbe Interactions*®. 2009. 22 (8), 1011–1020. URL: <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-1011>.

25. FAO. The future of food and agriculture: Trends and challenges // *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. 2017. p11–16.

26. FAO. New standards to curb the global spread of plant pests and diseases. 2019. Available at: <https://www.fao.org/news/story/en/item/1187738/icode/>.

27. Ferone M., Gowen A., Fanning S., Scannell A. G. M. Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2020. 19 (6), 3106–3129. URL: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12618>.

28. Fang and Ramasamy. Current and prospective methods for plant disease detection // *Biosensors*. 2015. 5, 537–561. URL: <https://doi.org/10.3390/bios5030537>.

29. Hameed S., Xie L., Ying Y. Conventional and emerging detection techniques for pathogenic bacteria in food science: A review // *Trends Food Sci. Technol.* 2018. 81, 61–73. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.020>.

30. Hayden R. T., Gu Z., Ingersoll J., Abdul-Ali D., Shi L., Pounds S., et al. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *J. Clin. // Microbiol.* 2013. 51 (2), 540–546. URL: <https://doi.org/10.1128/JCM.02620-12>.

31. Hindson B. J., Ness K. D., Masquelier D. A., Belgrader P., Heredia N. J., Makarewicz A. J., et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number // *Anal. Chem.* 2011. 83 (22), 8604–8610. URL: <https://doi.org/10.1021/ac202028g>.

32. Hoshino T., Inagaki F. Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR. *Syst. Appl // Microbiol.* 2012. 35 (6), 390–395. URL: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.06.006>.

33. Hugerth L. W., Andersson A. F. Analysing microbial community composition through amplicon sequencing: From sampling to hypothesis testing //

29. Hameed S., Xie L., Ying Y. Conventional and emerging detection techniques for pathogenic bacteria in food science: A review // *Trends Food Sci. Technol.* 2018. 81, 61–73. URL: [https://doi.org/ 10.1016/j.tifs.2018.05.020](https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.020).
30. Hayden R. T., Gu Z., Ingersoll J., Abdul-Ali D., Shi L., Pounds S., et al. Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *J. Clin. Microbiol.* 2013. 51 (2), 540–546. URL: [https://doi.org/ 10.1128/JCM.02620-12](https://doi.org/10.1128/JCM.02620-12).
31. Hindson B. J., Ness K. D., Masquelier D. A., Belgrader P., Heredia N. J., Makarewicz A. J., et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number // *Anal. Chem.* 2011. 83 (22), 8604–8610. URL: [https://doi.org/ 10.1021/ac202028g](https://doi.org/10.1021/ac202028g)
32. Hoshino T., Inagaki F. Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 2012. 35 (6), 390–395. URL: [https://doi.org/ 10.1016/j.syapm.2012.06.006](https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.06.006).
33. Hugerth L. W., Andersson A. F. Analysing microbial community composition through amplicon sequencing: From sampling to hypothesis testing // *Front. Microbiol.* 2017. 8. URL: [https://doi.org/ 10.3389/fmicb.2017.01561](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01561).
34. Ivanov A. V., Safenkova I. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. The potential use of isothermal amplification assays for in-field diagnostics of plant pathogens // *Plants*. 2021. 10 (11), 2424. URL: [https://doi.org/ 10.3390/plants10112424](https://doi.org/10.3390/plants10112424).
35. Kaminski M. M., Abudayyeh O. O., Gootenberg J. S., Zhang F., Collins J. J. CRISPR-based diagnostics // *Nat. Biomed. Eng.* 2021. 5 (7). URL: [https://doi.org/ 10.1038/s41551-021-00760-7](https://doi.org/10.1038/s41551-021-00760-7).
36. Kohn B. LISTERIA detection by commercial immunomagnetic particle-based assays // *Encyclopedia of food microbiology*. Ed. Robinson, R. K. (Elsevier). 1999. 1222–1228. URL: [https://doi.org/ 10.1006/rwfm.1999.0960](https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0960).
37. Kralik P., Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything // *Front. Microbiol.* 2017. 8. URL: [https://doi.org/ 10.3389/fmicb.2017.00108](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108).
38. Lau H. Y., Botella J. R. Advanced DNA-based point-of-Care diagnostic methods for plant diseases detection // *Front. Plant Sci.* 2017. 8. URL: [https://doi.org/ 10.3389/fpls.2017.02016](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02016)
39. Li J., Macdonald J., Von S. F. Review: A comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification // *Analyst*. 2018. 144 (1), 31–67. URL: [https://doi.org/ 10.1039/C8AN01621F](https://doi.org/10.1039/C8AN01621F).
40. Lievens and Thomma. Recent developments in pathogen detection arrays: Implications for fungal plant pathogens // *European Journal of Plant Pathology*. 2005. 113, 75–89. URL: [https://doi.org/ 10.1007/s10658-005-0425-5](https://doi.org/10.1007/s10658-005-0425-5).
41. Virol. Methods. 2014.204, 105–108. URL: [https://doi.org/ 10.1016/j.jviromet.2014.02.031](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.02.031).
42. Liu H. Y., Hopping G. C., Vaidyanathan U., Ronquillo Y. C., Hoopes P. C., Moshirfar M. Polymerase chain reaction and its application in the diagnosis of infectious keratitis // *Med. Hypothesis Discovery Innovation Ophthalmol.* 2019. 8 (3), 152–155.
43. Liu J., Li C., Muhae-Ud-Din G., Liu T., Chen W., Zhang J., et al. Development of the Droplet Digital PCR to Detect the Teliospores of *Tilletia controversa* Kühn in the Soil with Greatly Enhanced Sensitivity // *Front. Microbiol.* 2020. 11, 4. URL: [https://doi.org/ 10.3389/fmicb.2020.00004](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00004).
44. Lobato I. M., O'Sullivan C. K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *TrAC // Trends Anal. Chem.* 2018. 98, 19–35. URL: [https://doi.org/ 10.1016/j.trac.2017.10.015](https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015).
45. Loit K., Adamson K., Bahram M., Puusepp R., Anslan S., Kiiker R., et al. Relative performance of MinION (Oxford nanopore technologies) versus sequel (Pacific biosciences) third-generation sequencing instruments in identification of agricultural and forest fungal pathogens // *Appl. Environ. Microbiol.* 2019. 85 (21), e01368–e01319. URL: [https://doi.org/ 10.1128/AEM.01368-19](https://doi.org/10.1128/AEM.01368-19).

