

Обзорная статья

УДК 633.84:632.3

EDN UKQXFI

<https://doi.org/10.22450/1999-6837-2025-19-3-28-48>

Грибные инфекции сои: обзор открытых геномных коллекций и будущие перспективы молекулярной диагностики

Павел Дмитриевич Тимкин¹, Андрей Андреевич Пензин²

^{1, 2} Всероссийский научно-исследовательский институт сои

Амурская область, Благовещенск, Россия

¹ tpd@vniisoi.ru, ² paa@vniisoi.ru

Аннотация. Фитопатогенные грибы представляют серьезную угрозу для соевых культур, значительно снижая их урожайность и качество. Данная статья представляет детальный обзор текущего состояния геномных данных для основных фитопатогенов сои: *Cercospora sojina* Hara, *Cercospora kikuchii* (T. Matsuoka & Tomoy.) M. W. Gardner, *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. и *Septoria glycines* Hemmi. Анализируются имеющиеся в открытых источниках геномные сборки, их возможная применимость для разработки молекулярно-генетических диагностических тест-систем в Амурской области. Особое внимание уделяется сравнительным преимуществам и ограничениям различных методов молекулярной диагностики, таких как классическая и количественная ПЦР, изотермические методы амплификации (RPA, LAMP, NASBA, RCA) и комбинированные подходы с применением CRISPR/Cas-систем. Технология ПЦР предоставляет быстрые и точные результаты, но требует лабораторных условий, в то время как изотермические методы предлагают возможность диагностики в полевых условиях, однако требуют более сложный дизайн праймеров. Исследуется перспектива использования изотермических методов (LAMP и RPA), а также CRISPR/Cas, благодаря их высокой специфичности и чувствительности. Описанные методы дают возможность существенно улучшить точность и скорость диагностики, что критически важно для своевременного принятия мер по защите сои. Выявлены ключевые направления для дальнейших исследований, включая необходимость полногеномного секвенирования местных штаммов и развития специфичных молекулярных маркеров для повышения эффективности диагностики фитопатогенов.

Ключевые слова: грибные инфекции, соя, диагностика, изотермические амплификации, фитопатогены, геномика, CRISPR/Cas

Для цитирования: Тимкин П. Д., Пензин А. А. Грибные инфекции сои: обзор открытых геномных коллекций и будущие перспективы молекулярной диагностики // Дальневосточный аграрный вестник. 2025. Том 19. № 3. С. 28–48. <https://doi.org/10.22450/1999-6837-2025-19-3-28-48>.

Review article

Soybean fungi: A review of open genomic collections and future prospects for molecular diagnostics

Pavel D. Timkin¹, Andrey A. Penzin²

^{1, 2} All-Russian Scientific Research Institute of Soybean

Amur region, Blagoveshchensk, Russian Federation

¹ tpd@vniisoi.ru, ² paa@vniisoi.ru

Abstract. Phytopathogenic fungi pose a serious threat to soybean crops, significantly reducing their yield and quality. This article provides a detailed review of the current status of genomic data for the major soybean phytopathogens: *Cercospora sojina*, *Cercospora kikuchii*, *Fusarium*

solani and *Septoria glycines*. The genomic assemblies available in open sources and their possible applicability for the development of molecular genetic diagnostic test systems in the Amur region of Russia are analyzed. Special attention is paid to the comparative advantages and limitations of different molecular diagnostic methods, such as classical and quantitative PCR, isothermal amplification methods (RPA, LAMP, NASBA, RCA) and combined approaches (CRISPR/Cas systems). PCR technology provides rapid and accurate results but requires laboratory conditions, while isothermal methods offer the possibility of field diagnostics but require more complex primer design. The prospect of using isothermal methods (LAMP, RPA), as well as CRISPR/Cas, is explored due to their high specificity and sensitivity. The described methods provide an opportunity to significantly improve the accuracy and speed of diagnostics, which is critical for timely adoption of soybean protection measures. Key directions for further research are identified, including the need for full genomic sequencing of local strains and the development of specific molecular markers to improve the efficiency of phytopathogen diagnostics.

Keywords: fungal infections, soybean, diagnostics, isothermal amplifications, phytopathogens, genomics, CRISPR/Cas

For citation: Timkin P. D., Penzin A. A. Soybean fungi: A review of open genomic collections and future prospects for molecular diagnostics. *Dal'nevostochnyi agrarnyi vestnik*. 2025;19;3:28–48. (in Russ.). <https://doi.org/10.22450/1999-6837-2024-19-3-28-48>.

Введение. Грибные инфекции сои способны значительно снизить урожайность и качественные характеристики семян инфицированных растений, что, как следствие, приводит к серьезным экономическим потерям, снижая рентабельность производства данной культуры. Грибы повреждают как надземные, так и подземные части растения, вызывая загнивание корней, пожелтение и усыхание листьев. Вследствие этого соя становится более уязвимой к стрессовым условиям, таким как нехватка воды или питательных веществ, что дополнительно ухудшает ее здоровье и продуктивность. Кроме того, некоторые грибные патогены могут выделять токсичные вещества, что может повлиять на безопасность конечного продукта и вызвать проблемы для его применения в пищевой промышленности. Согласно зарубежным исследованиям, в регионах, где было зафиксировано распространение грибных заболеваний, наблюдался экономический ущерб производству сои, исчисляемый десятками миллиардов долларов [1–3].

В России грибные патогены встречаются повсеместно в местах выращивания сои – от западных регионов до Дальнего Востока, в том числе Приморского края и Амурской области [4, 5].

К основным грибным инфекциям в Амурской области относятся септориоз (*Septoria glycines* T. Hemmi. Syn.), церкоспороз (*Cercospora sojina* Hara), пурпурный церкоспороз (*Cercospora kikuchii*

(Matsuet Tomoyasu) Yarden) и фузариоз (*Fusarium solani* (Mart.) Sacc.) [6].

Распространение грибных болезней сои представляет собой сложный процесс, который начинается с заражения растений патогенными грибами через споры, переносимые ветром, дождем или насекомыми. Внешние факторы, такие как влажность, температура, устойчивость сорта и способы возделывания, играют ключевую роль в развитии инфекций. Патогены могут проникать в растения через естественные отверстия или повреждения листьев и корней. После заражения грибные инфекции начинают размножаться, что приводит к образованию колоний и выделению токсинов, способных разрушать клеточные структуры сои. Патогены также могут сохраняться в остатках растений или в почве в виде мицелия или спор, что способствует их дальнейшему распространению в последующих сезонах [7].

Септориоз – заболевание, вызываемое грибами рода *Septoria*, поражает в основном листья и бобы. Он проявляется в виде коричневых пятен, напоминающих ржавчину, на листьях растений, в связи с чем уменьшается их фотосинтезирующая площадь, что снижает общую продуктивность растения. При сильном поражении листья могут желтеть и опадать, что приводит к ухудшению качества и количества урожая [8, 9].

Церкоспороз, который вызывается грибами *Cercospora sojina* Hara, проявляется в виде мелких темно-коричневых пя-

тен, располагающихся на листьях растения. Пятна имеют характерную овальную форму и могут увеличиваться в размере, что приводит к потере площади фотосинтеза. Заболевание может существенно снизить урожайность семян, поскольку пораженные листья желтеют и преждевременно опадают. Также под действием патогена может происходить ухудшение качества семян, так как они снижают целостность и прочность семенной оболочки; в ходе нарушения барьерной функции семена могут быть подвержены другим заболеваниям. Отмечается, что патоген способен сохраняться в почве на остатках пораженных растений до двух лет, что демонстрирует его высокую жизнеспособность и значительно затрудняет борьбу с ним с помощью севооборота и обработки почвы [10–12].

Пурпурный церкоспороз, вызываемый патогеном *Cercospora kikuchii*, как и предыдущие патогены, поражает листья растений, что, в свою очередь, приводит к их преждевременному опаданию и значительному снижению продуктивности. Внешние проявления болезни характеризуются появлением пятен фиолетового и темно-коричневого цветов на листьях, что может уменьшить фотосинтетическую активность. Пораженные семена часто окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, что обусловлено действием церкоспорина – токсина, вырабатываемого грибом. Церкоспорин может также нарушать физиологические процессы в растении, увеличивая восприимчивость к другим заболеваниям и стрессовым условиям [13, 14].

Фузариоз – болезнь, проявляющаяся в виде пожелтения и увядания листьев, гниения корней и стеблей, выделения капель влаги (экссудата) на поверхности побегов, а также образования розоватого или белого налета, что указывает на спороношение гриба. Вызывается грибом рода *Fusarium*, который легко распространяется через зараженные семена, почву и остатки растений. Помимо прочего, он способен продуцировать опасные метаболиты в семенах зерновых культур, такие как зеараленон и деоксиниваленол, которые представляют собой микотоксины, вызывающие серьезные последствия как у животных, так и у человека при поедании [15, 16].

Традиционные методы диагностики фитопатогенов сои включают визуальную оценку, микроскопическое исследование, выделение изолятов патогена на питательных средах и серологические тесты. Визуальная инспекция предполагает осмотр растений на наличие видимых симптомов заболеваний, таких как пятна на листьях или увядание. Микроскопия позволяет изучить структуру патогенов, однако требует высокого уровня квалификации. Изоляция подразумевает выделение патогена из пораженных тканей, что может занять значительное время и требует специального оборудования. Серологические тесты основаны на реакции антител к специфическим антигенам патогенов, что дает возможность быстрой и точной идентификации, но тесты могут быть дорогостоящими. Данные способы обеспечивают раннее обнаружение патогенов, однако они могут быть трудоемкими и требуют значительных ресурсов и опыта специалистов, что зачастую делает диагностику медленной и сложной.

