

Рябина (*Sorbus* spp.) как потенциальное растение – хозяин возбудителя бактериального ожога плодовых культур (*Erwinia amylovora*) в Российской Федерации

Н.В. ДРЕНОВА¹, М.О. КОНДРАТЬЕВ², А.А. ХАРЧЕНКО³, Ю.С. ЦЫМБАЛ⁴, Е.А. СУХОЛОЗОВА⁵, Н.А. КВАШНИНА⁶, Ф.С. ДЖАЛИЛОВ⁷

^{1, 2} ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия

^{3, 4} Воронежский филиал ФГБУ «ВНИИКР», г. Воронеж, Россия

⁵ Пензенский филиал ФГБУ «ВНИИКР», г. Пенза, Россия

⁶ Пятигорский филиал ФГБУ «ВНИИКР», г. Пятигорск, Россия

⁷ ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева», г. Москва, Россия

¹ ORCID 0000-0003-4020-2910, e-mail: drenova@mail.ru

² e-mail: affut24@rambler.ru

³ e-mail: anzhela.vrn@gmail.com

⁴ e-mail: vniikr-vrn.dir@yandex.ru

⁵ e-mail: penzavniikr@mail.ru

⁶ e-mail: ank-077@mail.ru

⁷ ORCID 0000-0002-5014-8375, e-mail: labzara@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Представители рода *Sorbus* sensu lato (Рябина) – известные и достаточно широко распространенные растения – хозяева бактериального ожога плодовых культур *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. Однако до настоящего времени официально подтвержденных данных о выявлении возбудителя на рябине в Российской Федерации не было. В данной работе проведено обследование насаждений *Sorbus aucuparia* L. и культурных сортов рябины в 7 регионах европейской части России. Сборные образцы и пробы различных частей растений проанализированы с помощью 4 тестов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), методом секвенирования, а также культурально-морфологическим методом. Достоверно выявлена ДНК возбудителя в г. Москве и Московской области. Изучена динамика развития патогена в различных частях растений рябины в течение

Mountain-Ash (*Sorbus* spp.) as a Potential Host Plant of Fire Blight (*Erwinia amylovora*) in the Russian Federation

N.V. DRENOVA¹, M.O. KONDRATYEV², A.A. KHARCHENKO³, YU.S. TSYMBAL⁴, E.A. SUKHOLOZOVA⁵, N.A. KVASHNINA⁶, F.S. DZHALILOV⁷

^{1, 2} All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU “VNIIKR”), Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia

^{3, 4} Voronezh branch of FGBU “VNIIKR”, Voronezh, Russia

⁵ Penza branch of FGBU “VNIIKR”, Penza, Russia

⁶ Pyatigorsk branch of FGBU “VNIIKR”, Pyatigorsk, Russia

⁷ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

¹ ORCID 0000-0003-4020-2910, e-mail: drenova@mail.ru

² e-mail: affut24@rambler.ru

³ e-mail: anzhela.vrn@gmail.com

⁴ e-mail: vniikr-vrn.dir@yandex.ru

⁵ e-mail: penzavniikr@mail.ru

⁶ e-mail: ank-077@mail.ru

⁷ ORCID 0000-0002-5014-8375, e-mail: labzara@mail.ru

ABSTRACT

The species of the genus *Sorbus* sensu lato (mountain-ash) are well-known and quite widespread host plants of fire blight *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. Nevertheless, there have been no officially proven data about the pest detection on the mountain-ash in the Russian Federation. This work presents the survey results of *Sorbus aucuparia* L. and cultivated varieties of mountain-ash plantations in 7 regions of the European part of Russia. The combined samples and the sub-samples of separate parts of plants have been analyzed by 4 PCR-based tests, the sequencing method, as well as the plating method. The DNA of *Erwinia amylovora* has been reliably detected in Moscow and the Moscow

вегетационного сезона. Не подтверждены сообщения об основной роли *Erwinia amylovora* в развитии некротических поражений растений рябины в Московской области.

Ключевые слова. Обследование, выявление, карантин, ДНК, ПЦР, сезонная динамика заболевания, симптом, некроз, пятнистость, увядание, растение-хозяин, антагонисты, микроорганизм, микробиота, *Pseudomonas*.

Для корреспонденции. Дренова Наталия Васильевна, начальник – старший научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», 140150, Россия, Московская обл., г. Раменское, р. п. Быково, e-mail: drenova@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Бактериальный ожог плодовых культур, вызываемый энтеробактерией *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al., имеет карантинное значение для РФ и ЕАЭС. Впервые на территории России ожог плодовых был выявлен в 2003 г. в Калининградской области, и к настоящему времени в разные годы очаги были официально зафиксированы в Белгородской, Брянской, Волгоградской, Воронежской, Калининградской, Липецкой, Пензенской, Самарской, Саратовской, Смоленской, Тамбовской, Тульской областях, в республиках Дагестан, Кабардино-Балкария, Карачаево-Черкесия, Крым, в Краснодарском и Ставропольском краях. В ходе научных исследований заболевание было выявлено в г. Москве и Орловской области, зараженные образцы были получены от граждан из Ростовской области и Республики Северная Осетия – Алания. В ряде регионов очаги удалось ликвидировать, однако в целом возбудитель продолжает распространяться [1, 2, 3, 4, 5].

