

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ФИТОПАТОГЕНОВ РОДА *Pythium*

А. В. Мищенко

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова»

Поступила в редакцию 9.08.2017 г.

**Аннотация.** В статье описывается метод полимеразной цепной реакции для диагностики фитопатогенов рода *Pythium*. В ходе работы по созданию тест-системы оптимизирован протокол экстракции ДНК, подобраны праймеры, состав ПЦР-смеси и температурный режим реакции. ДНК экстрагировалась из образцов искусственного грунта, использованного для выращивания отобранных тепличных растений (томаты, огурцы); а также из вегетативных тканей, заражённых мицелием *Pythium*. Литический раствор для выделения ДНК: 100 мМ Tris-HCl pH 8.0, 1.4 М NaCl, 20 мМ EDTA, 1% PVP (поливинилпирролидон); 1% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 2-меркаптоэтанол, СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид). После лизиса, пробы экстрагировались равным объемом фенола и хлороформа. Для проведения реакции амплификации был подобран оптимальный состав ПЦР-смеси: буфер – 1х; dNTP – 250 мкМ; праймер 1 – 0,5 мкМ; праймер 2 – 0,5 мкМ; taq-полимераза – 5 единиц активности; матрица – 10 % от объема ПЦР-смеси. Также подобран температурный режим амплификации: I этап – 95°C, 2 мин. (денатурация ДНК), II этап – 95°C, 40 с (денатурация ДНК), III этап – 60°C, 30 с (отжиг праймеров), IV этап – 72°C, 40 с (элонгация), (повторение циклов 2-4 – 35 раз), V этап – 72°C, 2 мин (финальная элонгация). Для каждого молекулярного маркера была подобрана пара праймеров: ITS\_F3 (прямой): TACGTAATGCGAATTGCAGAA и ITS\_R2 (обратный): AGTCTTGTCTGATATCAGGTCCA; COI\_F1 (прямой): GGTAATTTATATTTAATTTTTGGTGCTTTTTC и COI\_R2 (обратный): CCAATGAAAACAGGCATAACCAT. В результате проведённых исследований была создана ПЦР тест-система, состоящая из двух пар праймеров для двух генетических маркеров (COI и ITS), позволяющая по длине ампликонов выявить наличие или отсутствие представителей рода *Pythium* в пробах. Система может быть успешно применена в практике сельскохозяйственных организаций для раннего выявления патогенов в тканях растений, в пробах воды, почвы и искусственного грунта. Использование двух пар высокоспецифичных праймеров для разных молекулярных маркеров увеличивает достоверность результатов диагностики.

**Ключевые слова:** полимеразная цепная реакция (ПЦР), фитопатогены, *Pythium*.

Работа посвящена созданию тест-системы для выявления фитопатогенов грибковой природы рода питиум (*Pythium* Pringsheim, 1858). Таксон включает виды, вызывающие ряд заболеваний (корневая гниль сеянцев и взрослых растений, питиоз, выпревание сеянцев, черная ножка) многих сортов культурных растений [1]. Виды рода *Pythium* широко распространены на всех континентах земного шара. Многие представители причиняют большой вред сельскому, лесному хозяйствам и цветоводству, вызывая полегание и гибель растений в природе, парниках, теплицах и оранжереях, а также гниль сеянцев хвойных и лиственных пород в питомниках [2]. Некоторые представители этого рода наносят большой экономический урон сельскому хозяйству, вызывая раз-

личные заболевания более чем 80 видам высших растений (в т.ч. злаковым культурам, тыквенным, пасленовым, яблоням, грушам и др.).

Фитопатогены грозят большими потерями лесному и сельскому хозяйствам. Ежегодно от возбудителей болезней растениеводство теряет около 39,4 млн. т продукции, поэтому идентификация и диагностика так важны для сельского хозяйства. Постоянный и четкий контроль над фитосанитарным состоянием окружающей среды и сельскохозяйственных растений обеспечивает продовольственную и биологическую безопасность урожая [3, 4].