in the Soil With Greatly Enhanced Sensitivity // *Front. Microbiol.* 2020. 11, 4. URL: [https://doi.org/ 10.3389/fmicb.2020.00004](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00004).

44. Lobato I. M., O'Sullivan C. K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *TrAC // Trends Anal. Chem.* 2018. 98, 19–35. URL: [https://doi.org/ 10.1016/j.trac.2017.10.015](https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015).

45. Loit K., Adamson K., Bahram M., Puusepp R., Anslan S., Kiiker R., et al. Relative performance of MinION (Oxford nanopore technologies) versus sequel (Pacific biosciences) third-generation sequencing instruments in identification of agricultural and forest fungal pathogens // *Appl. Environ. Microbiol.* 2019. 85 (21), e01368–e01319. URL: [https://doi.org/ 10.1128/AEM.01368-19](https://doi.org/10.1128/AEM.01368-19).

46. López M. M., Bertolini E., Olmos A., Caruso P., Gorri, M. T., Llop P., et al. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria // *Int. Microbiol.* 2003. 6 (4), 233–243. URL: [https://doi.org/ 10.1007/s10123-003-0143-y](https://doi.org/10.1007/s10123-003-0143-y).

47. López M., Llop P., Olmos A., Marco-Noales E., Cambra M., Bertolini E. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2009. 11, 13–46. URL: [https://doi.org/ 10.21775/cimb.011.013](https://doi.org/10.21775/cimb.011.013).

48. Mandal et al. Recent advances in molecular diagnostics of fungal plant pathogens: A mini-review // *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2011. 27, 1773–1780. URL: [https://doi.org/ 10.1007/s11274-010-0636-8](https://doi.org/10.1007/s11274-010-0636-8).