К современным методам можно отнести применение классической и количественной ПЦР. Уже сейчас разработан и апробирован набор олигонуклеотидов для диагностики фитопатогенных грибов *C. sojina*, *C. kikuchii*, *F. solani*, *S. glycines*. Для детекции использовались ядерные, митохондриальные и ITS локусы, которые позволяли дифференцировать даже *C. sojina* и *C. kikuchii*. Аналогично для *F. solani* и *S. glycines* созданы диагностические наборы для детекции этих фитопатогенных грибов [17]. Применимость результатов мировых исследовательских групп в диагностике и идентификации амурских штаммов еще предстоит выяснить в ходе длительного тестирования. По всей видимости, наибольшую трудность вызовет апробация данных результатов на амурских штаммах *S. glycines*. В случае получения отрицательных результатов будет иметься необходимость в полногеномном секвенировании штаммов из амурских коллекций.

В рамках детекции фитопатогенных грибов исследователи уже давно рассматривают современные молекулярно-генетические технологии для их идентификации. Уже сейчас для целого ряда грибов разработаны и созданы современные мо-

лекулярно-генетические методы, которые включают рутинную ПЦР, дорогостоящее секвенирование нового поколения, ДНК-зонды, микрочипы и даже экспериментальные стратегии использования изотермических амплификаций [18].

Целью работы является обзор геномных данных грибов *C. sojina*, *C. kikuchii*, *F. solani* и *S. glycines*, а также возможность использования соответствующих результатов для создания современных диагностических тест-систем в целях идентификации представленных грибов в Амурской области.

Геномика *Cercospora sojina*, *Cercospora kikuchii*, *Septoria glycines* и *Fusarium solani* сои. В базе данных NCBI содержится информация о геномных сборках, аннотированных генах или о последовательностях ДНК. Для всех представленных в данной работе грибов, за исключением *S. glycines*, имеются геномные сборки и аннотированные гены (табл. 1).

Представленная в качестве референсного генома для *C. sojina* сборка "ASM2449921v1", полученная исследователями из Аргентины, является образцовой и может использоваться для сравнения с амурскими штаммами, паразитирующими на сое, так как источником выделения ее являлись листья сои. Однако географическая удаленность региона, откуда был получен данный штамм, может являться причиной большого количества генетических полиморфизмов, отличных от *C. sojina* в Амурской области.

С учетом географического разнообразия и полноты геномной сборки наиболее подходящим для решения задач детекции и идентификации подходит сборка "ASM429982v1", так как образцами для ее получения послужили штаммы из географически близкого региона Цзямысы в Китае (рис. 1). Другая геномная сборка "ASM253473v1" имеет менее конкретизированную локализацию из провинции Хэйлунцзян, что также географически близко к Амурской области. Кроме того, образцы были взяты с полей, а не из эталонных коллекций. Тем не менее целью данного исследования было изучение генов, вовлеченных в патогенетические механизмы. Первичные данные, полученные в данном исследовании, имеют глубокое покрытие, но у исследователей не было

цели достраивать геном. Возможно, представленные контиги могут пригодиться другим исследователям, которые смогут заниматься сборкой своих образцов, опираясь на эти данные [19, 20].

Другие же геномные сборки являются устаревшими, получены до 2018 г. включительно, имеют малую длину, недостаточный уровень готовности и удаленное географическое происхождение. К тому же цели и задачи у исследователей состояли не в получении полногеномной последовательности. Например, один из самых первых полученных результатов – это частичная сборка контигов размером более 60 кб, которые использовались для разработки 135 маркеров SNP [21].

Недостатками использования геномных сборок на *C. kikuchii* для создания молекулярно-генетических систем диагностики является то, что в базе данных не представлено результатов на уровне «завершено», что может внести затруднения в работу. Также используемые образцы для секвенирования имеют географически удаленное расположение от Амурской области. Однако референсная сборка была получена из коллекции Японского международного исследовательского центра сельскохозяйственных наук и имеет местное происхождение, что географически роднит *C. kikuchii* из Японии с амурскими штаммами. Несмотря на то, что референсный геном получен с географически близких штаммов, сама геномная сборка находится на уровне контигов, что может внести некоторые неудобства в работу с такими данными. Оставшиеся две геномные сборки были созданы на основе штаммов из США и Аргентины. Они были собраны до уровня «скаффолдов», но их удаленность от Дальнего Востока и Амурской области делает такие сборки малопригодными для использования в создании систем ПЦР детекции [22].

Анализ геномных данных для *Fusarium solani* осложняется тем, что все имеющиеся на данный момент сборки были получены из грибов, хозяином которых не являлась соя. Помимо того, любая работа будет усложняться географической удаленностью штаммов, геномы которых были секвенированы. То есть в данном случае можно столкнуться с проблемой, что географически удаленные штаммы,

Таблица 1 – Геномные сборки для модельных представителей фитопатогенов
Table 1 – Genomic assemblies for model representatives of phytopathogens

Id геномной сборки	Уровень сборки/длина сборки, Мб	Дата публикации	Технология секвенирования/метод сборки	Глубина покрытия	Географическое расположение
<i>C. sojina</i>					
ASM2449921v1	завершено/40,1	август, 2022 г.	Illumina/ GATK v. 4.1.0.0	150,0×	Аргентина: Венадо Туэрто, Санта-Фе
ASM429982v1	завершено/40,1	февраль, 2019 г.	PacBio RSII/ SMRT Link v. v5.0.1	150,0×	Китай: Цзямусы
ASM253473v1	контиг/40,8	октябрь, 2017 г.	PacBio/Canu	120,0×	Китай: Хэйлунцзян (образец с поля)
ASM343510v1	скаффолд/31,1	август, 2018 г.	Illumina; PacBio/ SPAdes v. 3.1	600,0×	США: Арканзас
ASM208428v1	контиг/29,9	апрель, 2017 г.	Illumina GA IIx/ Velvet v. 0.7	239,0×	США: Джорджия (образец с поля)
ASM215069v1	скаффолд/15,5	май, 2017 г.	Illumina/CLC Genomics v. 7.5.1	354,0×	США: Миссисипи
<i>C. kikuchii</i>					
Ck_assembly01	контиг/34,4	июль, 2021 г.	PacBio RSII/ canu v. 1.9	100,0×	Япония: Кагосима
UBA_Ckiku_1.0	скаффолд/33,2	октябрь, 2019 г.	Illumina NovaSeq/Celera Assembler v. 8.3	196,0×	Аргентина: Сан-Педро, Буэнос-Айрес
ASM535685v1	скаффолд/33,2	май, 2019 г.	IonTorrent/ SPAdes v. 3.2.1	42,0×	США: Индиана
<i>Fusarium solani</i>					
NDSU_Fsol_1.0	контиг/59,4	май, 2022 г.	Oxford Nanopore MinION/ NECAT v. 0.0.1	225,0×	США: округ Уилкин, штат Миннесота
ASM4043682v1	контиг/66,6	июль, 2024 г.	Illumina NovaSeq; PacBio Sequel/ HiFiasm v. 0.17.4-r455	31,0×	Китай: Гуйчжоу
ASM3308537v1	контиг/52,4	октябрь, 2023 г.	PacBio/ FALCON v. 0.3.0	89,0×	Китай: Гуанчжоу
ASM3577295v1	контиг/55,2	ноябрь, 2020 г.	Illumina HiSeq; PacBio Sequel/ SOAPdenovo v. 2.04; SSPACE v. 3.0	99,0×	Китай: Гуйчжоу
ASM3001412v1	контиг/66,6	май, 2023 г.	PacBio RSII; Illumina HiSeq/ FALCON v. 1.2.4; SPAdes v. 3.15.4	100,0×	Китай: Чанша
ASM221590v1	контиг/45,8	июль, 2017 г.	PacBio; Illumina HiSeq/ SOAPdenovo v. 2.04	460,0×	Южная Корея

Продолжение таблицы 1 (continuation of table 1)

Id геномной сборки	Уровень сборки/длина сборки, Мб	Дата публикации	Технология секвенирования/ метод сборки	Глубина покрытия	Географическое расположение
ASM1932001v1	контиг/51,8	июль, 2021 г.	PacBio RSII; Illumina HiSeq/ SOAPdenovo v. 2.04	430,0×	Китай: Фуцзянь
IISc_Fs_1.0	контиг/48,7	май, 2020 г.	Illumina NextSeq; Oxford Nanopore MinION/Newbler v. MAY-2018	175,6×	Индия: Карнатака
Fusarium solani Karbala-1	скаффолд/51,6	июль, 2022 г.	Illumina HiSeq/ Velvet v. 1.2.10	20,0×	Ирак
F_sol_A01-1	скаффолд/54,7	январь, 2023 г.	Illumina MiSeq/ SPAdes v. 3.15.4	34,7×	США: Калифорния
F2	скаффолд/55,2	март, 2023 г.	DNBSEQ/ SOAPdenovo v. 2.04	100,0×	Китай: Юньнань, Вэньшань
ASM2757464v1	скаффолд/53,8	январь, 2023 г.	Illumina NovaSeq/ SOAPdenovo v. 2.04; SPAdes v. 3.13.0; ABySS v. 2.1.5	100,0×	Китай: Пекин
Fusso1	контиг/52,9	ноябрь, 2021 г.	PacBio RSII/ Falcon v. 0.7.3	96,9×	нет данных

Примечания: 1. Геномные сборки представлены в порядке их размещения в базе NCBI.
2. Полужирным шрифтом выделены геномные сборки, доступные в данное время в качестве RefSeq (справочных) геномов данного вида.

к тому же эволюционно приспособившиеся к разным хозяевам, могут иметь различные механизмы вирулентности, а также минорные отличия в областях генома, которые могут быть использованы как для оценки вирулентности, так и для идентификации [23]. В нынешних условиях вопрос генетической изменчивости фитопатогенных грибов в зависимости от хозяина и разных ареалов обитания является еще малоизученным, и в контексте изучения амурских штаммов данного фитопатогена придется учитывать подобные особенности при создании идентификационных тест-систем.