Традиционные методы диагностики заболеваний растений заключаются в диагностике по симптомам, морфологии фитопатогена, с помощью цито-гистологического анализа. Определение заболевания вышеописанными способами требует

выполнения ряда условий, например, наличия явной симптоматики заболевания. Отсутствие признаков на ранних стадиях развития инфекции на проростках, делает невозможным выявление зараженных растений до начала плодоношения, что значительно сокращает урожайность тепличных хозяйств. Определение болезни затрудняет большое число анализируемого материала и быстрое появление новых штаммов и рас [5, 6]. Методы диагностики фитопатогенов, называемые традиционными, очень трудоемки, не всегда эффективны и часто дают некорректные результаты; отсюда вытекает необходимость в создании более эффективных и менее трудоемких методов диагностики. Одним из таковых является полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод, основанный на обнаружении в исследуемых образцах ДНК возбудителя, что позволяет при отсутствии симптоматики диагностировать пораженные растения, провести ряд превентивных мер и выявить пути заражения [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13]. Несмотря на практическую значимость изучения питиоза и способов его ранней диагностики, к настоящему времени нет апробированной и достоверной ПЦР-тест-системы по его выявлению.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве материала для экстракции ДНК использовались образцы искусственного грунта, использованного для выращивания отобранных тепличных растений (томаты, огурцы); а также вегетативные ткани, зараженные мицелием *Pythium*. Материал гомогенизировался в буфере для экстракции ДНК (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20mM EDTA, 1% PVP (поливинилпирролидон); 1% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) с добавлением 2-меркаптоэтанола и СТАВ (цетилтриметиламмоний бромид). После лизиса, пробы экстрагировались равным объемом фенола и хлороформа.

Для подбора праймеров использовались по три-четыре последовательности ДНК каждого вида *Pythium*, которые были взяты в базах данных GenBank [14]. Для подбора родоспецифичных праймеров анализировались последовательности нуклеотидов внешней группы: род фитопфтора (*Phytophthora*) и фузариум (*Fusarium*). Анализ фрагментов проводился в программе MEGA 6, выравнивание – с помощью программы Muscle; затем находились уникальные участки длиной 20-35 нуклеотидов, максимально совпадающие с представителями рода питиум, и отличающиеся от внешней группы на 60-70%. Подобранные та-

ким образом праймеры проверялись с помощью ресурса Integrated DNA Technologies [15] (температура плавления, анализ возможностей образования «шпилек» и праймер-димеров).

Для проведения реакции амплификации был подобран оптимальный состав ПЦР-смеси: буфер – 1x; dNTP – 250 мкМ; праймер 1 – 0,5 мкМ; праймер 2 – 0,5 мкМ; taq-полимераза – 5 единиц активности; матрица – 10 % от объема ПЦР-смеси. Также подобран температурный режим амплификации: I этап – 95°C, 2 мин. (денатурация ДНК), II этап – 95°C, 40 с (денатурация ДНК), III этап – 60°C, 30 с (отжиг праймеров), IV этап – 72°C, 40 с (элонгация), (повторение циклов 2-4 – 35 раз), V этап – 72°C, 2 мин (финальная элонгация).

Результаты ПЦР оценивали при помощи электрофоретического разделения нуклеиновых кислот в 1% агарозном геле.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для анализа были взяты виды питиума, паразитирующие на важных сельскохозяйственных культурах (томаты, огурцы и пр.). Для создания тест-системы использовались два молекулярных маркера. Первый – фрагмент, кодирующий первую субъединицу цитохром-с-оксидазы (COI); второй – транскрибируемый не кодирующий спейсер ядерной ДНК (ITS), который находится между генами, кодирующими субъединицы рибосом. Широкое использование данных маркеров обуславливает их изученность и надежность [16]. Маркеры COI и ITS являются достаточно вариабельными для выявления межродовых различий, что позволяет использовать их для создания тест-системы, однако следует отметить, что маркер ITS характеризуется сильным внутривидовым полиморфизмом [17]. Для каждого молекулярного маркера была подобрана пара праймеров:

ITS\_F3 (прямой):

5'TACGTAATGCGAATTGCAGAA 3'

ITS\_R2 (обратный):

5' AGTCTTGTCTGATATCAGGTCCA 3'

COI\_F1 (прямой):

5'GGTACTTTATATTTAAATTTTGGTGCTTTTTC 3'

COI\_R2 (обратный):

5'CCAATTAAAACAGGCATAACCAT 3'

Сводные данные (длина, температура плавления, направление праймеров, длина ампликона) по представленным праймерам занесены в таблицу.

Для верификации специфичности сконструированных праймеров, их пары по каждому маркеру были протестированы с помощью ресурса

Таблица 1.

