

Оригинальная статья / Original article

УДК 632.937:635.63

DOI: <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-401-411>



Испытание влияния новых биопестицидов на возбудителей болезней овощей с применением ДНК-маркеров

© Н.Е. Павловская, И.Н. Гагарина, А.Ю. Гаврилова, Д.Б. Бородин

Орловский государственный аграрный университет им. Н.В. Парахина,
г. Орел, Российская Федерация

Резюме: В условиях защищенного грунта овощи подвергаются воздействию различных вредителей и возбудителей вирусных, бактериальных или грибковых болезней. Выращивание овощей в закрытом грунте требует исключения всех химических средств обработки и контроля над возбудителями болезней и вредителями. В связи с этим применение более чувствительных методов в диагностике патогенов является актуальным и востребованным. Неоценимую роль при этом играют молекулярные маркеры. В настоящей работе для идентификации наиболее распространенных заболеваний томата (*Xanthomonas euvesicatoria*), огурца (*Ascochyta cucumis*) и картофеля (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*) использована полимеразная цепная реакция. Установлено, что ранняя диагностика заболеваний овощных культур методами, основанными на полимеразной цепной реакции, позволяет обнаруживать следовые количества патогенных микроорганизмов в максимально сжатые сроки и отбирать для борьбы с ними эффективные препараты, обладающие фунгицидным действием. Создание биологических средств защиты овощных культур особенно актуально в связи с их значимостью в питании как источников витаминов и минеральных веществ. Нами были испытаны новые биологические средства защиты овощных культур в условиях закрытого грунта. В ходе исследований фунгицидное действие на возбудителя болезней томатов – черную бактериальную пятнистость (*Xanthomonas euvesicatoria*), и возбудителя аскохитоза огурца (*Ascochyta cucumis*) проявил запатентованный нами препарат для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта. Также фунгицидное действие на развитие *Phytophthora* на картофеле проявил препарат, запатентованный как средство предпосевной обработки семян гороха. Отмечено, что действие этих препаратов эффективно при замачивании семян и двойной обработке растений в период цветения растворами с концентрацией $10^{-4}\%$.

Ключевые слова: биопестициды, картофель, томат, огурец, бактериальные болезни

Информация о статье: Дата поступления 29 января 2019 г.; дата принятия к печати 31 августа 2020 г.; дата онлайн-размещения 30 сентября 2020 г.

Для цитирования: Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Гаврилова А.Ю., Бородин Д.Б. Испытание влияния новых биопестицидов на возбудителей болезней овощей с применением ДНК-маркеров. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. N 3. С. 401–411. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-401-411>

Testing the effect of new biopesticides on soilborne pathogens of vegetable diseases using DNA markers

Ninel E. Pavlovskaya, Irina N. Gagarina,
Anna Yu. Gavrilova, Dmitry B. Borodin

Orel State Agrarian University named after N.V. Parakhin, Orel, Russian Federation

Abstract: In protected ground, vegetables are exposed to various pests and pathogens of viral, bacterial or fungal diseases. Growing vegetables indoors requires the elimination of all chemical treatments and control over pathogens and pests. In this regard, the application of sensitive methods based on molecular markers in the diagnostics of pathogens is highly relevant. In this work, polymerase chain reaction was used to identify the most common diseases of tomato (*Xanthomonas euvesicatoria*), cucumber (*Ascochyta cucumis*) and potato (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*) plants. It was established that early diagnosis of

vegetable diseases using polymerase chain reaction allows rapid detection of trace amounts of pathogenic microorganisms thus facilitating selection of effective fungicidal preparations. The creation of biological protection for vegetable crops is relevant considering their nutritional importance. New biological methods for protecting vegetables in greenhouses were tested. Thus, the fungicidal effect of the authors' patented preparation developed for pre-sowing treatment of vegetable seeds in protected ground on the pathogens of tomato black bacterial spot (*Xanthomonas euvesicatoria*) and cucumber stem hypertrophy (*Ascochyta cucumis*) was confirmed. Another preparation patented as a means of pre-sowing treatment of pea seeds demonstrated fungicidal action against the development of *Phytophthora infectans* on potato plants. It was observed that these preparations are effective at concentrations of $10^{-4}\%$ for soaking seeds and double treatment of plants during the flowering period.

Keywords: biopesticides, potatoes, tomato, cucumber, bacterial diseases

Information about the article: Received January 29, 2019; accepted for publication August 31, 2020; available online September 30, 2020.

For citation: Pavlovskaya NE, Gagarina IN, Gavrilova AYU, Borodin DB. Testing the effect of new biopesticides on soilborne pathogens of vegetable diseases using DNA markers. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):401–411. (In Russian) <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-401-411>

ВВЕДЕНИЕ

Овощи занимают важнейшее место в рационе питания человека, так как являются источником витаминов, углеводов, органических кислот, микроэлементов, необходимых для полноценной жизнедеятельности человека. Так, для удовлетворения спроса в овощах жителей нашей страны необходимо производить 20477,8 тыс. т в год. Однако в рационе жителей России доля овощей ниже, чем большинства развитых стран. В среднем обеспеченность населения нашей страны овощами составляет 41,5%, что в 4 раза ниже нормы. Например, объема производимого в стране картофеля (28–32 млн т в год) явно недостаточно. Импортные овощи, выращенные в закрытом грунте, в структуре потребления жителей страны занимают 70%, ежегодно недостаток компенсируется импортом из таких стран, как Турция, Израиль, Нидерланды и Китай [1].

Объявленные России санкции стали толчком для развития собственного сельского хозяйства [2]. Повышаются объемы производства, сокращается импорт продовольствия, открываются новые предприятия, растет привлекательность многих отраслей, в том числе растениеводство в защищенном грунте. По данным Союза производителей овощей, прирост тепличных площадей в 2018 г. составил 154 га.