49. Marc Venbrux, Sam Crauwels, Hans Rediers Current and emerging trends in techniques for plant pathogen detection *Front Plant Sci.* 2023 May 8;14:1120968. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1120968>

50. Martinelli et al. Advanced methods of plant disease detection. A review // *Agronomy for Sustainable Development.* 2015. 35, 1–25, URL: [https://doi.org/ 10.1007/s13593-014-0246-1](https://doi.org/10.1007/s13593-014-0246-1).

51. Maurer J. J. Rapid detection and limitations of molecular techniques // *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2011. 2 (1), 259–279. URL: [https://doi.org/ 10.1146/annurev.food.080708.100730](https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100730).

52. Mehetre G. T., Leo V. V., Singh G., Sorokan A., Maksimov I., Yadav M. K., et al. Current developments and challenges in plant viral diagnostics: A systematic review // *Viruses.* 2021. 13 (3), 412. URL: [https://doi.org/ 10.3390/v13030412](https://doi.org/10.3390/v13030412).

53. Mirmajlessi S. M., Loit E., Mänd M., Mansouripour S. M. Real-time PCR applied to study on plant pathogens: potential applications in diagnosis – a review // *Plant protection Science.* 2015. 15, 177–190. URL: [https://doi.org/ 10.17221/104/2014-PPS](https://doi.org/10.17221/104/2014-PPS).

54. Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. 289 (1), 150–154. URL: [https://doi.org/ 10.1006/bbrc.2001.5921](https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921).

55. Narayanasamy P. // *Microbial plant pathogens-detection and disease diagnosis* (Springer Netherlands), 2011. pp 5–199. URL: [https://doi.org/ 10.1007/978-90-481-9735-4](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9735-4).

56. Nikitinskaya E., Nikitinskiy D., Ivanova E., Ignatov A. Detection of viral infection using new generation sequencing technology in poultry farms of the Russian Federation // *Veterinariya, Zootekhniya*

46. López M. M., Bertolini E., Olmos A., Caruso P., Gorri, M. T., Llop P., et al. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria // *Int. Microbiol.* 2003. 6 (4), 233–243. URL: [https://doi.org/ 10.1007/s10123-003-0143-y](https://doi.org/10.1007/s10123-003-0143-y).

47. López M., Llop P., Olmos A., Marco-Noales E., Cambra M., Bertolini E. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2009. 11, 13–46. URL: [https://doi.org/ 10.21775/cimb.011.013](https://doi.org/10.21775/cimb.011.013).

48. Mandal et al. Recent advances in molecular diagnostics of fungal plant pathogens: A mini-review // *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2011. 27, 1773–1780. URL: [https://doi.org/ 10.1007/s11274-010-0636-8](https://doi.org/10.1007/s11274-010-0636-8).

49. Marc Venbrux, Sam Crauwels, Hans Rediers Current and emerging trends in techniques for plant pathogen detection *Front Plant Sci.* 2023 May 8;14:1120968. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1120968>

50. Martinelli et al. Advanced methods of plant disease detection. A review // *Agronomy for Sustainable Development.* 2015. 35, 1–25, URL: [https://doi.org/ 10.1007/s13593-014-0246-1](https://doi.org/10.1007/s13593-014-0246-1).

51. Maurer J. J. Rapid detection and limitations of molecular techniques // *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2011. 2 (1), 259–279. URL: [https://doi.org/ 10.1146/annurev.food.080708.100730](https://doi.org/10.1146/annurev.food.080708.100730).

52. Mehetre G. T., Leo V. V., Singh G., Sorokan A., Maksimov I., Yadav M. K., et al. Current developments and challenges in plant viral diagnostics: A systematic review // *Viruses.* 2021. 13 (3), 412. URL: [https://doi.org/ 10.3390/v13030412](https://doi.org/10.3390/v13030412).

53. Mirmajlessi S. M., Loit E., Mänd M., Mansouripour S. M. Real-time PCR applied to study on plant pathogens: potential applications in diagnosis – a review // *Plant protection Science.* 2015. 15, 177–190. URL: [https://doi.org/ 10.17221/104/2014-PPS](https://doi.org/10.17221/104/2014-PPS).

54. Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. 289 (1), 150–154. URL: [https://doi.org/ 10.1006/bbrc.2001.5921](https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921).

55. Narayanasamy P. // *Microbial plant pathogens-detection and disease diagnosis* (Springer Netherlands), 2011. pp 5–199. URL: [https://doi.org/ 10.1007/978-90-481-9735-4](https://doi.org/10.1007/978-90-481-9735-4).