Параметры праймеров для молекулярных маркеров COI и ITS тест-системы для обнаружения патогенов рода *Pythium*

| Название | Кол-во нуклеотидов | Температура плавления | Направление | Длина ампликона |
|----------|--------------------|-----------------------|-------------|-----------------|
| ITS F3   | 21                 | 65.1°C                | прямой      | 600 нуклеотидов |
| ITS R2D  | 23                 | 66.6°C                | обратный    |                 |
| COI F1D  | 32                 | 66.1°C                | прямой      | 187 нуклеотидов |
| COI R2D  | 23                 | 64.5°C                | обратный    |                 |

BLAST [18] на наличие похожих нуклеотидных последовательностей у других организмов. На рисунках 1-4 представлены схемы отжига подобранных пар праймеров на представителях рода *Pythium* и на видах, в которых опцией BLAST были найдены похожие нуклеотидные последовательности с указанием не комплементарных участков и длин ампликонов.

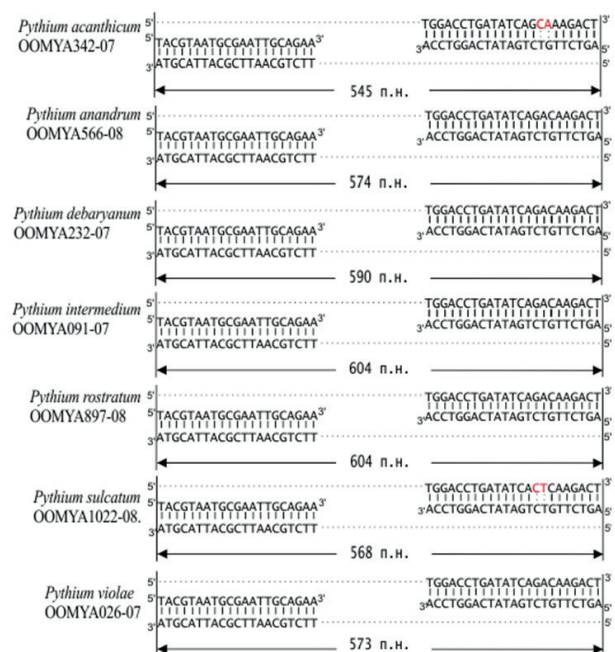


Рис. 1. Анализ специфичности праймеров (ITS\_F3 и ITS\_R2) молекулярного маркера ITS для представителей рода *Pythium* (некомплементарные участки выделены прерывистой линией)

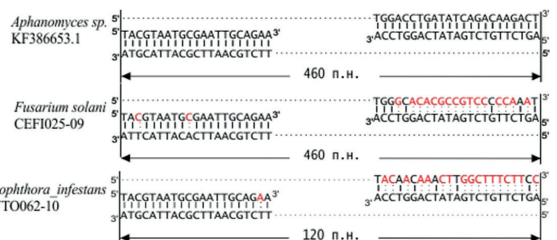


Рис. 2. Анализ специфичности праймеров (ITS\_F3 и ITS\_R2) молекулярного маркера ITS для организмов с похожими последовательностями (некомплементарные участки выделены прерывистой линией)

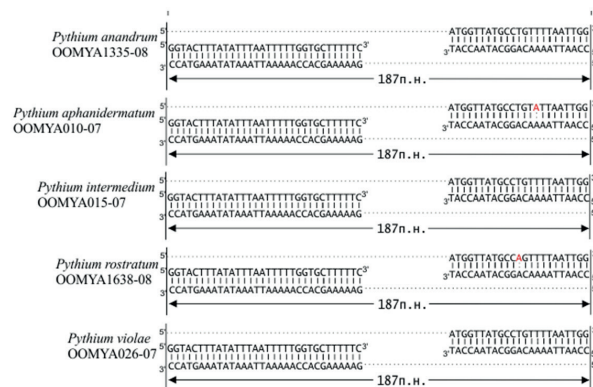


Рис. 3. Анализ специфичности праймеров (COI\_F1 и COI\_R2) молекулярного маркера COI для представителей рода *Pythium* (некомплементарные участки выделены прерывистой линией)