Вместе с тем в условиях защищенного грунта овощи подвергаются воздействию различных вредителей и возбудителей вирусных, бактериальных и грибковых болезней. Болезней тепличных культур существует множество: это корневые и стеблевые гнили, ржавчины, мучнистые росы ложные и настоящие, различного рода пятнистости, увядания, токсикозы, вирозы, фитоплазмозы. Каждую из болезней перечисленных групп могут вызывать генетически различные формы патогенов, и для воздействия практически на каждую из них нужен отдельный эффективный препарат строго определенной химиче-

ской природы, способный подавлять развитие возбудителей заболеваний, оказывать лечебное влияние на растения [3].

По данным ООН и других международных организаций, ежегодные потери урожая овощей всех сельскохозяйственных культур от болезней и вредителей составляют около 35% валовых сборов урожая. Инфекции сельскохозяйственных культур также влияют на доходность продукции за счет снижения качества [4, 5].

Существует ряд методов по выявлению возбудителей болезней. В полевых условиях предварительный диагноз болезней, вызываемых фитопатогенными грибами, ставят по проявлению симптомов заболевания, а точную идентификацию возбудителя проводят в лаборатории главным образом по морфологии спор и другим морфолого-культуральным признакам патогена с применением методов микроскопии и культивирования на питательных средах. Однако морфологические характеристики спор у близкородственных видов микромицетов могут совпадать, а внутри одного вида значительно варьировать. Кроме того, симптомы болезни могут проявляться нетипично или заболевание может проходить в скрытой форме [6, 7].

В связи с этим применение более чувствительных методов является актуальным и востребованным в диагностике фитопатогенов. Неоценимую роль при этом играют молекулярные маркеры. С их помощью составлены подробные молекулярные карты генома человека и десятков видов растений и животных, на которые нанесены важнейшие гены, определяющие рост и развитие организмов, морфологические признаки, устойчивость к заболеваниям и другие свойства. Использование молекулярных маркеров позволяет значительно ускорять процесс селекции [7]. В настоящее время насчитывается несколько десятков типов молекулярных маркеров. Наиболее широко используемые ДНК-маркеры моно-

локусные: CAPS, SCAR, SNP; мультилокусные: SSAP, IRAP, DaT. Их разделяют на три группы согласно основному методу анализа: маркеры, исследуемые с помощью блот-гибридизации, ПЦР и ДНК-чипов [8]. С помощью молекулярных маркеров можно: ускорять процесс селекции; сокращать площади, занятые селекционным материалом; достигать более высокой точности отбора; добиваться экономии трудовых и материальных ресурсов.

Системы молекулярного маркирования хозяйственно ценных признаков разрабатываются с 90-х гг. прошлого века и применяются в овощеводстве на томатах, перце, баклажанах, луке и других культурах.

Ранняя диагностика заболеваний, например, методами, основанными на полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяет обнаруживать следовые количества патогенных микроорганизмов в максимально сжатые сроки [9], выбрать и своевременно применить меры защиты, что снижает экономические риски сельского хозяйства, связанные с заболеваниями растений. Данные методы превосходят традиционные по специфичности, чувствительности, скорости проведения анализа, производительности и служат их существенным дополнением. Кроме того, их применение не требует глубоких знаний биологии и морфологии исследуемых микроорганизмов. Однако, несмотря на широкое применение в качестве инструмента исследования, использование технологий на основе ПЦР в сельском хозяйстве на практике по-прежнему ограничено [10].

В нашей стране наиболее востребованными овощами является картофель, а основными культурами защищенного грунта – огурец и томат, поэтому требуется тщательное изучение причин возникновения наиболее распространенных заболеваний и разработки методов борьбы с ними.

Среди заболеваний огурца отмечены бактериальная прикорневая гниль (бактерии *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*), аскохитоз (гриб *Ascochyta cucumeris*), мучнистая роса (Гриб *Erysiphe cichoracearum*), вирусные заболевания (ВОВ, ВЗМО).

Томаты наиболее часто поражаются фузариозами (виды грибов *Fusarium*), серой гнилью (гриб *Botrytis cinerea*), мучнистой росой и фитофторозом. Мозаика томатов вызывается вирусом табачной мозаики – *Nicotiana virus* (*Virothrix ivanovskii*, *Tobacco virus 1*). Стрик вызывается одним вирусом либо комплексом двух, а иногда трех вирусов: табачной мозаики, реже – огуречной мозаики или чаще в сочетании с X-вирусом картофеля [11].

Среди болезней картофеля особенно распространены являются: фитофтороз (*Phytophthora infestans*), ризоктониоз (*Rhizoctonia sola-*

ni), черная ножка (бактерии *Pectobacterium*), парша обыкновенная (*Streptomyces scabies*): макроспориоз (*Macrosporium solani* Ell. Et Mart.), кольцевая гниль (*Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*), а также вирусные болезни, вызываемые вирусами «М и L вирусы картофеля – РВ», «S и А вирусы картофеля – РВ», «Х и Y вирусы картофеля – РВ» [12].

В связи с ограничением применения химических препаратов на овощных культурах в период вегетации основное внимание в борьбе с вредителями уделяют качественному и своевременному проведению профилактических мероприятий, а также методам биологической борьбы и внедрению устойчивых сортов [13].

Сегодня в сельском хозяйстве развитых стран наблюдается тенденция к переходу на органические технологии земледелия и растениеводства, подразумевающие выращивание сельскохозяйственных культур без применения агрохимикатов. Однако по применению биологических средств защиты растений и биоудобрений Россия отстает от развитых стран мира в 30 раз. Эта ситуация существенно ограничивает конкурентоспособность российского агросектора и снижает экспортный потенциал российской сельхозпродукции.

Создание биологических средств защиты овощных культур особенно актуально ввиду их значимости в питании как источников витаминов и минеральных веществ. Выращивание овощей в закрытом грунте требует исключения всех химических средств обработки и контроля над возбудителями болезней и вредителями. Однако пока против главных болезней огурца и томата разрешенных эффективных средств защиты практически нет [14].