56. Nikitinskaya E., Nikitinskiy D., Ivanova E., Ignatov A. Detection of viral infection using new generation sequencing technology in poultry farms of the Russian Federation // *Veterinariya, Zootekhniya i Biotehnologiya.* 2024.10. URL: [https://doi.org/ 10.36871/vet.zoo.bio.202410014](https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202410014)

57. Piepenburg O., Williams C. H., Stemple D. L., Armes N. A. DNA Detection using recombination proteins // *PLoS Biol.* 2006. 4 (7), e204. URL: [https://doi.org/ 10.1371/journal.pbio.0040204](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204).

58. Piombo E., Abdelfattah A., Droby S., Wisniewski M., Spadaro D., Schena L. Metagenomics approaches for the detection and surveillance

i Biotekhnologiya. 2024.10.URL:<https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202410014>

57. Piepenburg O., Williams C. H., Stemple D. L., Armes N. A. DNA Detection using recombination proteins // *PloS Biol.* 2006. 4 (7), e204. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>.

58. Piombo E., Abdelfattah A., Droby S., Wisniewski M., Spadaro D., Schena L. Metagenomics approaches for the detection and surveillance of emerging and recurrent plant pathogens // *Microorganisms*. 2021. 9 (1). URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010188>.

59. Postollec F., Falentin H., Pavan S., Combrisson J., Sohier D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology // *Food Microbiol.* 2011. 28 (5), 848–861. URL: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.008>.

60. Quince C., Walker A. W., Simpson J. T., Loman N. J., Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis // *Nat. Biotechnol.* 2017. 35 (9). URL: <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>.

61. Rajagopal A., Yurk D., Shin C., Menge K., Jacky L., Fraser S., et al. Significant expansion of real-time PCR multiplexing with traditional chemistries using amplitude modulation // *Sci. Rep.* 2019. 9 (1). URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37732-y>.

62. Reller L. B., Weinstein M. P., Petti C. A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing // *Clin. Infect. Dis.* 2007. 44 (8), 1108–1114. URL: <https://doi.org/10.1086/512818>.

63. Riley M., Williamson M., Maloy O. Plant disease diagnosis // *Plant Health Instructor*. 2002. URL: <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2002-1021-01>.

64. Roossinck M. J., Martin D. P., Roumagnac P. Plant virus metagenomics: Advances in virus discovery // *Phytopathology*®. 2015. 105 (6), 716–727. URL: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW>.

65. Schaad N. W., Frederick R. D., Shaw J., Schneider W. L., Hickson R., Petrillo M. D., et al. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2003. 41 (1), 305–324. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095435>.

66. Sharpton T. J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data // *Front. Plant Sci.* 2014. 5. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00209>.

67. Shen C.-H. “Chapter 9—amplification of nucleic acids,” in *Diagnostic molecular biology*. Ed. Shen C.-H. (Academic Press). 2019. 215–247. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00009-2>.

68. Simon G. Edwards, John O’Callaghan, Alan D.W.Dobson. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi // *Mycological Research*. 2002. 106 (9), Pages 1005–1025. URL: <https://doi.org/10.1017/S0953756202006354>

69. Singh A., Jones S., Ganapathysubramanian B., Sarkar S., Mueller D., Sandhu K., et al. Challenges and opportunities in machine-augmented plant stress phenotyping. // *Trends Plant Sci.* 2021. 26 (1), 53–69. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.07.010>.

70. Slovareva O., Desyaterik A., Domoratskaya D. PCR IDENTIFICATION PSEUDOMONAS FUSCOVAGINAE, A PATHOGEN OF CEREAL CROPS // *Risovodstvo*. 2024. 23, 1(62), 27–35. URL: <https://doi.org/10.33775/1684-2464-2024-62-1-27-35>

71. Tanner F., Tonn S., de Wit J., Van den Ackerveken G., Berger B., Plett D. Sensor-based phenotyping of above-ground plant-pathogen interactions // *Plant*

of emerging and recurrent plant pathogens // *Microorganisms*. 2021. 9 (1). URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010188>.