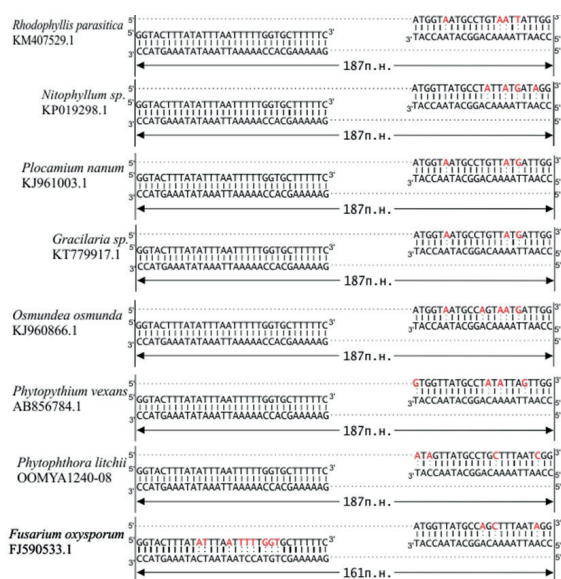


Рис. 4. Анализ специфичности праймеров молекулярного маркера COI (COI\_F1 и COI\_R2) для организмов с похожими последовательностями (некомплементарные участки выделены прерывистой линией)

Как следует из рисунков 1-4, подобранные праймеры специфичны для рода питиум, и данные пары олигонуклеотидов могут использоваться для создания тест-системы. Таким образом, при проведении реакции по двум маркерам, мож-

но по длине ампликонов определить специфичность проведенной реакции; одновременное наличие, при детекции результатов ПЦР методом горизонтального гель-электрофореза, двух полос (для COI – длиной 187 пар нуклеотидов и для ITS – длиной около 600 пар нуклеотидов) является показателем наличия в пробе представителя рода *Pythium*.

Для апробации праймеров было взято 10 проб, с каждой из которых была поставлена ПЦР на оба молекулярных маркера с градиентом температур отжига праймеров от 54,3°C до 61,9°C. При электрофорезе обнаруживается большое количество фрагментов искомой длины в реакции на COI и ITS в пробах 2, 3, 8 и 10 (рисунок 5), что говорит

об эффективности подобранных праймеров и параметров ПЦР.

При максимальных температурах в этой реакции по маркеру COI наблюдается почти полное отсутствие неспецифичных фрагментов, а по ITS неспецифичные продукты амплификации присутствуют при всех взятых в этой реакции температурах. Протокол ПЦР по маркеру ITS был оптимизирован с целью уменьшения количества неспецифичных продуктов. Для этого были выбраны две пробы (№ 2 и 8) и проведена градиентная ПЦР с температурами отжига праймеров от 57,1°C до 63,7°C. При электрофоретической детекции результатов прослеживается тенденция к уменьшению неспецифичных фрагментов с увеличением