Рынок биопестицидов в России оценивается в 5 раз ниже, чем в Европейском Союзе (около 60 млн долл.) и в 10 раз – чем в США (около 120 млн долл.). На сегодняшний день объем применения биологических средств защиты растений в России составляет всего 1–2% [11].

Из наиболее распространенных заболеваний картофеля одним из самых опасных считается кольцевая гниль, вызываемая бактерией *Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*. Болезнь распространена в странах Северной Европы и Канады. Можно ожидать, что в связи с глобальным потеплением ареал распространения этого карантинного объекта будет расширяться [15]. Заболеванию способствуют повышенная температура воздуха и высокая влажность почвы. Кольцевая гниль крайне вредоносна. Сильно пораженные клубни обычно гниют, не давая всходов, слабо пораженные растения в результате их общего угнетения образуют значительно меньше клубней. Потери урожая от кольцевой гнили в отдельные годы могут достигать 45%. Болезнь проявляется в стеблевой и клубневой

формах. Меры борьбы включают оптимальную агротехнику, соблюдение севооборота, подбор относительно устойчивых сортов, тщательное уничтожение растительных остатков, обработку семян пестицидами перед посевной, обработку растений пестицидами в течение вегетационного периода.

Аскохитоз (*Ascochyta cucumis*) развивается у растений огурца, выращиваемого в тепличных условиях. Поражаются листья, стебли, реже плоды. На листьях – крупные желтовато-бурые пятна, которые сильно разрастаются, светлеют, подсыхают. Пораженная ткань имеет разрывы и может покрываться черными точечными пикнидами. Сильно пораженные листья засыхают. Аскохитоз сильнее проявляется в период массового плодоношения. Благоприятствуют развитию болезни высокая влажность и ослабленное состояние растений (недостаток питания, резкие колебания температуры, плохая агротехника и обильное плодоношение) [16].

При поражении черной бактериальной пятнистостью (*Xanthomonas euvesicatoria*) растения томата хуже развиваются и приобретают угнетенный вид. Заболевание может проявляться на растении в течение всей его жизни в виде мелких водянистых точечных пятен на семядолях, листьях, черешках, стеблях и плодах. Со временем пятна чернеют, листья желтеют, сеянцы могут погибнуть.

Целью данной работы являлось испытание влияния вновь созданных биологических средств защиты овощных культур от некоторых возбудителей заболеваний томата (*Xanthomonas euvesicatoria*), огурца (*Ascochyta cucumis*) и картофеля (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для исследования были взяты огурец сорта Герман F1, томат сорта Санька, картофель сорта Голубизна. На томатах и огурце испытывался новый биологический препарат, защищенный патентом РФ № 2626174 [17], индуцирующий болезнеустойчивость растений овощных культур за счет компонентов сигнальной системы устойчивости на основе метаболитов гриба *Trichoderma* (далее – препарат 1), а на картофеле – препарат, защищенный патентом РФ № 2463759 [18], усиливающий иммунитет растений на основе биофлавоноидов гречихи (далее – препарат 2). Идентификацию возбудителей болезней (кольцевой гнили картофеля (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*), черной бактериальной пятнистости томатов (*Xanthomonas euvesicatoria*), аскохитозы огурца (*Ascochyta cucumis*; *Phoma cucurbitacearum*; *Didymella bryoniae*)) проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в прописи «Биоком».

Перед посевом на 2 ч замачивали: семена

томатов и огурцов – в растворе препарата 1, картофель, предназначенный для посадки, – в растворе препарата 2. Растворы препаратов 1 и 2 имели концентрацию 10⁻⁴%. В период цветения растений проводили их двукратное опрыскивание этими же растворами. Также дважды опрыскивали растения, посеянные без предварительного замачивания семян в растворах применяемых препаратов. Контролем служили ничем не обработанные растения и растения, обработанные промышленным препаратом Фитоспорин М (препарат микробиологического происхождения, созданный на основе живых бактерий *Bacillus Subtilis* (клетки сенной палочки, штамм 26D), имеющий широкий спектр действия).

Для выделения ДНК из объектов использовали комплект реагентов «Проба-ГС» (ООО «АгроДиагностика» (Москва, Россия), предназначенный для работы с культурами бактерий, смывами с твердых питательных сред, цистами, а также материалом, в котором присутствует значительное количество ингибирующих примесей.

Метод применения комплекта «Проба-ГС» основан на использовании лизиса клеток сильного хаотропного агента – гуанидина тиоционата (GuSCN), и последующей сорбции ДНК на носителе (стеклянные бусы, диатомовая земля, стеклянное «молоко» и т.д.).

Протокол проведения анализа. При выделении ДНК из мицелия гриба или растительной ткани достаточно в 50 мкл лизирующего буфера набора «Проба-ГС» гомогенизировать 25–50 мг ткани исследуемого растения. Для выявления и диагностики бактериальных и грибковых заболеваний овощных культур были использованы:

1) комплект реагентов производства ООО «АгроДиагностика» для ПЦР-амплификации ДНК *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* – кольцевой гнили картофеля. Для проведения амплификации ДНК возбудителя использовали праймеры с нуклеотидной последовательностью PSA-F (5'-ctc ctt gtg ggg tgg gaa aa-3') и PSA-R (5'-tac tga gat gtt tca ctt ccc c-3');

2) комплект реагентов производства ООО «АгроДиагностика» для ПЦР-амплификации ДНК *Xanthomonas euvesicatoria* – черной бактериальной пятнистости томата. Для идентификации возбудителя использовали праймеры SSU-642-F (5'-gtcrtccydccttcctc-3') и SSU-1445-R (5'-haathygtgccagcagc-3');

3) комплект реагентов производства ООО «АгроДиагностика» для ПЦР-амплификации ДНК грибов *Ascochyta*, *Didymella*, *Phoma*. Для проведения амплификации ДНК возбудителя аскохитоза огурца использовали праймеры с нуклеотидной последовательностью didy70 – (5' ctttgctgccatctcttacc – 3') и didy300 – (5' gcgttcaagattcgatgattca- 3').