Для *S. glycines* не имеется аннотированных генов или геномных сборок. В наличии один проект "PRJNA764246", представленный 95 файлами SRA (Sequence Read Archive) из раздела с первичными данными секвенирования и 53 последовательностями ДНК из раздела "Nucleotide". Однако этот проект нельзя воспринимать как достоверный источник информации о геноме *S. glycines*, так как его изначальная задача состояла в оценке микробиомного

сообщества на сое в процессе использования фунгицидов. Помимо инокулированного *S. Glycines*, в тех образцах также находились и другие фитопатогенные грибы [24]. На данный момент единственным релевантным источником информации о ДНК-последовательности *S. Glycines* являются данные из раздела "Nucleotide". Указанный раздел содержит информацию о первичной последовательности генов, отвечающих за синтез протеинов, встроенных в дыхательную цепь (нативные цитохромы и мутантные виды) [25], структурных компонентов цитоскелета (актин, бета-тубулин), а также различных фрагментах рРНК и кальмодулина [26].

Все представленные последовательности, ввиду своего эволюционного консерватизма, а также одновременно и ряду генетических полиморфизмов, могут служить удобными мишениями для проведения дифференциально-диагностических исследований. Впрочем, отсутствие представлений о геноме может составить проблему при проведении подобного рода экспериментов.

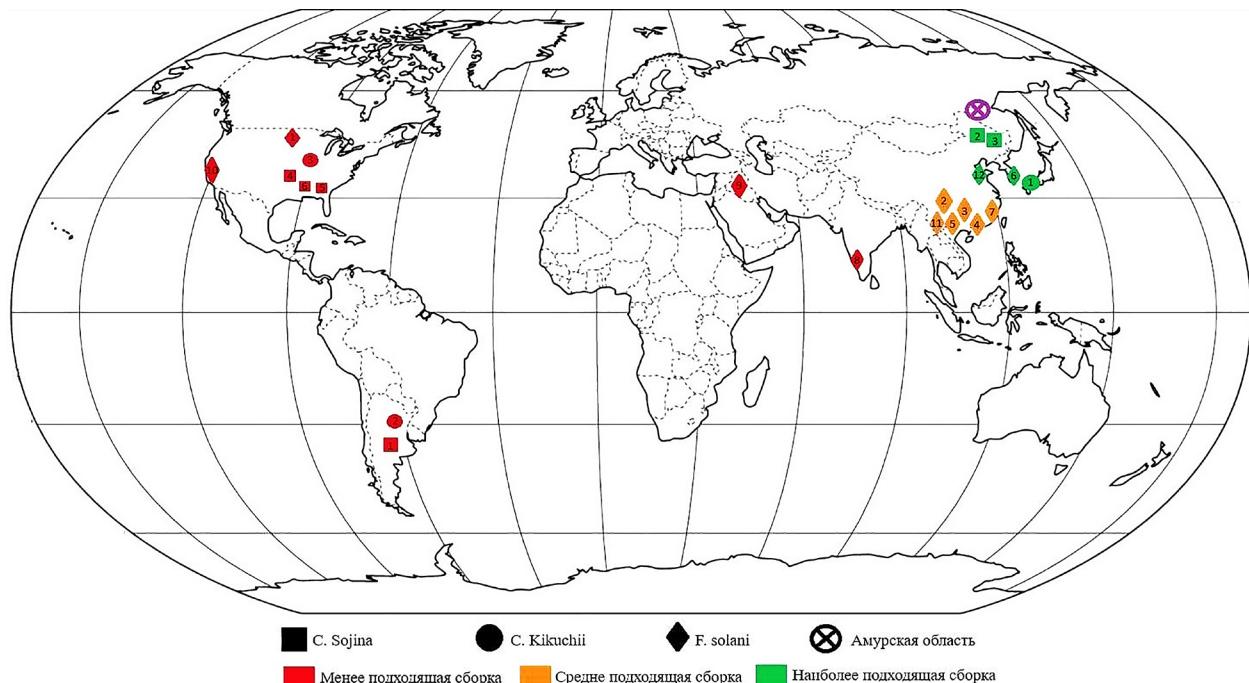


Рисунок 1 – Географическое расположение фитопатогенов, геномы которых были собраны

Figure 1 – Geographical location of phytopathogens from which genome assemblies were obtained

Перспективы интеграции молекулярно-генетической идентификации возбудителей церкоспороза, пурпурного церкоспороза, фузариоза и септориоза. Учитывая накопившийся объем знаний о факторах вирулентности фитопатогенных грибов и последовательностях, кодирующих их, появляются перспективы интеграции этих данных в технологии молекулярно-генетических идентификаций. Наличие геномных данных высокого качества позволяет создавать специфические олигонуклеотиды (праймеры, зонды, гРНК) для качественной детекции того или иного фитопатогена. Учитывая доступность геномных данных, близких по географическому расположению с Дальним Востоком России, можно будет использовать открытые сборки либо для создания специфичных олигонуклеотидов, либо для использования этих результатов в качестве референса при секвенировании местных штаммов. Собственные генетические данные позволяют упростить создание набора олигонуклеотидов для детекции.

На текущий период времени для создания диагностического набора с ис-

пользованием молекулярно-генетических технологий удобнее будет работать с открытыми геномными данными по *C. sojina*. Региональная близость анализируемого штамма, одинаковый хозяин (соя) и обилие геномных сборок в статусе «завершено» позволяют довольно быстро подобрать необходимое количество нуклеотидов как для классической ПЦР, так и для более современных технологий, таких как изотермические амплификации.

Геномные данные по *C. kikuchii* и *F. solani* могут создать ряд трудностей, ввиду незаконченности сборок, удаленности мест изъятия штаммов и даже наличия других хозяев. Это может привести к получению ложноположительных результатов. Больше всего трудностей может возникнуть при проведении подобных работ для *S. glycines*, в связи с отсутствием геномных сборок и возможностью использования данных только из «nucleotide». Гипотетически использование локусов, кодирующих различные эволюционно-консервативные белки (актин, тубулин, кальмодулин), а также некоторые рРНК, позволит создать достаточно

специфичный набор олигонуклеотидов для классической ПЦР.

Но использование таких последовательностей будет сопряжено с большой работой по нивелированию нецелевого эффекта для достижения достаточной селективности к желаемой матрице. К тому же такие условия потребуют дополнительной работы, чтобы набор позволял дифференцировать *S. glycines* от других организмов в случае забора материала с полей. Такие универсальные для многих грибов ДНК-последовательности явно будут непригодны для работы с технологией изотермической амплификации, ввиду вероятности гибридизации с другими грибами, что затруднит идентификацию.

Для решения этой проблемы необходимо полногеномное секвенирование амурских штаммов, а затем поиск основных факторов вирулентности, которые зачастую являются уникальными для каких-либо фитопатогенов, специальных областей внутри ITS (внутренний транскрибуируемый спайсер), фрагментов в рРНК или других конститутивных генов [27].

Изотермические амплификации и их модификации в молекулярно-генетической диагностике. Использование RPA для диагностики фитопатогенов. RPA (Recombinase polymerase amplification или рекомбиназная полимеразная амплификация) – это высокочувствительный и селективный изотермический метод амплификации, применяемый в изотермических условиях (при температуре 37–42 °C). Такие низкие температуры в данной технике обоснованы тем, что отжиг праймеров происходит не из-за температурного фактора, а ферментативно, посредством фермента рекомбиназы. Еще одной из особенностей RPA является длина праймеров, которая обычно составляет 30–35 нуклеотидов (есть отдельные свидетельства о 45 нуклеотидах). Также иногда используются праймеры с длиной для классической ПЦР [28]. Олигонуклеотиды длиннее 35 оснований зачастую приводят к повышению вероятности образования вторичных структур и шпилек, в то время как слишком короткие праймеры ведут к низкой селективности с матрицей в изотермических условиях [29, 30].

Технология RPA уже успешно апробирована на грибах рода *Phytophthora*. Ис-

следователи сообщают о высокой специфичности метода RPA для идентификации патогенных грибов в образцах растений, но отмечалась низкая чувствительность. Немаловажным остается факт применения этой технологии в полевых условиях, что обусловлено отсутствием требований к дорогостоящему лабораторному оборудованию (амплификатор) и низкому температурному оптимуму [31].

Данная диагностическая техника является весьма удобной и предпочтительной для адаптации ее к идентификации фитопатогенных грибов, описываемых в данной статье. Низкий температурный оптимум и незначительная погрешность при контаминации дают возможность использования в полевых условиях. Однако получение реактивов для проведения данной амплификации затруднено ввиду логистических проблем. Они вызваны тем, что компания TwistDx™, которая занимается производством реагентов для RPA, не поставляет их на территорию России.

LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification* или петлевая изотермическая амплификация) – это высокоспецифичный метод амплификации нуклеиновых кислот, при котором набор из четырех или шести различных праймеров связывается с шестью или восемью различными областями целевого гена. Этот набор праймеров состоит из двух внешних праймеров (F3 и B3), двух внутренних праймеров (прямой внутренний праймер (FIP) и обратный внутренний праймер (BIP)) и двух петлевых праймеров (LF и LB) [32].

Данная технология и ее модификации (мультиплексная, количественная и другие) уже активно используются для полевой диагностики фитопатогенных грибов сельскохозяйственных культур. Например, для детекции фитопатогенных грибов пшеницы уже имеются положительные результаты. Детекция результатов LAMP в реальном времени, с помощью портативных амплификаторов, предоставляет возможность для проведения анализов в полевых условиях [33, 34].

LAMP активно тестируется для определения грибов рода *Phytophthora* на земляничных полях. Были сделаны выводы, что LAMP был наиболее чувствительным анализом из протестированных методов, будучи в 10 раз более чувствительным,

чем гнездовая ПЦР, и в 100 раз – по сравнению с ПЦР в реальном времени [35].