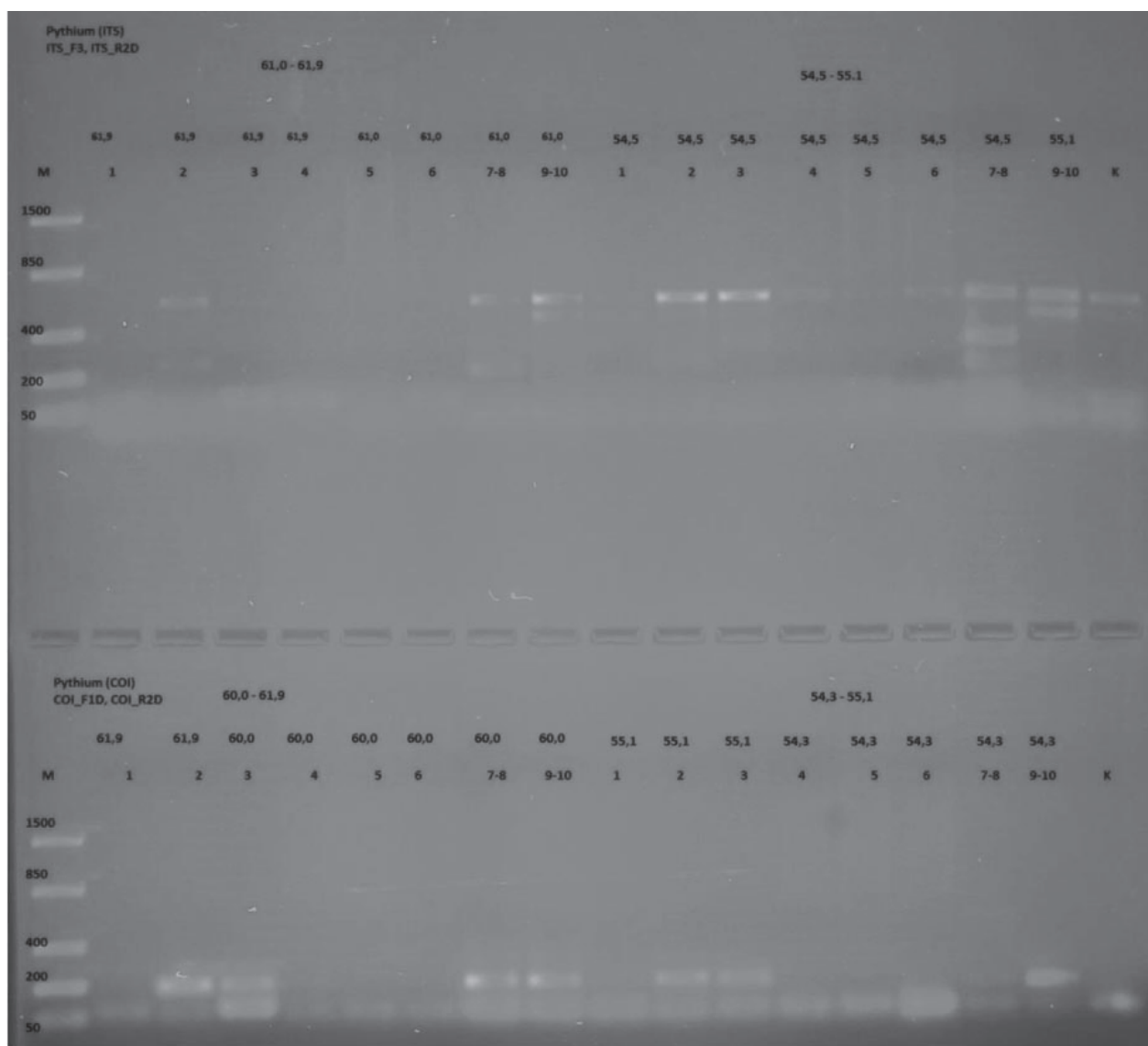


Рис 5. Результаты электрофоретического разделения фрагментов COI и ITS *Pythium* после ПЦР с подобранными праймерами. Цифры под лунками соответствуют номерам взятых проб и температурам проведения реакции. Обозначения: М – маркер длин фрагментов; К – отрицательный контроль

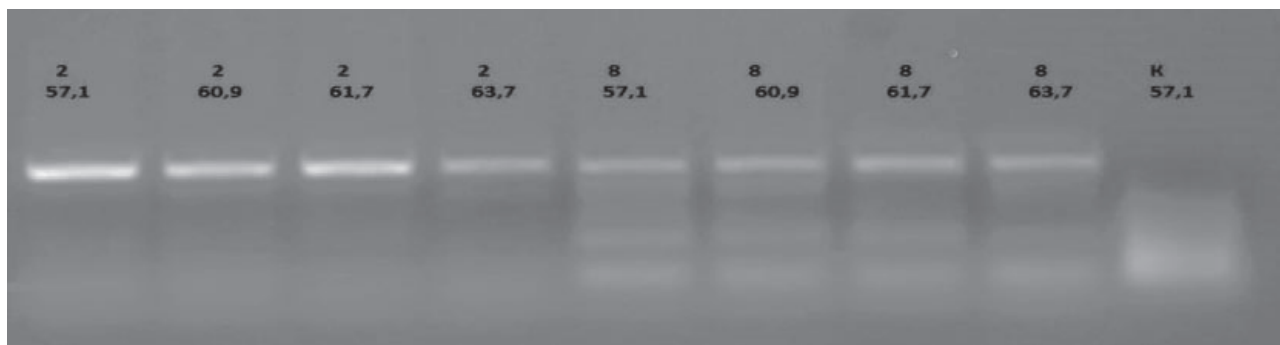


Рис. 6. Результаты электрофоретического разделения фрагментов COI и ITS проб *Pythium* № 2 и 8 после ПЦР с подобранными праймерами. Цифры над лунками соответствуют номерам взятых проб и температурам проведения реакции. Обозначения: К – отрицательный контроль.

температуры (рисунок 6). Таким образом, оптимальной температурой отжига праймеров для работы данной тест-системы по макеру ITS является значение 63,7°C, а по региону COI – 60°C.