Результаты анализировали методом горизонтального гель-электрофореза.

Для анализа с растений брали пробы в различные фазы: цветения, плодоношения и технической спелости.

Идентификация возбудителей болезней проводилась на разных стадиях развития растений: на листьях в фазу цветения и плодоношения, на клубнях картофеля, плодах томатов и огурца – в фазу технической спелости.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе изучения влияния новых биопестицидов на возбудителей болезней овощных культур на клубнях картофеля в контрольном варианте были выявлены признаки заболевания фитофторозом. Клубни, обработанные Фитоспорином М и препаратом 2, были свободны от *Phytophthora* (рис. 1).

Наименьшая распространенность болезни и ее развитие отмечались на варианте с применением биологического пестицида Нигор. При обработке Фитоспорином М распространенность и развитие болезни были выше, что составляло 7,6–4,3% по сравнению с контролем.

По результатам ПЦР на наличие возбудителя кольцевой гнили картофеля в разные фазы развития растения с детекцией в формате электрофореза показано, что полученные фрагменты ДНК размером 502 п.о. в контрольном образце принадлежат бактерии *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, которая является анаморфой возбудителя кольцевой гнили. В исследуемых образцах наличие возбудителей не детектируется (рис. 2).

На листьях огурцов во время цветения визуально развитие аскохитоза не отмечалось, первые признаки заболевания были выявлены в фазе начала плодоношения (рис. 3).

В фазу плодоношения на листьях контрольных вариантов отмечалось повсеместное развитие аскохитоза (рис. 3, 1), в вариантах с применением Фитоспорином М (рис. 3, 2) и препарата 1 явных признаков заболевания не отмечено.

На рис. 4 представлены результаты ПЦР на аскохитоз огурца в различных фазах развития с детекцией в формате электрофореза. Показано, что полученные фрагменты ДНК размером 300 п.о. в контрольном образце принадлежат грибам *Didymella bryoniae* и *Phoma* sp., которые являются анаморфой возбудителя аскохитоза. В исследуемых образцах детектируется наличие возбудителей аскохитоза в фазах цветения и плодоношения в вариантах без обработки.

Методом ДНК-технологии установлено, что заболевание проявилось на листьях контрольного варианта уже в стадии цветения (рис. 4.1), а также в фазе плодоношения (рис. 4, 5), но в плодах технической спелости маркер не выявлен (рис. 4, 9). В вариантах с обработкой Фитоспорином М и биологическим препаратом признаки поражения аскохитозом не обнаружены (рис. 4, 2–4; 6–12).

Результаты исследования показали, что обработка биологическим пестицидом снижает развитие бурой гнили на томате Санька (рис. 5). В фазу цветения заболевание не было отмечено ни на одном варианте. Заболевание начало развиваться в период плодоношения и было отмечено в контрольном варианте и в варианте с обработкой биологическим пестицидом при опрыскивании. Во время технической спелости томатов максимальное развитие заболевания было отмечено в контрольном варианте – 10,2%, минимальное развитие заболевания – в варианте с применением биологического пестицида – 2,1%. Обработка биопрепаратом Фитоспорин М также показала хорошее действие, развитие заболевания составило 2,9%.

По результатам проведения ПЦР на выявление черной бактериальной пятнистости в различных фазах развития томата с детекцией в формате электрофореза в контрольном образце выявлены фрагменты ДНК размером 614 п.о., принадлежащие грибам *Xanthomonas euvesicatoria*, которые являются возбудителем названного заболевания. В исследуемых образцах детектируется наличие возбудителей в фазах цветения и плодоношения в образцах без обработки.

Молекулярный метод диагностики выявил скрытую инфекцию уже на стадии цветения в контрольном варианте (рис. 6: 1, 5). Ни в варианте с Фитоспорином М (рис. 6: 2, 6, 10), ни в варианте с обработкой биологическим препаратом (рис. 6: 4, 7, 8, 11, 12) маркер возбудителя бактериальной пятнистости не обнаружен. Следует отметить, что в контрольном варианте в стадии технической спелости плода возбудитель также не выявлен.

В результате проведенных исследований таких овощных культур, как томаты, огурцы и картофель в разные фазы развития растений бактериальные или грибковые заболевания были выявлены только в контрольных образцах, не подвергавшихся обработке препаратами.

Таким образом, можно сделать заключение, что фитопатогенная инфекция на овощных культурах, в частности, на картофеле, проявляется в основном в стадии цветения, что связано, очевидно, с пиком максимального заражения вирусной инфекцией, источником которой являются многие агрономические факторы (сорняки, микроранения и др.).

Фитопатогенная инфекция размножается в образцах, не обработанных биологическими препаратами, в составе которых содержатся биологически активные соединения микробного и растительного происхождения.