59. Postollec F., Falentin H., Pavan S., Combrisson J., Sohier D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology // *Food Microbiol.* 2011. 28 (5), 848–861. URL: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.008>.

60. Quince C., Walker A. W., Simpson J. T., Loman N. J., Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis // *Nat. Biotechnol.* 2017. 35 (9). URL: <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>.

61. Rajagopal A., Yurk D., Shin C., Menge K., Jacky L., Fraser S., et al. Significant expansion of real-time PCR multiplexing with traditional chemistries using amplitude modulation // *Sci. Rep.* 2019. 9 (1). URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37732-y>.

62. Reller L. B., Weinstein M. P., Petti C. A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing // *Clin. Infect. Dis.* 2007. 44 (8), 1108–1114. URL: <https://doi.org/10.1086/512818>.

63. Riley M., Williamson M., Maloy O. Plant disease diagnosis // *Plant Health Instructor*. 2002. URL: <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2002-1021-01>.

64. Roossinck M. J., Martin D. P., Roumagnac P. Plant virus metagenomics: Advances in virus discovery // *Phytopathology*®. 2015. 105 (6), 716–727. URL: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW>.

65. Schaad N. W., Frederick R. D., Shaw J., Schneider W. L., Hickson R., Petrillo M. D., et al. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2003. 41 (1), 305–324. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095435>.

66. Sharpton T. J. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data // *Front. Plant Sci.* 2014. 5. URL: <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00209>.

67. Shen C.-H. “Chapter 9—amplification of nucleic acids,” in *Diagnostic molecular biology*. Ed. Shen C.-H. (Academic Press). 2019. 215–247. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00009-2>.

68. Simon G. Edwards, John O’Callaghan, Alan D.W.Dobson. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi // *Mycological Research*. 2002. 106 (9), Pages 1005–1025. URL: <https://doi.org/10.1017/S0953756202006354>

69. Singh A., Jones S., Ganapathysubramanian B., Sarkar S., Mueller D., Sandhu K., et al. Challenges and opportunities in machine-augmented plant stress phenotyping. // *Trends Plant Sci.* 2021. 26 (1), 53–69. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.07.010>.

70. Slovareva O., Desyaterik A., Domoratskaya D. PCR IDENTIFICATION PSEUDOMONAS FUSCOVAGINAE, A PATHOGEN OF CEREAL CROPS // *Risovodstvo*. 2024. 23, 1(62), 27–35. URL: <https://doi.org/10.33775/1684-2464-2024-62-1-27-35>

71. Tanner F., Tonn S., de Wit J., Van den Ackerveken G., Berger B., Plett D. Sensor-based phenotyping of above-ground plant-pathogen interactions // *Plant Methods*. 2022. 18 (1), 35. URL: <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00853-7>.

Methods. 2022. 18 (1), 35. URL: <https://doi.org/10.1186/s13007-022-00853-7>.

72. Taylor S. C., Laperriere G., Germain H. Drop-let digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: From variable nonsense to publication quality data // *Sci. Rep.* 2017. 7 (1). URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x>.

73. Tewari D., Cieply S., Livengood J. Identification of bacteria recovered from animals using the 16S ribosomal RNA gene with pyrosequencing and Sanger sequencing // *J. Vet. Diagn. Invest.* 2011. 23 (6), 1104–1108. URL: <https://doi.org/10.1177/1040638711425583>.

74. Thies J. Chapter 6 – Molecular Approaches to Studying the Soil Biota. In Eldor Paul A. Ed // *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition)*. (Academic Press). 2015. 151–185. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415955-6.00006-2>.

75. Toh S. Y., Citartan M., Gopinath S. C. B., Tang T.-H. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay // *Biosensors Bioelectron.* 2015. 64, 392–403. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.026>.

76. Välimaa A.-L., Tilsala-Timisjärvi A., Virtanen E. Rapid detection and identification methods for listeria monocytogenes in the food chain – a review // *Food Control* 2015. 55, 103–114. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.037>.

77. Wang X., Shang X., Huang X. Next-generation pathogen diagnosis with CRISPR/Cas-based detection methods // *Emerging Microbes Infect.* 2020. 9 (1), 1682–1691. URL: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1793689>.