Несмотря на практическую значимость изучения питиума и способов его ранней диагностики, к настоящему времени нет апробированной и достоверной ПЦР-системы по его выявлению. Известные работы носят лишь поверхностный характер. Так, Ванг П. с соавторами [19] предлагает тест-системы из 20 прямых праймеров, которые в паре с универсальным обратным праймером ITS2 (либо ITS4) позволяют идентифицировать 36 видов грибов рода *Pythium*. Также в статье указывается, что специфичность реакции повышается с увеличением температуры отжига праймеров и уменьшением времени этого этапа реакции. Созданная коллективом тест-система позволила выявить наличие представителей этого рода фитопатогенов в пробах почвы и тканях моркови. Среди этих видов можно выделить *Pythium intermedium* и *P. violae*, которые наносят значительный ущерб урожаю моркови в Норвегии. Анализ фотографий гель-электрофореза показал малое количество неспецифичных фрагментов. Однако авторы отмечают низкую чувствительность своей тест-системы и связывают это с большим количеством копий маркера ITS в геноме [19].

В результате проведенных исследований была создана ПЦР тест-система, состоящая из двух пар праймеров для двух генетических маркеров (COI и ITS), позволяющая по длине ампликонов выявить наличие или отсутствие представителей рода *Pythium* в пробах. Система может быть успешно применена в практике сельскохозяйственных организаций для раннего выявления патогенов в тканях растений, в пробах воды, почвы и искусственного грунта. Использование двух пар высокоспецифичных праймеров для разных моле-

кулярных маркеров увеличивает достоверность результатов диагностики. Однако при проведении ПЦР необходимо учитывать, что о наличии питиума в пробах можно утверждать только при положительных реакциях по обоим маркерам. Диагностика фитопатогенов методом полимеразной цепной реакции поднимет борьбу с ними на новый уровень, что в дальнейшем позволит не только бороться с заболеваниями растений, но и контролировать качество посевного материала [20].

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Ульяновской области в рамках научного проекта № 16-44-732017 "Разработка методов молекулярно-генетического скрининга жизнеспособности и наличия патогенов в клеточных культурах и коллекционных образцах редких и эндемичных видов растений Ульяновской области".*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gonzalez-Perez E., Yanez-Morales M., Santiago-Santiago V., MonteroPineda A. Fungi biodiversity on pepper wilt and some related factors in Tlacotepec de Jose Manzo // *Agrociencia*. 2004. Vol. 38. №6, pp. 653–661.
2. Etebarian H.R. Diseases of Vegetable and Summer Crop and the Methods of Control. 1st ed., Tehran University Publication. 2002. 600 p.
3. Atkins D.S., Clark I.M. Fungal diagnostics: a mini review // *Journal of Applied Genetics*. 2004. Vol. 45, pp. 3–15.
4. Borman A.M., Linton C.J., Miles S.-J., Johnson E.M. Molecular identification of pathogenic fungi // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008. Vol. 61, pp. 17–112.
5. Klemsdal S.S., Herrero M.L., Wanner L.A., Lund G., Hermansen A. PCR-based identification of *Pythium* spp. causing spot in carrots and sensitive detection in soil samples // *Plant Pathology*. 2008. Vol. 57, pp. 877–886.