В дальнейших исследованиях проводили подбор растительного и микробного компонента для довизуальной диагностики наличия вирусной, бактериальной или грибковой инфекции в овощах, а также компонента, снижающего фито-

патогенную нагрузку, в питательных средах для частности, картофеля.
 микрклонального размножения растений, в



Рис. 1. Влияние биологических препаратов на развитие фитофтороза у клубней картофеля сорта Голубизна: 1 – контроль; 2 – Фитоспорин М; 3 – препарат 2 (обработка семян + опрыскивание); 4 – препарат 2 (опрыскивание)

Fig. 1. Influence of a biological drug on the development of Phytophthora in potato tuber:
 1 – control; 2 – Fitosporin M; 3 – Preparation 2 (seed treatment + spraying); 4 – Preparation 2 (spraying)

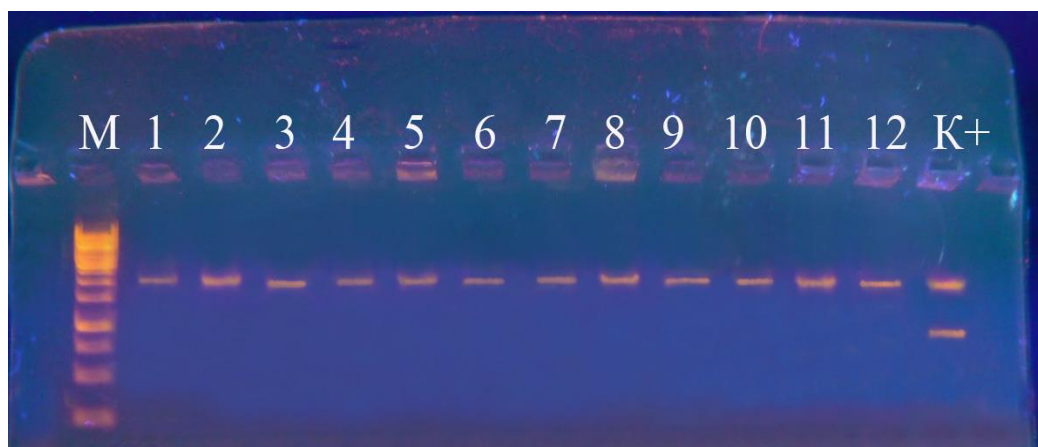


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации на наличие возбудителя болезни в растениях картофеля сорта Голубизна на различных стадиях развития:

- 1 – фаза цветения, контроль без обработки;
- 2 – фаза цветения, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
- 3 – фаза цветения, обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
- 4 – фаза цветения, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
- 5 – фаза плодоношения, контроль без обработки;
- 6 – фаза плодоношения, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
- 7 – фаза плодоношения, обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
- 8 – фаза плодоношения, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
- 9 – плоды, техническая спелость, контроль без обработки;
- 10 – плоды, техническая спелость, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
- 11 – плоды, техническая спелость, обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
- 12 – плоды, техническая спелость, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
- K+ – контроль с присутствием возбудителя

Fig. 2. Electrophoregram of amplification products for the presence of the pathogen ring rot in plants of the variety "Blue" at different stages of development:

- 1 – Leaves. Flowering phase, control without treatment;
- 2 – Flowering phase, control treated with the biological product "Fitosporin M";
- 3 – Flowering phase, treated with a biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
- 4 – Flowering phase, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
- 5 – Fruiting phase, control without treatment;
- 6 – Fruiting phase, control treated with the biological product "Fitosporin M";
- 7 – Fruiting phase, treated with biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
- 8 – Leaves. Fruiting phase, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
- 9 – Root crop., technical ripeness, control without processing;
- 10 – technical ripeness, control treated with the biological product "Fitosporin M";
- 11 – technical ripeness, treated with a biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
- 12 – technical ripeness, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
- K+ – control with the presence of the pathogen



Рис. 3. Влияние биологического препарата на развитие аскохитоза у огурца сорта Герман F1:
 1 – контроль; 2 – Фитоспорин М; 3 – препарат 1 (обработка семян + опрыскивание); 4 – препарат 1 (опрыскивание)

Fig. 3. Influence of a biological drug on the development of Ascochyta *Ascochyta cucumis* cucumber German F1:
 1 – control; 2 – Fitosporin M; 3 – Preparation 1 (seed treatment + spraying); 4 – Preparation 1 (spraying)

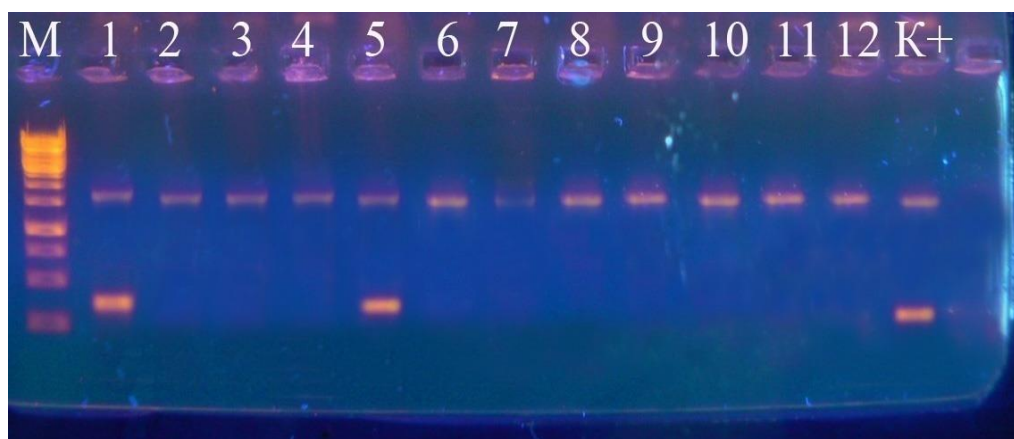


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации на наличие возбудителя болезни в огурцах сорта Герман F 1 на различных стадиях развития растения:

- 1 – фаза цветения, контроль без обработки;
- 2 – фаза цветения, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
- 3 – фаза цветения, обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
- 4 – фаза цветения, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
- 5 – фаза плодоношения, контроль без обработки;
- 6 – фаза плодоношения, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
- 7 – фаза плодоношения, обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
- 8 – фаза плодоношения, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
- 9 – плоды, техническая спелость, контроль без обработки;
- 10 – плоды, техническая спелость, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
- 11 – плоды, техническая спелость, контроль обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
- 12 – плоды, техническая спелость, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
- K+ – контроль с присутствием возбудителя