Есть опыт применения этой изотермической техники для дифференциации грибов *Fusarium oxysporum* и *Fusarium solani* на примере корневищ лотоса (*Nelumbo nucifera*). В качестве дополнительного контроля использовались образцы *F. solani*. Был достигнут положительный результат, позволяющий определять конкретный вид. При доработке уже представленных олигонуклеотидов возможно получится создать подобный комплект для определения *F. solani* [36].

Проведение данной методики сопряжено с рядом трудностей. В первую очередь, сложной задачей является дизайн и конструкция пар праймеров. Это достаточно сложная и нетривиальная задача, которая сильно отличается от конструкции олигонуклеотидов для классической ПЦР. Несмотря на то, что для дизайна праймеров к LAMP имеется специализированное программное обеспечение [37], как и для классической ПЦР, работа с ним имеет ряд трудностей и проблем, которые не позволяют интуитивно решить эту задачу. Помимо этого, в проведении LAMP имеется вероятность получения ложноположительных результатов из-за возможности гибридизации праймеров с нецелевой матрицей и даже друг с другом с образованием вторичных димеров [38, 39].

Учитывая доступность реактивов, обилие экспериментального опыта и данных по диагностике наиболее важных фитопатогенных грибов, а также техническую возможность к полевой реализации данной технологии, эта изотермическая техника и ее модификации выглядят наиболее перспективными для применения в Амурской области. Это позволит детектировать *C. sojina*, *C. kikuchii*, *S. glycine* и *F. solani* в полевых условиях. Дополнение имеющихся геномных сборок в базе данных NCBI результатами секвенирования амурских штаммов даст возможность быстрее создать корректный набор праймеров для проведения LAMP.

NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*) – один из молекулярно-биологических методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот, в частности РНК, также имеющий модификации и для амплификации на основе ДНК. Суть

метода состоит в образовании дуплекса кДНК:РНК путем гибридизации с целевой РНК комплементарного ДНК-праймера (прямого), лигированного с Т7-промотором, в котором далее посредством активности РНКазы Н идет разрушение РНК-цепи и образование второй цепи кДНК при помощи отжига ДНК-праймера (обратного) без Т7-промотора.

Фрагмент Т7-промотора, расположенный на конечной двухцепочечной кДНК, служит матрицей для транскрипционной активности ДНК-зависимой РНК-полимеразы Т7, приводящей к экспоненциальному накоплению молекул однокепочечной РНК [40]. Реакция проходит при постоянной температуре в диапазоне 40–55 °С. Детекция целевой нуклеиновой кислоты осуществляется по относительной флуоресценции, возникающей при гибридизации амплифицированной РНК с флуоресцентным зондом [41].

С практической точки зрения, данный метод является эффективным способом индикации и идентификации патогена в объекте *in situ*, когда степень поражения напрямую коррелирует с количеством патогенной РНК [42] или когда патоген является непосредственно РНК-содержащим [43].

В сельском хозяйстве, в частности при диагностике фитопатогенов вирусной и бактериальной природы, NASBA пока не обладает широкой распространенностю из-за продолжительного и трудозатратного процесса предподготовки и осуществления гибридизации. Из всех предложенных научным сообществом протоколов действительно быстрым можно считать идентификацию вириуса цитрусовых *Xanthomonas citri*, предложенную в работе [43]. Также использование метода NASBA было апробировано при диагностике фитопатогенов яблони – вириода рубцов на коже яблока (ASSVd) [44], вириуса ямчатости древесины яблони [45]; картофеля – вириуса Y картофеля, *Fusarium roae* и *Ralstonia solanacearum* [46], а также других культур [47].

Эффективность данного метода детекции в полевых условиях зависит преимущественно от целесообразности и быстродействия выбранного способа детекции амплифицированных нуклеиновых кислот. В контексте данной проблематики

приоритет в разработке отдается не исключительно оптимизации протокола самой амплификации, как в случае с LAMP или RPA, а эффективному сочетанию NASBA с другими методами детекции, будь то гибридизационный зонд или более совершенная диагностическая система, основанная на флуоресценции имеющихся в нуклеиновой смеси репортеров (коротких олигонуклеотидов с флуоресцентной меткой и гасителем на разных его концах), дающих свечение при активации эндонуклеазной активности CRISPR/Cas-систем вместе с их направляющими ДНК/РНК.

По сравнению с аналогичными методами амплификации, использующими в качестве матрицы РНК (например, ОТ-ПЦР, RT-LAMP), метод NASBA не уступает по пороговой чувствительности (LOD, limit of detection) только ОТ-ПЦР. Однако чувствительность детекции в целом преимущественно зависит от качества подбора праймеров, оптимизации состава реакционной смеси и лишь, в конечном итоге, – от производительности самого метода [48].

В контексте практического применения NASBA для диагностики фитопатогенов сои грибной природы в Амурской области авторы считают его обоснованным в тех случаях, когда для диагностики важно количественное определение фитопатогена *in situ* в зараженных культурах, то есть, когда количественная оценка присутствия генетического материала (РНК) будет прямо коррелировать со степенью грибного поражения.

RCA (Rolling Circle Amplification). Среди методов изотермической амплификации является наименее популярным в диагностической практике. Суть метода состоит в амплификации длинного однцепочечного фрагмента ДНК на матрице кольцевой ДНК с использованием полимеразы phi29 со свойством смещения цепи (strand displacement) [49].

Данный метод был успешно апробирован как в ряде работ по диагностике инфекций, вызванных грибами и бактериями родов *Trichophyton*, *Candida*, *Aspergillus*, *Scedosporium* и *Streptococcus* в клинической практике [50–52], так и в сельском хозяйстве на примере диагностики грибов *Neofabraea* и *Fusarium* [53, 54].

Система SHERLOCK. Двухкомпонентная тест-система, основанная на сочетании RPA с CRISPR/Cas12a, для диагностики грибов рода *Alternaria* [55]. Авторы заявляют о хорошей чувствительности метода, который позволяет детектировать патогенную ДНК без необходимости в дорогостоящем оборудовании и трудоемких процессах промывки и очистки проб.

Данный метод сохраняет все преимущества изотермических амплификаций как в непосредственном осуществлении эксперимента, так и при дизайне праймеров. Удобная комбинация RCA с другими изотермическими амплификациями и подходами для детекции может служить перспективной основой для будущей диагностики, в том числе и фитопатогенов сои.

CRISPR/Cas. В последнее время одним из наиболее перспективных способов количественной оценки амплифицированного генетического материала в образцах бактериальных, грибных и других культур стало использование систем CRISPR/Cas9, Cas12a/b или Cas13a и направляющих (гидовых) гРНК (в зарубежной литературе используется термин crRNA, CRISPR RNA) [56] в tandemе с изотермическими амплификациями LAMP [57], RPA [58], NASBA [59].

Как описывалось ранее, последние проявляют свою нуклеазную активность при гибридизации гРНК с комплементарным спайсерным участком, находящимся на целевом локусе (ампликоне), в результате чего Cas-белок связывается со вторичной структурой, находящейся на гРНК, что приводит к knock-out/knock-off (выключению) гена по одному из PAM-мотивов (Protospacer Adjacent Motif), специальному для данного белка. После активации Cas-белок начинает «нарезать» все имеющиеся в смеси нуклеотиды, одними из которых, кроме целевого дуплекса, являются так называемые репортеры – короткие одноклеточные фрагменты, на концах которых присутствуют «гаситель» и «флуорофор», в результате чего появляется флуоресценция в разных спектрах, в зависимости от выбранного красителя, которую можно инструментально фиксировать с использованием амплификаторов с детекцией в режиме реального времени (количественно) или трансиллюминатора (качественно).

У данных систем есть ряд преимуществ. Во-первых, они имеют двухуровневый контроль специфичности, то есть при амплификации неспецифических продуктов (при использовании LAMP) или при недостаточной чувствительности детекции при малом количестве копий гена на первом этапе (при использовании RPA) детекция с использованием таких систем может компенсировать это за счет более специфичной гибридизации РНК с ампликоном. Во-вторых, не для всех видов изотермической амплификации пригодно использование интеркалирующих красителей, как, например, для NASBA (накапливается одноцепочечная РНК/ДНК), что делает данную систему более удобной в сравнении с классическими методами гибридизационных проб, где требуются значительные трудозатраты на подготовку и дизайн эксперимента.

В диагностике фитопатогенов сои уже имеется опыт использования комбинации различных изотермических амплификаций с CRISPR/Cas-системами для диагностики грибов рода *Diaporthe* (RPA и CRISPR/Cas12a) [60, 61], грибоподобных протистов рода *Phytophthora* (RPA и CRISPR/Cas12a, PCR и CRISPR/Cas12a, LAMP и CRISPR/Cas12a) [62, 63], что делает выбор данной стратегии для диагностики грибов *C. sojina*, *C. kikuchii*, *F. solani* в полевых условиях одной из наиболее удобных и перспективных для Амурской области и России в целом.

ДНК-микрочипы. Кроме классических методов амплификации и новых методов изотермической амплификации, в диагностике фитопатогенов существуют так называемые ДНК/РНК-микрочипы, являющиеся основой микроэррэй-анализа. Суть метода состоит в размещении на чипе (с кремниевой или гидрогелевой подложкой) коротких, меченных красителями зондов (олигонуклеотидов кДНК или кРНК), способных гибридизироваться с целевой ДНК/РНК и испускать свечение, детектируемое оборудованием [64].

Данный метод не требует наличия специфического оборудования, однако нуждается в дорогостоящем изготовлении микрочипов для анализа на заказ, а также в трудоемком дизайне кДНК-зондов. Несмотря на это, он является высокопроизводительным, поскольку способен

детектировать от нескольких десятков до нескольких миллионов различных локусов в исследуемой ДНК [65]. Такая черта является наиболее важной при потоковом скрининге, поскольку таким образом можно покрыть всю панель фитопатогенов, свойственную для той или иной культуры, особенно в тех случаях, когда нам неизвестна этиология инфекции и потенциальный ее возбудитель.