6. Kozubikova-Balcarova E., Koukol O., Martin M.P., Svoboda J., Petrusek A., Dieguez-Urbeondo J. The diversity of oomycetes on crayfish: Morphological vs. molecular identification of cultures obtained while isolating the crayfish plague pathogen // *Fungal Biology*. 2013. Vol. 117. № 10, pp. 682–691.
7. Li M., Senda M., Komatsu T., Suga H., Kageyama K. Development of realtime PCR technique for the estimation of population density of *Pythium* intermedium in forest soils // *Microbiological Research*. 2010. Vol. 165, pp. 695–705.
8. Lopez M.M., Bertolini E., Olmos A., Caruso P., Gorris M.T., Llop P., Penyalver R., Cambra M. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria // *International Microbiology*. 2003. Vol. 6, pp. 233–243.
9. Lopez M.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? // *Current Issues in Molecular Biology*. 2009. Vol. 11, pp. 13–46.
10. McCartney H.A., Foster S.J., Fraaije B.A., Ward E. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens // *Pest Management Science*. 2003. Vol. 59, pp. 129–142.
11. Molitor C., Inthavong B., Sage L., Geremia R.A., Mouhamadou B. Potentiality of the *cox1* gene in the taxonomic resolution of soil fungi // *FEMS Microbiology Letters*. 2009. Vol. 302. №1, pp. 76–84.
12. Robideau G.P., De Cock A.W., Coffey M.D., Voglmayr H., Brouwer H. et al. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer // *Molecular Ecology Resources*. 2011. Vol. 11, pp. 1002–1011.
13. Martin R.R. Past and future of immunological assays for the detection of plant pathogens // *Journal of Plant Pathology*. 2008. Vol. 90, P. 380.
14. GenBank. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> (дата обращения: 02.08.2017).
15. Integrated DNA Technologies. Режим доступа: <https://eu.idtdna.com/site> (дата обращения: 02.08.2017).
16. Alaei H., Rostami F. Identification of cucumber damping-off based on morphological and molecular characterizations in Rafsanjan // *Journal of Plant Pathology*. 2013. Vol. 48, №4. pp. 177–182.
17. Gomes E.A., Kasuya M.C.M., de Barros E.G., Borges A.C., Araujo E.F. Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi // *Genetics and Molecular Biology*. 2002. Vol. 25, №4. pp. 477–483.
18. BLAST. Режим доступа: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> (дата обращения: 02.08.2017).
19. Wang P.H., Wang Y.T., White J.G. Species-specific PCR primers for *Pythium* developed from ribosomal ITS1 region // *Letters in Applied Microbiology*. 2003. Vol. 37, №2. pp. 127–132.
20. Tambong J.T., de Cock A.W., Tinker N.A., Lévesque C.A. Oligonucleotide array for identification and detection of *Pythium* species // *Applied and Environmental Microbiology*. 2006. Vol. 72, № 4. pp. 2691–2706.

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И.Н. Ульянова»

Мищенко А. В., доцент кафедры географии и экологии

Тел.: +7 960 3675091

E-mail: [a.misch@mail.ru](mailto:a.misch@mail.ru)

Ulyanovsk State Pedagogical University  
Mishchenko A. V., assistant professor of  
Geography and Ecology Department  
Ph.: +7 960 3675091  
E-mail: [a.misch@mail.ru](mailto:a.misch@mail.ru)

## MOLECULAR-GENETIC METHODS OF DIAGNOSTICS OF PHYTOPATHOGENS OF THE GENUS *PYTHIUM*

A. V. Mishchenko

Ulyanovsk State Pedagogical University

**Abstract.** The article describes the method of polymerase chain reaction for the diagnosis of phytopathogens of the genus *Pythium*. During the work on creating the test system, the DNA extraction protocol was optimized, the primers, the PCR mixture composition and the reaction temperature were selected. DNA was extracted using phenol-chloroform. Samples were homogenized with plastic pestles in 1.5-mL Eppen-

dorf-type tubes and incubated in a lytic solution (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 1% PVP; 1% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 2-mercaptoethanol, CTAB (cetyltrimethylammonium-bromide). PCR protocol. Primers used were designed from the COI и ITS regions - ITS\_F3 (forward): TACGTAATGCGAATTGCAGAA and ITS\_R2 (reverse): AGTCTTGTCTGATATCAGGTCCA; COI\_F1 (forward): GGTACTTTATATTTA-ATTTTGGTGCTTTTTC and COI\_R2 (reverse): CCAATTAAAACAGGCATAACCAT. Reactions were performed in a volume of 20 µl containing: 10 mM PCR buffer 1X, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM each dNTPs, 0.5 µM each primer, 5 U Taq DNA Polymerase, 3 µl extracted DNA. After 2 min denaturation at 95°C, the profile of amplification cycle was: 95°C × 40 sec, 60°C × 30 sec, 72°C × 40 sec, performed 35 times, and a final extension step at 72°C × 2 min. The PCRs were done using a SpeedCycler 2 (Analytik Jena). As a result of the studies, a PCR test system was created consisting of two pairs of primers for two genetic markers (COI and ITS), which allows to determine the presence or absence of representatives of the genus *Pythium* in the samples along the length of the amplicons. The system can be successfully applied in the practice of agricultural organizations, in water, soil and artificial soil samples. The use of two pairs of highly specific primers for different molecular markers increases the reliability of diagnostic results.