Fig. 4. Electrophoregram of amplification products for the presence of the pathogen in plants of the cucumber variety "German F 1" at different stages of development:

- 1 – Leaves. Flowering phase, control without treatment;
- 2 – Flowering phase, control treated with the biological product "Fitosporin M";
- 3 – Flowering phase, treated with a biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
- 4 – Flowering phase, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
- 5 – Fruiting phase, control without treatment;
- 6 – Fruiting phase, control treated with the biological product "Fitosporin M";
- 7 – Fruiting phase, treated with biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
- 8 – Leaves. Fruiting phase, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
- 9 – Root crop., technical ripeness, control without treatment;
- 10 – technical ripeness, control treated with the biological product "Fitosporin M";
- 11 – technical ripeness, treated with a biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
- 12 – technical ripeness, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
- K+ – control with the presence of the pathogen

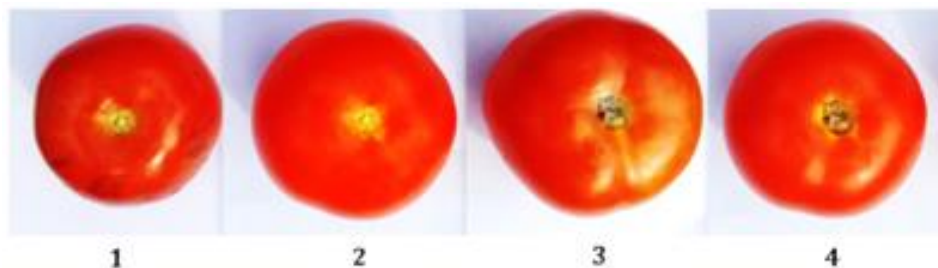


Рис. 5. Влияние биологического препарата на развитие бактериальной пятнистости на томате сорта Санька: 1 – контроль; 2 – Фитоспорин М; 3 – препарат 1 (обработка + опрыскивание); 4 – препарат 1 (опрыскивание)

Fig. 5. Influence of a biological drug on the development of bacterial blotch on tomato variety "Sanka": 1 – control; 2 – Fitosporin M; 3 – Preparation 1 (treatment + spraying); 4 – Preparation 1 (spraying)

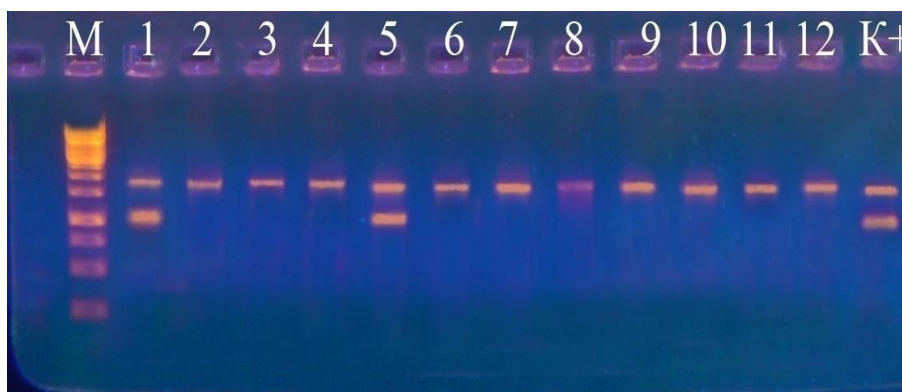


Рис. 6. Электрофореграмма продуктов амплификации на наличие возбудителя черной бактериальной пятнистости в томатах сорта Санька на различных стадиях развития растения:

- 1 – фаза цветения, контроль без обработки;
- 2 – фаза цветения, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
- 3 – фаза цветения, обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
- 4 – фаза цветения, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
- 5 – фаза плодоношения, контроль без обработки;
- 6 – фаза плодоношения, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
- 7 – фаза плодоношения, обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
- 8 – фаза плодоношения, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
- 9 – плоды, техническая спелость, контроль без обработки;
- 10 – плоды, техническая спелость, контроль обработан биопрепаратом Фитоспорин М;
- 11 – плоды, техническая спелость, контроль обработан биологическим пестицидом (обработка семян и двукратное опрыскивание);
- 12 – плоды, техническая спелость, обработан биологическим пестицидом (двукратное опрыскивание);
- K+ – контроль с присутствием возбудителя

Fig. 6. Electrophoregram of amplification products for the presence of the pathogen tomato variety "Sanka" at different stages of development:

- 1 – Leaves. Flowering phase, control without treatment;
- 2 – Flowering phase, control treated with the biological product "Fitosporin M";
- 3 – Flowering phase, treated with a biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
- 4 – Flowering phase, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
- 5 – Fruiting phase, control without treatment;
- 6 – Fruiting phase, control treated with the biological product "Fitosporin M";
- 7 – Fruiting phase, treated with biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
- 8 – Leaves. Fruiting phase, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
- 9 – Root crop., technical ripeness, control without processing;
- 10 – technical ripeness, control treated with the biological product "Fitosporin M";
- 11 – technical ripeness, treated with a biological pesticide (seed treatment and 2-fold spraying);
- 12 – technical ripeness, treated with a biological pesticide (2-fold spraying);
- K+ – control with the presence of the pathogen

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что препарат 1 проявил фунгицидное действие в отношении возбудителей та-

ких болезней томатов и огурцов, как черная бактериальная пятнистость и аскохитоз соответственно.

Методом ПЦР-анализа признаки кольцевой

гнили на картофеле не выявлены, а препарат 2 оказал фунгицидное действие на развитие фитофторы.