В сельскохозяйственной практике ДНК-микрочипы используются для детекции бактериальной и вирусной инфекции у риса [66], вирусной и вироидной инфекции у томата [67], а также в качестве универсальной диагностической микрочип-панели для диагностики наиболее распространенных возбудителей вирусной инфекции у сои, огурца, табака, гороха, цуккини, дыни и других культур [68].

ДНК- и РНК-секвенирование. Немаловажным и в то же время часто выходящим за рамки простой диагностики фитопатогенов в сельскохозяйственных культурах является классический метод метагеномного профилирования пораженных культур с использованием технологии высокопроизводительного ДНК- и РНК-секвенирования. Поскольку идентификация фитопатогенов данным методом основывается на прочтении всех нуклеиновых последовательностей в имеющемся материале, он позволяет генотипировать и фенотипировать фитопатогены без априорного знания об этиологии инфекции и ее возбудителе, а также исследовать метагеномное разнообразие и даже последствия поражения культуры, выраженные в измененной экспрессии генов самого растения [69]. Также данный метод раскрывает свою актуальность и в том случае, когда затруднительно выделение чистой нуклеиновой кислоты фитопатогена без РНК хоста (хозяина) (например, в случае вирусной инфекции) [70]. В биоинформационической практике также существуют готовые программные решения-протоколы (пайплайны), специально собранные для идентификации любых фитопатогенов на основе первичных данных РНК-секвенирования в любых сельскохозяйственных культурах [71, 72].

В рамках сельскохозяйственного применения имеется опыт идентификации фитопатогенов высокопроизводительным

секвенированием у сои [73], нута [74]; томата, дыни, клубники, стручкового перца и лимона [75].

Использование данного метода идентификации фитопатогенов сои на территории России, в том числе Амурской области, имеет перспективы не только в прикладном аспекте, но в том числе и в рамках фундаментальных научных исследований, а также аннотации фитопатогенетического разнообразия как возбудителей сои, так и других культур.

Заключение. Фитопатогенные грибы, поражающие сою, представляют серьезную угрозу для сельскохозяйственного производства, приводя к значительным экономическим потерям. Введение молекулярно-генетических методов диагностики в сельскохозяйственную практику предоставляет уникальные возможности для точного и быстрого выявления патогенов. Рассмотренные подходы дают возможность не только оперативно идентифицировать фитопатогены, но и следить за их изменчивостью, что особенно важно в условиях динамично изменяющейся экосистемы и растущего давления со стороны изменений климата и человеческой деятельности.

Геномика грибных патогенов открывает перспективы для разработки более точных и специфичных диагностических систем. Информация о генетическом разнообразии и специфических патогенетических механизмах позволяет корректно подбирать генетические маркеры для

идентификации. Однако текущие ограничения в геномных данных, особенно для *S. glycines*, указывают на необходимость дополнительных геномных исследований, включая полногеномное секвенирование амурских штаммов.

Изотермические методы амплификации, такие как LAMP и RPA, в сочетании с системами CRISPR/Cas, представляют собой наиболее перспективное направление для диагностики грибных патогенов сои в полевых условиях. Их высокая специфичность и чувствительность позволяют точно идентифицировать возбудителей даже в ограниченных ресурсных условиях, что особенно актуально для удаленных регионов, таких как Амурская область.

Внедрение молекулярно-генетических методов диагностики несет в себе потенциал значительно улучшить управление заболеваниями сои, повысив урожайность и качество продукции. Это требует междисциплинарного подхода, включающего совместные усилия генетиков, микробиологов и сельскохозяйственных специалистов, для претворения в жизнь этих передовых технологий.

Таким образом, несмотря на текущие вызовы и ограничения, рассматриваемые подходы открывают новые возможности для улучшения диагностики и контроля грибных заболеваний сои, которые могут стать важным компонентом устойчивого сельскохозяйственного производства в будущем.

Список источников

1. Bandara A. Y., Weerasooriya D. K., Bradley C. A., Allen T. W., Esker P. D. Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades // PLOS ONE. 2020. Vol. 15. No. 4. P. e0231141. doi: 10.1371/journal.pone.0231141.
2. Bradley C. A., Allen T. C., Sisson A. J. Soybean yield loss estimates due to diseases in the United States and Ontario, Canada from 2015–2019 // Plant Health Progress. 2021. No. 1. P. 483–495.
3. Hossain M. M., Sultana F., Yesmin L. Understanding *Phakopsora pachyrhizi* in soybean: comprehensive insights, threats, and interventions from the Asian perspective // Frontiers in Microbiology. 2024. Vol. 14. P. 1304205. doi: 10.3389/fmicb.2023.1304205.
4. Лукомец В. М., Пивень В. Т., Кочегура А. В. Болезни, вредители и сорняки на посевах сои в Краснодарском крае и меры борьбы с ними // Масличные культуры. 2007. № 1 (136). С. 66–75. EDN JVYMXP.
5. Gomzhina M., Gasich E., Gannibal P. Cercospora species associated with soybean diseases in Russia // Mycological Progress. 2024. Vol. 23. doi: 10.1007/s11557-024-01960-6.

6. Кузьмин А. А. Особенности распространения заболеваний сои на территории Амурской области // Дальневосточный аграрный вестник. 2023. № 2. С. 31–44. doi: 10.22450/19996837_2023_2_31. EDN YTZCMR.
7. Liu H. Response of soil fungal community structure to long-term continuous soybean cropping // Frontiers in Microbiology. 2019. Vol. 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.03316.
8. Compendium of soybean diseases and pests / ed. by G. L. Hartman, J. C. Rupe, E. J. Sikora. St. Paul, MN : APS Press, 2015.
9. Lin H.-A., Villamil M. B., Mideros S. X. Characterization of *Septoria* brown spot disease development and yield effects on soybean in Illinois // Canadian Journal of Plant Pathology. 2021. Vol. 43. P. 62-72. doi: 10.1080/07060661.2020.1755366.
10. Mian M. A. R., Boerma H. R., Phillips D. V. Performance of frogeye leaf spot-resistance and susceptible near-isolines of soybean // Plant Disease. 1998. Vol. 82. P. 1017–1021.
11. Cruz C. D., Dorrance A. E. Characterization and survival of *Cercospora sojina* in Ohio // Plant Health Progress. 2009. Vol. 10. P. 17. <https://doi.org/10.1094/PHP-2009-0512-03-RS>.
12. Barro J. P., Neves D. L., Del Ponte E. M. Frogeye leaf spot caused by *Cercospora sojina*: A review // Tropical Plant Pathology. 2023. Vol. 48. P. 363–374. doi: 10.1007/s40858-023-00583-8.
13. Daub M. E., Hangarter R. P. Light-induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin // Plant Physiology. 1983. Vol. 73. P. 855–857. doi: 10.1104/pp.73.3.855.
14. Cai G., Schneider R. Population structure of *Cercospora kikuchii*, the causal agent of Cercospora leaf blight and Purple Seed Stain in soybean // Phytopathology. 2008. Vol. 98. P. 823–829. doi: 10.1094/PHYTO-98-7-0823.
15. Wrather J. A., Koenning S. R., Anderson T. R. Effect of diseases on soybean yields in the United States and Ontario (1999–2002) // Plant Health Progress. 2003. Vol. 4. No. 1. P. 24. doi: 10.1094/PHP-2003-0325-01-RV.
16. Antonissen G., Martel A., Pasman F. The impact of Fusarium mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases // Toxins. 2014. Vol. 6. P. 430–452. doi: 10.3390/toxins6020430.
17. Hosseini B., Voegele R. T., Link T. I. Diagnosis of soybean diseases caused by fungal and oomycete pathogens: Existing methods and new developments // Journal of Fungi. 2023. Vol. 9. No. 5. P. 587. doi: 10.3390/jof9050587.
18. Hariharan G., Prasannath K. Recent advances in molecular diagnostics of fungal plant pathogens: A mini review // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2021. Vol. 10. P. 600234. doi: 10.3389/fcimb.2020.600234.
19. Luo X. Genome sequencing and comparative genomics reveal the potential pathogenic mechanism of *Cercospora sojina* on soybean // DNA Research. 2018. Vol. 25. No. 1. P. 25–37. doi: 10.1093/dnares/dsx035.
20. Gu X. Comparative genomics and association analysis identifies virulence genes of *Cercospora sojina* in soybean // BMC Genomics. 2020. Vol. 21. No. 1. P. 172. doi: 10.1186/s12864-020-6581-5.
21. Shrestha S. K. Genetic diversity, QoI fungicide resistance, and mating type distribution of *Cercospora sojina* – Implications for the disease dynamics of frogeye leaf spot on soybean // PLOS One. 2017. Vol. 12. No. 5. P. e0177220. doi: 10.1371/journal.pone.0177220.
22. Kashiwa T., Suzuki T. High-quality genome assembly of the soybean fungal pathogen *Cercospora kikuchii* // G3 (Bethesda). 2021. Vol. 11. No. 10. doi: 10.1093/g3journal/jkab277.
23. Borah N., Albarouki E., Schirawski J. Comparative methods for molecular determination of host-specificity factors in plant-pathogenic fungi // International Journal of Molecular Sciences. 2018. Vol. 19. No. 3. P. 863. doi: 10.3390/ijms19030863.
24. Lin H.-A., Mideros S. X. The effect of *Septoria glycines* and fungicide application on the soybean phyllosphere mycobiome // Phytobiomes Journal. 2023. Vol. 7. No. 2. P. 220–232. doi: 10.1094/pbiomes-12-21-0075-r.