**Keywords:** polymerase chain reaction (PCR), phytopathogens, *Pythium*.

## REFERENCES

1. Gonzalez-Perez E., Yanez-Morales M., Santiago-Santiago V., Montero Pineda A. Fungi biodiversity on pepper wilt and some related factors in Tlacotepec de Jose Manzo // *Agrociencia*, 2004, Vol. 38, №6, pp. 653–661.
2. Etebarian H.R. Diseases of Vegetable and Summer Crop and the Methods of Control. 1st ed., Tehran University Publication, 2002, 600 p. DOI: 10.1146/annurev.py.05.090167.002135.
3. Atkins D.S., Clark I.M. Fungal diagnostics: a mini review // *Journal of Applied Genetics*, 2004, Vol. 45, pp. 3–15. PMID: 14960763.
4. Borman A.M., Linton C.J., Miles S.-J., Johnson E.M. Molecular identification of pathogenic fungi // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, Vol. 61, pp. 17–112. DOI: 10.1093/jac/dkm425.
5. Klemsdal S.S., Herrero M.L., Wanner L.A., Lund G., Hermansen A. PCR-based identification of *Pythium* spp. causing spot in carrots and sensitive detection in soil samples // *Plant Pathology*, 2008, Vol. 57, pp. 877–886. DOI: 10.1111/j.1365-3059.2008.01839.x.
6. Kozubikova-Balcarova E., Koukol O., Martin M.P., Svoboda J., Petrusek A., Dieguez-Urbeondo J. The diversity of oomycetes on crayfish: Morphological vs. molecular identification of cultures obtained while isolating the crayfish plague pathogen // *Fungal Biology*, 2013, Vol. 117, № 10, pp. 682–691. DOI: 10.1016/j.funbio.2014.05.006.
7. Li M., Senda M., Komatsu T., Suga H., Kageyama K. Development of realtime PCR technique for the estimation of population density of *Pythium* intermedium in forest soils // *Microbiological Research*, 2010, Vol. 165, pp. 695–705. DOI: 10.1016/j.micres.2009.11.010.
8. Lopez M.M., Bertolini E., Olmos A., Caruso P., Gorris M.T., Llop P., Penyalver R., Cambra M. Innovative tools for detection of plant pathogenic viruses and bacteria // *International Microbiology*, 2003, Vol. 6, pp. 233–243. DOI: 10.1007/s10123-003-0143-y.
9. Lopez M.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? // *Current Issues in Molecular Biology*, 2009, Vol. 11, pp. 13–46. PMID: 18577779.
10. McCartney H.A., Foster S.J., Fraaije B.A., Ward E. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens // *Pest Management Science*, 2003, Vol. 59, pp. 129–142. DOI: 10.1002/ps.575.
11. Molitor C., Inthavong B., Sage L., Geremia R.A., Mouhamadou B. Potentiality of the *cox1* gene in the taxonomic resolution of soil fungi // *FEMS Microbiology Letters*, 2009, Vol. 302, №1, pp. 76–84. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01839.x.
12. Robideau G.P., De Cock A.W., Coffey M.D., Voglmayr H., Brouwer H. et al. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer // *Molecular Ecology Resources*, 2011, Vol. 11, pp. 1002–1011. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2011.03041.x.
13. Martin R.R. Past and future of immunological assays for the detection of plant pathogens // *Journal of Plant Pathology*, 2008, Vol. 90, P. 380. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2004.tb00354.x.
14. GenBank. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> (accessed 02 August 2017).
15. Integrated DNA Technologies. Available at: <https://eu.idtdna.com/site> (accessed 02 August 2017).
16. Alaei H., Rostami F. Identification of cucumber damping-off based on morphological and molecular characterizations in Rafsanjan // *Journal of Plant Pathology*, 2013, Vol. 48, №4, pp. 177–182.
17. Gomes E.A., Kasuya M.C.M., de Barros E.G., Borges A.C., Araujo E.F. Polymorphism in the

internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi // *Genetics and Molecular Biology*, 2002, Vol. 25, №4. pp. 477–483. DOI: 10.1590/S1415-47572002000400018.

18. BLAST. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank> (accessed 02 August 2017).

19. Wang P.H., Wang Y.T., White J.G. Species-specific PCR primers for *Pythium* developed from ribosomal ITS1 region // *Letters in Applied*

*Microbiology*, 2003, Vol. 37, №2. pp. 127–132. PMID: 12859654.

20. Tambong J.T., de Cock A.W., Tinker N.A., Lévesque C.A. Oligonucleotide array for identification and detection of *Pythium* species // *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, Vol. 72, № 4. pp. 2691–2706. DOI: 10.1128/AEM.72.4.2691-2706.2006.