Отмечено эффективное действие названных препаратов в случае предпосевного замачивания семян и дальнейшей двукратной обработки растений в период цветения, при этом рекомендуемая концентрация растворов – $10^{-4}\%$.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Будынков Н.И. Защита растений в теплицах (размышления после очередного семинара по данной проблеме) // Теплицы России. 2009. N 3: С. 29–32.
2. Енгальчева И.А., Пышная О.Н., Тимина Л.С., Вершинина Н.П., Золотарева О.И. Идентификация вирусных болезней овощных культур в условиях московской области // Селекция и семеноводство овощных культур. 2014. N 45. С. 257–264.
3. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. N 4-2. С. 1044–1054.
4. Матвеева Т.В., Павлова О.А., Богомаз Д.И., Демкович Л.А., Лутова А.Е. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений // Экологическая генетика. 2011. Т. 9. N 1. С. 32–43. <https://doi.org/10.17816/ecogen9132-43>
5. Lievens B., Thomma B.P. Recent developments in pathogen detection arrays: Implications for fungal plant pathogens and use in practice // Phytopathology. 2005. Vol. 95. Issue 12. P. 1374–1380. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1374>
6. 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 // Annual Review of Phytopathology. 2003. Vol. 41. P. 305–324. <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095435>
7. Нугманова Т.А. Биопрепараты в овощеводстве и картофелеводстве // Картофель и овощи. 2017. N 6. С. 2–4.
8. Перфильева А.И., Граскова И.А., Рихванов Е.Г. Возбудитель кольцевой гнили картофеля – *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* // Агрохимия. 2013. N 12. С. 34–44.
9. Павловская Н.Е., Гагарина И.Н. Экологические технологии выращивания зеленого лука в условиях защищенного грунта // Вестник ОрелГАУ. 2016. N 2 (59). С. 45–48. <https://doi.org/10.15217/issn1990-3618.2016.2.45>
10. Нековаль С.Н., Маскаленко О.А., Чурикова А.К. Биологическая защита томата от бурой пятнистости (возбудитель *Cladosporium fulvum*

Ранняя диагностика заболеваний овощных культур методами, основанными на полимеразной цепной реакции, позволяет обнаруживать следовые количества патогенных микроорганизмов в максимально сжатые сроки и осуществлять выбор наиболее эффективных фунгицидных препаратов.

Cooke) в защищенном грунте // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т. 32. N 8. С. 25–27. <https://doi.org/10.24411/0235-2451-2018-10806>

11. Фролова С.А. Применение биологического пестицида в технологии выращивания томата закрытого грунта // Вестник аграрной науки. 2018. N 2 (71). С. 130–136. <https://doi.org/10.15217/issn2587-666X.2018.2.130>

12. Кажарский В.И., Прищепа И.А. Эффективность совместного применения поверхностно-активных веществ (ПАВ) с инсектицидами на культуре огурца защищенного грунта // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. 2014. N 2. С. 99–105.

13. Доброхотов С.А., Анисимов А.И., Беякова Н.А., Максимова Л.Г., Орлова Г.О. На пути к экологическому земледелию // Защита и карантин растений. 2011. N 12. С. 19–22.

14. Ахатов А.К. Огурцы и томаты в теплицах // Прилож. к журн. «Защита и карантин растений». 2011. N 2. Р. 69–114.

15. Георгиева О. Влияние органических удобрений и биологических средств защиты растений на поражение томата болезнями в защищенном грунте // Гавриш. 2013. N 6. С. 20–23.

16. Пигорев И.Я., Долгополова Н.В. Биологическая защита огурца (*Cucumis sativus* L.) при технологии выращивания в защищенном грунте // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2018. N 3. С. 49–56.

17. Пат. № 2626174, Российская Федерация. Средство для предпосевной обработки семян овощных культур в условиях защищенного грунта / Н.Е. Павловская, И.Н. Гагарина, Д.Б. Бородин, И.Ю. Солохина, И.А. Гнеушева, Е.В. Костромичева [и др.]; патентообладатель ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет»; заявл. 09.02.2016; опубл. 21.07.2017.

18. Пат. № 2463759, Российская Федерация. Средство для предпосевной обработки семян гороха / Н.Е. Павловская, И.В. Горькова, И.Н. Гагарина, Д.Б. Бородин, Г.А. Борзенкова; патентообладатель ФГБОУ ВО «Орловский государственный аграрный университет»; заявл. 03.05.2011; опубл. 20.10.2012.

REFERENCES

1. Budynkov NI. Plant protection in greenhouses (reflections after the next seminar on this issue). *Teplitsy Rossii*. 2009;3:29–32. (In Russian)
2. Yengalicheva IA, Pishnaya ON, Timina LT, Vershinina NP, Zolotareva OI. Identification of virus diseases of vegetable crops in Moscow region. Se-

lektsiya i semenovodstvo ovoshchnykh kul'tur. 2014;45:257–264. (In Russian)

3. Khlestkina EK. Molecular markers in genetic studies and in breeding. *Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2013;17(4-2):1044–1054. (In Russian)

4. Matveeva TV, Pavlova OA, Bogomaz DI, Demkovich LA, Lutova AE. Molecular markers for the species identification and phylogenetics of plants. *Ekologicheskaya genetika* = *Ecological Genetics*. 2011;9(1):32–43. (In Russian) <https://doi.org/10.17816/ecogen9132-43>

5. Lievens B, Thomma BP. Recent developments in pathogen detection arrays: Implications for fungal plant pathogens and use in practice. *Phytopathology*. 2005;95(12):1374–1380. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1374>

6. Schaad NW, Frederick RD, Shaw J, Schneider WL, Hickson R, Petrillo MD, et al. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. *Annual Review of Phytopathology*. 2003;41:305–324. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095435>

7. Nugmanova TA. Biopreparations in vegetable and potato growing. *Kartofel' i ovoshchi* = *Potato and Vegetables*. 2017;6:2–4. (In Russian)

8. Perfileva AI, Graskova IA, Rikhvanov EG. The causative agent of annular potato rot – *Slavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*. *Agrokimiya* = *Agrochemistry*. 2013;12:34–44. (In Russian)