25. Neves D. L. Identification of *Septoria glycines* isolates from soybean with resistance to quinone outside inhibitor fungicides // Plant Disease. 2022. Vol. 106. No. 10. P. 2631–2637. doi: 10.1094/pdis-08-21-1836-re.
26. Verkley G. J. A new approach to species delimitation in *Septoria* // Studies in Mycology. 2013. Vol. 75. No. 1. P. 213–305. doi: 10.3114/sim0018.
27. Capote N., Pastrana A. M., Aguado A. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance // Plant Pathology. Intech Open, 2012. doi: 10.5772/38011.
28. Lobato I. M., O'Sullivan C. K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances // Trends in Analytical Chemistry. 2018. Vol. 98. P. 19–35. doi: 10.1016/j.trac.2017.10.015.
29. Fuller S. L. Isothermal amplification and lateral-flow assay for detecting crown-gall-causing *Agrobacterium* spp. // Phytopathology. 2017. Vol. 107. No. 9. P. 1062–1068. doi: 10.1094/phyto-04-17-0144-r.
30. Wu L. Utilization of recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow strip for detection of *Perkinsus beihaiensis* in the oyster *Crassostrea hongkongensis* // Parasites & Vectors. 2019. Vol. 12. No. 1. doi: 10.1186/s13071-019-3624-3.
31. Rojas J. A. Development and application of qPCR and RPA genus- and species-specific detection of *Phytophthora sojae* and *P. sansomeana* root rot pathogens of soybean // Plant Disease. 2017. Vol. 101. No. 7. P. 1171–1181. doi: 10.1094/pdis-09-16-1225-re.
32. Wong Y. P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms // Journal of Applied Microbiology. 2018. Vol. 124. No. 3. P. 626–643. doi: 10.1111/jam.13647.
33. Yasuhara-Bell J. Specific detection of the wheat blast pathogen (*Magnaporthe oryzae Triticum*) by loop-mediated isothermal amplification // Plant Disease. 2018. Vol. 102. No. 12. P. 2550–2559. doi: 10.1094/PDIS-03-18-0512-RE.
34. Gomez-Gutierrez S. V., Goodwin S. B. Loop-mediated isothermal amplification for detection of plant pathogens in wheat (*Triticum aestivum*) // Frontiers in Plant Science. 2022. Vol. 13. P. 857673. doi: 10.3389/fpls.2022.857673.
35. Siegieda D. G. "Shining a LAMP" (Loop-Mediated Isothermal Amplification) on the molecular detection of phytopathogens *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in strawberry fields // Pathogens. 2021. Vol. 10. No. 11. P. 1453. doi: 10.3390/pathogens10111453.
36. Deng S. LAMP assay for distinguishing *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* in lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizomes // Plant Disease. 2022. Vol. 106. No. 1. P. 231–246. doi: 10.1094/pdis-06-21-1223-re.
37. Akhmetzianov L. U. Computer program for primer design for Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // Advanced Engineering Research. 2024. Vol. 24. No. 1. P. 98–108. doi: 10.23947/2687-1653-2024-24-1-98-108.
38. Becherer L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection // Analytical Methods. 2020. Vol. 12. No. 6. P. 717–746. doi: 10.1039/c9ay02246e.
39. Garafutdinov R. R. LAMP amplification of nucleic acids. I. Two decades of development and improvement // Biomics. 2021. Vol. 13. No. 2. P. 176–226. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-14.
40. Hamza I. A., Bibby K. Critical issues in application of molecular methods to environmental virology // Journal of Virological Methods. 2019. No. 1. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.01.008.
41. Myra N. W. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) detection of medically important *Candida* species // Journal of Microbiological Methods. 1999. Vol. 38. No. 1–2. P. 1–90. doi: 10.1016/s0167-7012(99)00079-2.
42. Widjojoatmodjo M. N., van Gennip H. G., de Smit A. J., Moormann R. J. Comparative sequence analysis of classical swine fever virus isolates from the epizootic in the Netherlands in 1997–1998 // Veterinary Microbiology. 1999. Vol. 66. No. 4. P. 291–299. doi: 10.1016/s0378-1135(99)00017-6.

43. Scuderi G., Golmohammadi M., Cubero J., López M. M., Cirvilleri G., Llop P. Development of a simplified NASBA protocol for detecting viable cells of the citrus pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri* under different treatments // Plant Pathology. 2010. Vol. 59. P. 764–772. doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02305.x.
44. Heo S. Development of a quantitative real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA) assay for early detection of apple scar skin viroid // Plant Pathology Journal. 2019. Vol. 35. No. 2. P. 164–171. doi: 10.5423/PPJ.OA.10.2018.0206.
45. Klerks M. M. Rapid and sensitive detection of apple stem pitting virus in apple trees through RNA amplification and probing with fluorescent molecular beacons // Phytopathology. 2001. Vol. 91. No. 11. P. 1085–1091. doi: 10.1094/phyto.2001.91.11.1085.
46. Szemes M., Schoen C. D. Design of molecular beacons for AmpliDet RNA assay – characterization of binding stability and probe specificity // Analytical Biochemistry. 2003. Vol. 315. No. 2. P. 189–201. doi: 10.1016/s0003-2697(02)00692-9.
47. Vaškóvá D. Real-time NASBA for detection of strawberry vein banding virus // European Journal of Plant Pathology. 2004. Vol. 110. No. 2. P. 213–221. doi: 10.1023/b:ejpp.0000015378.27255.12.
48. Zeinoddini M. Comparison between RT-PCR, NASBA and RT-LAMP methods for detection of Coxsackievirus B3 // Biomacromolecular Journal. 2017. Vol. 3. No. 2. P. 100–106.
49. Garafutdinov R. R. Rolling circle amplification as a universal method for the analysis of a wide range of biological targets // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2021. Vol. 47. P. 1172–1189. doi: 10.1134/S1068162021060078.
50. Zhou X. Practical method for detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Scedosporium* spp. by use of rolling-circle amplification // Journal of Clinical Microbiology. 2008. Vol. 46. No. 7. P. 2423–2427. doi: 10.1128/jcm.00420-08.
51. Kong F. Rapid identification and differentiation of *Trichophyton* species, based on sequence polymorphisms of the ribosomal internal transcribed spacer regions, by rolling-circle amplification // Journal of Clinical Microbiology. 2008. Vol. 46. No. 4. P. 1192–1199. doi: 10.1128/JCM.02235-07.
52. Tong Z. A practical method for subtyping of *Streptococcus agalactiae* serotype III, of human origin, using rolling circle amplification // Journal of Microbiological Methods. 2007. Vol. 70. No. 1. P. 1–44. doi: 10.1016/j.mimet.2007.03.010.
53. Lin H. Molecular identification of *Neofabraea* species associated with bull's eye rot on apple using rolling-circle amplification of partial EF-1 α sequence // Canadian Journal of Microbiology. 2017. Vol. 64. No. 1. P. 57–68. doi: 10.1139/cjm-2017-0448.
54. Davari M. Rapid identification of *Fusarium graminearum* species complex using rolling circle amplification (RCA) // Journal of Microbiological Methods. 2012. Vol. 89. No. 1. P. 1–70. doi: 10.1016/j.mimet.2012.01.017.
55. Liu Y. SHERLOCK system // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2023. Vol. 71. No. 11. P. 4736–4744. doi: 10.1021/acs.jafc.2c07965.
56. Курбатов Л. К. Применение системы Detectr для селективного детектирования бактериального фитопатогена *Dickeya solani* с использованием рекомбинантной CRISPR-нуклеазы Cas12a, полученной методом одностадийной хроматографической очистки // Прикладная биохимия и микробиология. 2024. Т. 60. № 1. С. 20–28. doi: 10.31857/S0555109924010025.
57. Shi Y. CRISPR/Cas12a-Enhanced loop-mediated isothermal amplification for the visual detection of *Shigella flexneri* // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2022. Vol. 10. P. 845688. doi: 10.3389/fbioe.2022.845688.
58. Zhou Z. A multiplex RPA coupled with CRISPR-Cas12a system for rapid and cost-effective identification of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* // Frontiers in Microbiology. 2024. Vol. 15. P. 1359976. doi: 10.3389/fmicb.2024.1359976.
59. Mao Z. CRISPR/CAS13A analysis based on NASBA amplification for norovirus detection // Talanta. 2024. Vol. 280. P. 126725. doi: 10.1016/j.talanta.2024.126725.