78. Ward E., Foster S. J., Fraaije B. A., McCartney H. A. Plant pathogen diagnostics: Immunological and nucleic acid-based approaches // *Ann. Appl. Biol.* 2004. 145 (1), 1–16. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2004.tb00354.x>.

79. Zhao X., Lin C.-W., Wang J., Oh D. H. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. 24 (3), 297–312. URL: <https://doi.org/10.4014/jmb.1310.10013>.

80. Zhao Y., Xia Q., Yin Y., Wang Z. Comparison of droplet digital PCR and quantitative PCR assays for quantitative detection of *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* // *PloS One*. 2016. 11 (7), e0159004. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159004>.

81. Zubler and Yoon. Proximal Methods for Plant Disease Detection Using Hyperspectral Imaging // *Mol Remote Sensing*. 2020. 12, 3539. URL: <https://doi.org/10.3390/rs12213539>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Никитинский Денис Александрович, младший научный сотрудник-начальник ЦКП «Молекулярная генетика» ФГБУ «ВНИИГР», р. п. Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия; *ORCID: 0009-0009-1679-9893*, *e-mail: denpreffect@gmail.com*

Никитинская Екатерина Вадимовна, младший научный сотрудник ЦКП «Молекулярная генетика» ФГБУ «ВНИИГР», р. п. Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия; *ORCID: 0009-0002-0991-9841*, *e-mail: nikitinskajacat@yandex.ru*

72. Taylor S. C., Laperriere G., Germain H. Drop-let digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: From variable nonsense to publication quality data // *Sci. Rep.* 2017. 7 (1). URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x>.

73. Tewari D., Cieply S., Livengood J. Identification of bacteria recovered from animals using the 16S ribosomal RNA gene with pyrosequencing and Sanger sequencing // *J. Vet. Diagn. Invest.* 2011. 23 (6), 1104–1108. URL: <https://doi.org/10.1177/1040638711425583>.

74. Thies J. Chapter 6 – Molecular Approaches to Studying the Soil Biota. In Eldor Paul A. Ed // *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry (Fourth Edition)*. (Academic Press). 2015. 151–185. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415955-6.00006-2>.

75. Toh S. Y., Citartan M., Gopinath S. C. B., Tang T.-H. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay // *Biosensors Bioelectron.* 2015. 64, 392–403. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.09.026>.

76. Välimaa A.-L., Tilsala-Timisjärvi A., Virtanen E. Rapid detection and identification methods for listeria monocytogenes in the food chain – a review // *Food Control* 2015. 55, 103–114. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.037>.

77. Wang X., Shang X., Huang X. Next-generation pathogen diagnosis with CRISPR/Cas-based detection methods // *Emerging Microbes Infect.* 2020. 9 (1), 1682–1691. URL: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1793689>.

78. Ward E., Foster S. J., Fraaije B. A., McCartney H. A. Plant pathogen diagnostics: Immunological and nucleic acid-based approaches // *Ann. Appl. Biol.* 2004. 145 (1), 1–16. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2004.tb00354.x>.

79. Zhao X., Lin C.-W., Wang J., Oh D. H. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens // *J. Microbiol. Biotechnol.* 2014. 24 (3), 297–312. URL: <https://doi.org/10.4014/jmb.1310.10013>.

80. Zhao Y., Xia Q., Yin Y., Wang Z. Comparison of droplet digital PCR and quantitative PCR assays for quantitative detection of *Xanthomonas citri* subsp. *Citri* // *PloS One*. 2016. 11 (7), e0159004. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159004>.

81. Zubler and Yoon. Proximal Methods for Plant Disease Detection Using Hyperspectral Imaging // *Mol Remote Sensing*. 2020. 12, 3539. URL: <https://doi.org/10.3390/rs12213539>.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Denis Nikitinsky, Junior Researcher, Head of the Resource Sharing Center “Molecular Genetics”, FGBU “VNIIGR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; *ORCID: 0009-0009-1679-9893*, *e-mail: denpreffect@gmail.com*

Ekaterina Nikitinskaya, Junior Researcher, Specialist of the Resource Sharing Center “Molecular Genetics”, FGBU “VNIIGR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; *ORCID: 0009-0002-0991-9841*, *e-mail: nikitinskajacat@yandex.ru*