9. Pavlovskaya NE, Gagarina IN. Ecological cultivation technology of green onions in greenhouse. *Vestnik Orlovskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* = *Vestnik OrelGAU*. 2016;2:45–48. (In Russian)

10. Nekoal SN, Maskalenko OA, Churikova AK. Biological protection of tomato against leaf mold (*Cladosporium fulvum* Cooke) in sheltered ground. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK* = *Advances in Science and Technology of Agroindustrial Complex*. 2018;32(8):25–27. (In Russian) <https://doi.org/10.24>

411/0235-2451-2018-10806

11. Frolova SA. Application of biological pesticide in technology for growing tomato under cover. *Vestnik agrarnoi nauki* = *Bulletin of agrarian science*. 2018;2:130–136. (In Russian) <https://doi.org/10.15217/issn2587-666X.2018.2.130>

12. Kazharskii VI, Prishchepa IA. The effectiveness of simultaneous use of surfactants and insecticides on the culture of protected ground cucumber. *Vestnik Belorusskoi gosudarstvennoi sel'skohozyaistvennoi akademii* = *Bulletin of the Belarusian State Agricultural Academy*. 2014;2:99–105. (In Russian)

13. Dobrokhotov SA, Anisimov AI, Belyakova NA, Maksimova LG, Orlova GO. On the way to ecological agriculture. *Zashchita i karantin rastenii* = *Plant protection and quarantine*. 2011;12:19–22. (In Russian)

14. Akhatov AK. Cucumbers and tomatoes in greenhouses. Supplement to the journal *Zashchita i karantin rastenii* = *Plant protection and quarantine*. 2011;2:69–114. (In Russian)

15. Georgieva O. Effect of organic fertilizers and biological plant protection products on the development of tomato diseases in greenhouses. *Gavrish*. 2013;6:20–23. (In Russian)

16. Pigorev IYa, Dolgoplova NV. Biological protection of cucumber (*Cucumis sativus* L.) with technology growing in greenhouses. *Vestnik Kurskoi gosudarstvennoi sel'skohozyaistvennoi akademii* = *Bulletin of the Kursk State Agricultural Academy*. 2018;3:49–56. (In Russian)

17. Pavlovskaya NE, Gagarina IN, Borodin DB, Solokhina IYu, Gneusheva IA, Kostromicheva EV, et al. Agent for pre-sowing treatment of vegetable crop seeds in protected soil conditions. Patent RF, no. 2626174; 2016. (In Russian)

18. Pavlovskaya NE, Gor'kova IV, Gagarina IN, Borodin DB, Borzenkova GA. Means for pre-sowing treatment of pea seeds. Patent RF, no. 2463759; 2011. (In Russian)

Критерии авторства

Павловская Н.Е., Гагарина И.Н., Гаврилова А.Ю., Бородин Д.Б. выполнили экспериментальную работу. Авторы совместно обобщили результаты, написали рукопись, имеют на статью равные авторские права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Contribution

Ninel E. Pavlovskaya, Irina N. Gagarina, Anna Yu. Gavrilova, Dmitry B. Borodin carried out the experimental work. The authors on the basis of the results summarized the material and wrote the manuscript. All authors have equal author's rights and bear equal responsibility for plagiarism.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding the publication of this article.

The final manuscript has been read and approved by all the co-authors.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Павловская Нинэль Ефимовна,
д.б.н., профессор,
заведующая кафедрой биотехнологии,
Орловский государственный аграрный
университет им. Н.В. Парахина,
302019, г. Орел, ул. Генерала Родина, 69,
Российская Федерация,
e-mail: ninel.pavlovskaya@yandex.ru

Гагарина Ирина Николаевна,
к.с.-х.н., доцент, руководитель ЦКП
«Орловский региональный центр
сельскохозяйственной биотехнологии»,
Орловский государственный аграрный
университет им. Н.В. Парахина,
302019 г. Орел, ул. Генерала Родина, 69,
Российская Федерация,
✉ e-mail: i-gagarina@list.ru

Гаврилова Анна Юрьевна,
к.б.н., доцент кафедры биотехнологии,
Орловский государственный аграрный
университет им. Н.В. Парахина,
302019 г. Орел, ул. Генерала Родина, 69,
Российская Федерация,
e-mail: anechkag@bk.ru

Бородин Дмитрий Борисович,
к.с.-х.н., доцент, руководитель ЦКП
«Биотехнологии микрклонального
размножения картофеля»,
Орловский государственный аграрный
университет им. Н.В. Парахина,
302019 г. Орел, ул. Генерала Родина, 69,
Российская Федерация,
e-mail: bioogau@mail.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ninel E. Pavlovskaya,
Dr. Sci. (Biology), Professor,
Head of the Department of Biotechnology,
Orel State Agrarian University
named after N.V. Parakhin,
69, General Rodin St., Orel, 302019,
Russian Federation,
e-mail: ninel.pavlovskaya@yandex.ru

Irina N. Gagarina,
Cand. Sci. (Agriculture), Associate Professor,
Head of the Orel Regional Center of Agricultural
Biotechnology,
Orel State Agrarian University
named after N.V. Parakhin,
69, General Rodin St., Orel, 302019,
Russian Federation,
✉ e-mail: i-gagarina@list.ru

Anna Yu. Gavrilova,
Cand. Sci. (Biology), Associate Professor,
Department of biotechnology,
Orel State Agrarian University
named after N.V. Parakhin,
69, General Rodin St., Orel, 302019,
Russian Federation,
e-mail: anechkag@bk.ru

Dmitry B. Borodin,
Cand. Sci. (Agriculture), Associate Professor,
Head of the Central Research Center
"Biotechnology of Microclonal Reproduction
of Potatoes»,
Orel State Agrarian University
named after N.V. Parakhin,
69, General Rodin St., Orel, 302019,
Russian Federation,
e-mail: bioogau@mail.ru