60. Sun X. Rapid and sensitive detection of two fungal pathogens in soybeans using the recombinase polymerase amplification/CRISPR-Cas12a method for potential on-site disease diagnosis // Pest Management Science. 2023. Vol. 80. No. 3. P. 1168–1181. doi: 10.1002/ps.7847.
61. Xu X. Molecular detection of *Phytophthora cinnamomi* by RPA-CRISPR/Cas12a mediated isothermal amplification // Forests. 2024. Vol. 15. P. 772. doi: 10.3390/f15050772.
62. Guo Y. RPA-CRISPR/Cas12a mediated isothermal amplification for visual detection of *Phytophthora sojae* // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2023. Vol. 13. P. 1208837. doi: 10.3389/fcimb.2023.1208837.
63. Dong J. Comparative evaluation of PCR-Based, LAMP and RPA-CRISPR/Cas12a assays for the rapid detection of *Diaporthe aspalathii* // International Journal of Molecular Sciences. 2024. Vol. 25. No. 11. P. 5773. doi: 10.3390/ijms25115773.
64. Leinberger D. M. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses // Journal of Clinical Microbiology. 2005. Vol. 43. No. 10. P. 4943–4953. doi: 10.1128/JCM.43.10.4943-4953.2005.
65. Li D. DNA microarrays // Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics. 2008. No. 1. P. 391–396. doi: 10.1007/978-0-387-48998-8_350.
66. Krawczyk K. DNA microarray-based detection and identification of bacterial and viral pathogens of maize // Journal of Plant Diseases and Protection. 2017. Vol. 124. No. 6. P. 577–583. doi: 10.1007/s41348-017-0098-4.
67. Tiberini A., Barba M. Optimization and improvement of oligonucleotide microarray-based detection of tomato viruses and pospiviroids // Journal of Virological Methods. 2012. Vol. 185. No. 1. P. 43–51. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.05.028.
68. Nam M. Development of the large-scale oligonucleotide chip for the diagnosis of plant viruses and its practical use // Plant Pathology Journal. 2014. Vol. 30. No. 1. P. 51–57. doi: 10.5423/PPJ.OA.08.2013.0084.
69. Hao K. RNA-seq analysis of the response of plant-pathogenic oomycete *Phytophthora parasitica* to the fungicide dimethomorph // Revista Argentina de Microbiología. 2019. Vol. 51. No. 3. P. 268–277. doi: 10.1016/j.ram.2018.08.007.
70. Haegeman A. Looking beyond virus detection in RNA sequencing data: Lessons learned from a community-based effort to detect cellular plant pathogens and pests // Plants. 2023. Vol. 12. No. 11. P. 2139. doi: 10.3390/plants12112139.
71. Elmore M., Groves C., Hajimorad M. Detection and discovery of plant viruses in soybean by metagenomic sequencing // Virology Journal. 2022. Vol. 19. No. 1. P. 149. doi: 10.1186/s12985-022-01872-5.
72. Hu X. PhytoPipe: a phytosanitary pipeline for plant pathogen detection and diagnosis using RNA-seq data // BMC Bioinformatics. 2023. Vol. 24. P. 470. doi: 10.1186/s12859-023-05589-2.
73. Liebhoff A. M. Pathogen detection in RNA-seq data with Pathonoia // BMC Bioinformatics. 2023. Vol. 24. P. 53. doi: 10.1186/s12859-023-05144-z.
74. Fondevilla S. In planta identification of putative pathogenicity factors from the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei* by de novo transcriptome sequencing using RNA-Seq and massive analysis of cDNA ends // Frontiers in Microbiology. 2015. Vol. 6. P. 1329. doi: 10.3389/fmicb.2015.01329.
75. Chalupowicz L. Diagnosis of plant diseases using Nanopore sequencing platform // Plant Pathology. 2018. Vol. 68. No. 2. doi: 10.1111/ppa.12957.

References

1. Bandara A. Y., Weerasooriya D. K., Bradley C. A., Allen T. W., Esker P. D. Dissecting the economic impact of soybean diseases in the United States over two decades. PLOS ONE, 2020;15;4:e0231141. doi: 10.1371/journal.pone.0231141.
2. Bradley C. A., Allen T. C., Sisson A. J. Soybean yield loss estimates due to diseases in the United States and Ontario, Canada from 2015–2019. Plant Health Progress, 2021;1:483–495.

3. Hossain M. M., Sultana F., Yesmin L. Understanding *Phakopsora pachyrhizi* in soybean: comprehensive insights, threats, and interventions from the Asian perspective. *Frontiers in Microbiology*, 2024;14:1304205. doi: 10.3389/fmicb.2023.1304205.
4. Lukomets V. M., Piven V. T., Kochegura A. V. Diseases, pests and weeds on soybean crops in the Krasnodar Territory and measures to control them. *Maslichnye kul'tury*, 2007;1(136): 66–75. EDN JVYMXP (in Russ.).
5. Gomzhina M., Gasich E., Gannibal P. Cercospora species associated with soybean diseases in Russia. *Mycological Progress*, 2024;23. doi: 10.1007/s11557-024-01960-6.
6. Kuzmin A. A. Features of the spread of soybean diseases in the Amur region. *Dal'nevostochnyi agrarnyi vestnik*, 2023;2:31–44. doi: 10.22450/19996837_2023_2_31. EDN YTZCMR (in Russ.).
7. Liu H. Response of soil fungal community structure to long-term continuous soybean cropping. *Frontiers in Microbiology*, 2019;9. doi: 10.3389/fmicb.2018.03316.
8. Hartman G. L., Rupe J. C., Sikora E. J. (Eds.). *Compendium of soybean diseases and pests*, St. Paul, MN, APS Press, 2015.
9. Lin H.-A., Villamil M. B., Mideros S. X. Characterization of *Septoria brown spot* disease development and yield effects on soybean in Illinois. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2021; 43:62–72. doi: 10.1080/07060661.2020.1755366.
10. Mian M. A. R., Boerma H. R., Phillips D. V. Performance of frogeye leaf spot-resistance and susceptible near-isolines of soybean. *Plant Disease*, 1998;82:1017–1021.
11. Cruz C. D., Dorrance A. E. Characterization and survival of *Cercospora sojina* in Ohio. *Plant Health Progress*, 2009;10:17. <https://doi.org/10.1094/PHP-2009-0512-03-RS>.
12. Barro J. P., Neves D. L., Del Ponte E. M. Frogeye leaf spot caused by *Cercospora sojina*: A review. *Tropical Plant Pathology*, 2023;48:363–374. doi: 10.1007/s40858-023-00583-8.
13. Daub M. E., Hangarter R. P. Light-induced production of singlet oxygen and superoxide by the fungal toxin, cercosporin. *Plant Physiology*, 1983;73:855–857. doi: 10.1104/pp.73.3.855.
14. Cai G., Schneider R. Population structure of *Cercospora kikuchii*, the causal agent of Cercospora leaf blight and Purple Seed Stain in soybean. *Phytopathology*, 2008;98:823–829. doi: 10.1094/PHYTO-98-7-0823.
15. Wrather J. A., Koenning S. R., Anderson T. R. Effect of diseases on soybean yields in the United States and Ontario (1999–2002). *Plant Health Progress*, 2003;4;1:24. doi: 10.1094/PHP-2003-0325-01-RV.
16. Antonissen G., Martel A., Pasmans F. The impact of Fusarium mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. *Toxins*, 2014;6:430–452. doi: 10.3390/toxins6020430.
17. Hosseini B., Voegele R. T., Link T. I. Diagnosis of soybean diseases caused by fungal and oomycete pathogens: Existing methods and new developments. *Journal of Fungi*, 2023;9;5: 587. doi: 10.3390/jof9050587.
18. Hariharan G., Prasannath K. Recent advances in molecular diagnostics of fungal plant pathogens: A mini review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021;10:600234. doi: 10.3389/fcimb.2020.600234.
19. Luo X. Genome sequencing and comparative genomics reveal the potential pathogenic mechanism of *Cercospora sojina* on soybean. *DNA Research*, 2018;25;1:25–37. doi: 10.1093/dnaregs/dsx035.
20. Gu X. Comparative genomics and association analysis identifies virulence genes of *Cercospora sojina* in soybean. *BMC Genomics*, 2020;21;1:172. doi: 10.1186/s12864-020-6581-5.
21. Shrestha S. K. Genetic diversity, QoI fungicide resistance, and mating type distribution of *Cercospora sojina* – Implications for the disease dynamics of frogeye leaf spot on soybean. *PLOS One*, 2017;12;5:e0177220. doi: 10.1371/journal.pone.0177220.
22. Kashiwa T., Suzuki T. High-quality genome assembly of the soybean fungal pathogen *Cercospora kikuchii*. *G3 (Bethesda)*, 2021;11;10. doi: 10.1093/g3journal/jkab277.

23. Borah N., Albarouki E., Schirawski J. Comparative methods for molecular determination of host-specificity factors in plant-pathogenic fungi. International Journal of Molecular Sciences, 2018;19;3:863. doi: 10.3390/ijms19030863.
24. Lin H.-A., Mideros S. X. The effect of *Septoria glycines* and fungicide application on the soybean phyllosphere mycobiome. Phytobiomes Journal, 2023;7;2:220–232. doi: 10.1094/pbiomes-12-21-0075-r.
25. Neves D. L. Identification of *Septoria glycines* isolates from soybean with resistance to quinone outside inhibitor fungicides. Plant Disease, 2022;106;10:2631–2637. doi: 10.1094/pdis-08-21-1836-re.
26. Verkley G. J. A new approach to species delimitation in *Septoria*. Studies in Mycology, 2013;75;1:213–305. doi: 10.3114/sim0018.
27. Capote N., Pastrana A. M., Aguado A. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. In.: Plant Pathology, Intech Open, 2012. doi: 10.5772/38011.
28. Lobato I. M., O'Sullivan C. K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. Trends in Analytical Chemistry, 2018;98:19–35. doi: 10.1016/j.trac.2017.10.015.
29. Fuller S. L. Isothermal amplification and lateral-flow assay for detecting crown-gall-causing *Agrobacterium* spp. Phytopathology, 2017;107;9:1062–1068. doi: 10.1094/phyto-04-17-0144-r.
30. Wu L. Utilization of recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow strip for detection of *Perkinsus beihaiensis* in the oyster *Crassostrea hongkongensis*. Parasites & Vectors, 2019;12;1. doi: 10.1186/s13071-019-3624-3.
31. Rojas J. A. Development and application of qPCR and RPA genus- and species-specific detection of *Phytophthora sojae* and *P. sansomeana* root rot pathogens of soybean. Plant Disease, 2017;101;7:1171–1181. doi: 10.1094/pdis-09-16-1225-re.
32. Wong Y. P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. Journal of Applied Microbiology, 2018;124;3:626–643. doi: 10.1111/jam.13647.
33. Yasuhara-Bell J. Specific detection of the wheat blast pathogen (*Magnaporthe oryzae Triticum*) by loop-mediated isothermal amplification. Plant Disease, 2018;102;12:2550–2559. doi: 10.1094/PDIS-03-18-0512-RE.
34. Gomez-Gutierrez S. V., Goodwin S. B. Loop-mediated isothermal amplification for detection of plant pathogens in wheat (*Triticum aestivum*). Frontiers in Plant Science, 2022;13: 857673. doi: 10.3389/fpls.2022.857673.
35. Siegieda D. G. "Shining a LAMP" (Loop-Mediated Isothermal Amplification) on the molecular detection of phytopathogens *Phytophthora* spp. and *Phytophthora cactorum* in strawberry fields. Pathogens, 2021;10;11:1453. doi: 10.3390/pathogens10111453.
36. Deng S. LAMP assay for distinguishing *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* in lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizomes. Plant Disease, 2022;106;1:231–246. doi: 10.1094/pdis-06-21-1223-re.
37. Akhmetzianov L. U. Computer program for primer design for Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Advanced Engineering Research, 2024;24;1:98–108. doi: 10.23947/2687-1653-2024-24-1-98-108.
38. Becherer L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. Analytical Methods, 2020;12;6:717–746. doi: 10.1039/c9ay02246e.
39. Garafutdinov R. R. LAMP amplification of nucleic acids. I. Two decades of development and improvement. Biomics, 2021;13;2:176–226. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-14.
40. Hamza I. A., Bibby K. Critical issues in application of molecular methods to environmental virology. Journal of Virological Methods, 2019;1. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.01.008.

41. Myra N. W. Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) detection of medically important *Candida* species. *Journal of Microbiological Methods*, 1999;38;1–2:1–90. doi: 10.1016/s0167-7012(99)00079-2.
42. Widjojoatmodjo M. N., van Gennip H. G., de Smit A. J., Moormann R. J. Comparative sequence analysis of classical swine fever virus isolates from the epizootic in the Netherlands in 1997–1998. *Veterinary Microbiology*, 1999;66;4:291–299. doi: 10.1016/s0378-1135(99)00017-6.
43. Scuderi G., Golmohammadi M., Cubero J., López M. M., Cirvilleri G., Llop P. Development of a simplified NASBA protocol for detecting viable cells of the citrus pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri* under different treatments. *Plant Pathology*, 2010;59:764–772. doi: 10.1111/j.1365-3059.2010.02305.x.
44. Heo S. Development of a quantitative real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA) assay for early detection of apple scar skin viroid. *Plant Pathology Journal*, 2019;35;2: 164–171. doi: 10.5423/PPJ.OA.10.2018.0206.
45. Klerks M. M. Rapid and sensitive detection of apple stem pitting virus in apple trees through RNA amplification and probing with fluorescent molecular beacons. *Phytopathology*, 2001;91;11:1085–1091. doi: 10.1094/phyto.2001.91.11.1085.
46. Szemes M., Schoen C. D. Design of molecular beacons for AmpliDet RNA assay – characterization of binding stability and probe specificity. *Analytical Biochemistry*, 2003;315;2: 189–201. doi: 10.1016/s0003-2697(02)00692-9.
47. Vaškóvá D. Real-time NASBA for detection of strawberry vein banding virus. *European Journal of Plant Pathology*, 2004;110;2:213–221. doi: 10.1023/b:ejpp.0000015378.27255.12.
48. Zeinoddini M. Comparison between RT-PCR, NASBA and RT-LAMP methods for detection of Coxsackievirus B3. *Biomacromolecular Journal*, 2017;3;2:100–106.
49. Garafutdinov R. R. Rolling circle amplification as a universal method for the analysis of a wide range of biological targets. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2021;47:1172–1189. doi: 10.1134/S1068162021060078.
50. Zhou X. Practical method for detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Scedosporium* spp. by use of rolling-circle amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008; 46;7:2423–2427. doi: 10.1128/jcm.00420-08.
51. Kong F. Rapid identification and differentiation of *Trichophyton* species, based on sequence polymorphisms of the ribosomal internal transcribed spacer regions, by rolling-circle amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008;46;4:1192–1199. doi: 10.1128/JCM.02235-07.
52. Tong Z. A practical method for subtyping of *Streptococcus agalactiae* serotype III, of human origin, using rolling circle amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 2007;70;1: 1–44. doi: 10.1016/j.mimet.2007.03.010.
53. Lin H. Molecular identification of *Neofabraea* species associated with bull's eye rot on apple using rolling-circle amplification of partial EF-1 α sequence. *Canadian Journal of Microbiology*, 2017;64;1:57–68. doi: 10.1139/cjm-2017-0448.
54. Davari M. Rapid identification of *Fusarium graminearum* species complex using rolling circle amplification (RCA). *Journal of Microbiological Methods*, 2012;89;1:1–70. doi: 10.1016/j.mimet.2012.01.017.
55. Liu Y. SHERLOCK system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2023;71;11: 4736–4744. doi: 10.1021/acs.jafc.2c07965.
56. Kurbatov L. K. Application of the Detectr system for the selective detection of the bacterial phytopathogen *Dickeya solani* using recombinant CRISPR nuclease Cas12a, obtained by single-stage chromatographic purification. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 2024;60;1: 20–28. doi: 10.31857/S0555109924010025 (in Russ.).
57. Shi Y. CRISPR/Cas12a-Enhanced loop-mediated isothermal amplification for the visual detection of *Shigella flexneri*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022;10:845688. doi: 10.3389/fbioe.2022.845688.
58. Zhou Z. A multiplex RPA coupled with CRISPR-Cas12a system for rapid and cost-effective identification of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 2024; 15:1359976. doi: 10.3389/fmicb.2024.1359976.

59. Mao Z. CRISPR/CAS13A analysis based on NASBA amplification for norovirus detection. *Talanta*, 2024;280:126725. doi: 10.1016/j.talanta.2024.126725.
60. Sun X. Rapid and sensitive detection of two fungal pathogens in soybeans using the recombinase polymerase amplification/CRISPR-Cas12a method for potential on-site disease diagnosis. *Pest Management Science*, 2023;80;3:1168–1181. doi: 10.1002/ps.7847.
61. Xu X. Molecular detection of *Phytophthora cinnamomi* by RPA-CRISPR/Cas12a mediated isothermal amplification. *Forests*, 2024;15:772. doi: 10.3390/f15050772.
62. Guo Y. RPA-CRISPR/Cas12a mediated isothermal amplification for visual detection of *Phytophthora sojae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023;13:1208837. doi: 10.3389/fcimb.2023.1208837.
63. Dong J. Comparative evaluation of PCR-Based, LAMP and RPA-CRISPR/Cas12a assays for the rapid detection of *Diaporthe aspalathi*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024;25;11:5773. doi: 10.3390/ijms25115773.
64. Leinberger D. M. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005;43;10: 4943–4953. doi: 10.1128/JCM.43.10.4943-4953.2005.
65. Li D. DNA microarrays. *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, 2008;1:391–396. doi: 10.1007/978-0-387-48998-8_350.
66. Krawczyk K. DNA microarray-based detection and identification of bacterial and viral pathogens of maize. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2017;124;6:577–583. doi: 10.1007/s41348-017-0098-4.
67. Tiberini A., Barba M. Optimization and improvement of oligonucleotide microarray-based detection of tomato viruses and pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 2012;185;1: 43–51. doi: 10.1016/j.jviromet.2012.05.028.
68. Nam M. Development of the large-scale oligonucleotide chip for the diagnosis of plant viruses and its practical use. *Plant Pathology Journal*, 2014;30;1:51–57. doi: 10.5423/PPJ.OA.08.2013.0084.
69. Hao K. RNA-seq analysis of the response of plant-pathogenic oomycete *Phytophthora parasitica* to the fungicide dimethomorph. *Revista Argentina de Microbiología*, 2019;51;3:268–277. doi: 10.1016/j.ram.2018.08.007.
70. Haegeman A. Looking beyond virus detection in RNA sequencing data: Lessons learned from a community-based effort to detect cellular plant pathogens and pests. *Plants*, 2023;12;11: 2139. doi: 10.3390/plants12112139.
71. Elmore M., Groves C., Hajimorad M. Detection and discovery of plant viruses in soybean by metagenomic sequencing. *Virology Journal*, 2022;19;1:149. doi: 10.1186/s12985-022-01872-5.
72. Hu X. PhytoPipe: a phytosanitary pipeline for plant pathogen detection and diagnosis using RNA-seq data. *BMC Bioinformatics*, 2023;24:470. doi: 10.1186/s12859-023-05589-2.
73. Liebhoff A. M. Pathogen detection in RNA-seq data with Pathonoia. *BMC Bioinformatics*, 2023;24:53. doi: 10.1186/s12859-023-05144-z.
74. Fondevilla S. In planta identification of putative pathogenicity factors from the chickpea pathogen *Ascochyta rabiei* by de novo transcriptome sequencing using RNA-Seq and massive analysis of cDNA ends. *Frontiers in Microbiology*, 2015;6:1329. doi: 10.3389/fmicb.2015.01329.
75. Chalupowicz L. Diagnosis of plant diseases using Nanopore sequencing platform. *Plant Pathology*, 2018;68:2. doi: 10.1111/ppa.12957.

© Тимкин П. Д., Пензин А. А., 2025

Статья поступила в редакцию 01.08.2025; одобрена после рецензирования 29.08.2025; принята к публикации 15.09.2025.

The article was submitted 01.08.2025; approved after reviewing 29.08.2025; accepted for publication 15.09.2025.

Информация об авторах

Тимкин Павел Дмитриевич, младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии, Всероссийский научно-исследовательский институт сои, ORCID: 0000-0001-6655-1049, Author ID: 1163926, tpd@vniisoi.ru;

Пензин Андрей Андреевич, кандидат сельскохозяйственных наук, научный сотрудник, заведующий лабораторией биотехнологии, Всероссийский научно-исследовательский институт сои, ORCID: 0000-0002-8578-9818, Author ID: 1065486, paa@vniisoi.ru

Information about the authors

Pavel D. Timkin, Junior Researcher of the Biotechnology Laboratory, All-Russian Scientific Research Institute of Soybean, ORCID: 0000-0001-6655-1049, Author ID: 1163926, tpd@vniisoi.ru;

Andrey A. Penzin, Candidate of Agricultural Sciences, Researcher, Head of the Biotechnology Laboratory, All-Russian Scientific Research Institute of Soybean, ORCID: 0000-0002-8578-9818, Author ID: 1065486, paa@vniisoi.ru

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.
The authors declare no conflicts of interests.