Несмотря на то, что бактериальный ожог поражает более 180 видов растений семейства Rosaceae Juss. [6], в подавляющем большинстве случаи выявления в РФ приурочены к насаждениям культурных растений-хозяев: *Malus domestica* Borkh. (Яблоня домашняя), *Pyrus communis* L. (Груша обыкновенная), *Cydonia oblonga* Mill. (Айва обыкновенная), а также *Prunus domestica* L. (Слива домашняя) и *Amelanchier* sp. (Ирга), произрастающих в промышленных и частных садах и питомниках. Подобная тенденция прослеживается и в странах бывшего СССР [7, 8, 9, 10, 11]. По мнению авторов, это обусловлено несколькими причинами: занос и распространение возбудителя происходят преимущественно с зараженным посадочным материалом; растения-хозяева в культурных насаждениях скученны, что приводит к быстрому распространению инфекции; хозяйственно значимые насаждения лучше обследуются как самими садоводами, так и уполномоченными подразделениями Россельхознадзора. В связи с этим дикорастущие, декоративные и менее поражаемые растения – хозяева бактериального ожога

region. The dynamics of pathogen development in various parts of mountain-ash plants during the growing season has been studied. The reports on the main role of *Erwinia amylovora* in the development of necrotic damage of mountain-ash plants in the Moscow region have not been confirmed.

Key words. Survey, detection, quarantine, DNA, PCR, seasonal dynamics of the disease, symptom, necrosis, spots, wilting, host plant, antagonists, microorganism, microbiota, *Pseudomonas*.

For correspondence. Nataliya Drenova, Head and Senior Researcher of Virology and Bacteriology Research and Methodology Department, FGBU “VNIIKR”, 140150, Russia, Moscow region, Ramenskoye, Bykovo, Pogranichnaya str. 32, e-mail: drenova@mail.ru.

INTRODUCTION

Fire blight caused by the enterobacterium *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. is considered to be a quarantine one for the Russian Federation and the EAEU. Fire blight was first detected in Russia in 2003 in Kaliningrad region, and by now in different years foci have been officially registered in Belgorod, Bryansk, Volgograd, Voronezh, Kaliningrad, Lipetsk, Penza, Samara, Saratov, Smolensk, Tambov, Tula regions, in the republics of Dagestan, Kabardino-Balkaria, Karachay-Cherkessia, Crimea, in Krasnodar Krai and Stavropol Krai. In the course of scientific research, the disease has been detected in Moscow and the Oryol region, infected samples were obtained from citizens of Rostov region and the Republic of North Ossetia-Alania. In some regions, the foci were eliminated, but in general, the pathogen continues to spread [1, 2, 3, 4, 5].

Despite the fact that fire blight damages over 180 species of the family Rosaceae Juss. [6], in most cases detections in Russia were connected with cultivated host plants: *Malus domestica* Borkh. (apple), *Pyrus communis* L. (pear), *Cydonia oblonga* Mill. (quince), as well as *Prunus domestica* L. (plum) and *Amelanchier* sp. (junberry) growing in industrial and private gardens and nurseries. A similar trend can be seen in the former USSR countries [7, 8, 9, 10, 11]. In our opinion, this is accounted for by several reasons: the pest introduction and spreading primarily occur with infected plants for planting; host plants in cultivated areas grow densely, which leads to a rapid spread of the infection; economically significant plantations are better inspected both by the gardeners themselves and by the authorized divisions of the Rosselkhoz nadzor. In this regard, wild, ornamental and less affected host plants of the fire blight remain poorly studied. Meanwhile, host plants growing in forests, on wastelands and fallow lands, in uncontrolled plantings of forest belts and settlements

остаются малоизученными. Между тем растения-хозяева, произрастающие в лесах, на пустырях и залежах, в малоконтролируемых насаждениях лесополос и населенных пунктов, активно посещаются насекомыми (особенно в период цветения), служат местами отдыха птиц и их кормления; не подвергаясь защитным мероприятиям, могут накапливать инфекцию и служить ее источником для окружающих агроценозов.

Среди дикорастущих и декоративных растений-хозяев особую роль в распространении *E. amylovora* играют представители рода *Crataegus* Tourn. ex L. (Боярышник). В силу своей высокой восприимчивости к ожогу, а также способности хорошо восстанавливать крону и долгое время сохранять в пораженных тканях жизнеспособного возбудителя, боярышники являются признанными резерваторами *E. amylovora* [6, 12, 13, 14, 15, 16, 17]. На территории РФ бактериальный ожогом часто поражается *Crataegus monogyna* Jacq. (Боярышник однопестичный), широко распространенный в Калининградской области, а также встречающийся в центральных и южных регионах европейской части России и в Поволжье [18].

Другими широко распространенными растениями – хозяевами бактериального ожога являются виды рода *Sorbus* L. (Рябина). Род *Sorbus* sensu lato представлен листопадными деревьями и кустарниками, включает около 100 видов и множество гибридных форм (эти виды и гибриды распространены в умеренном поясе Северного полушария) [19]. В 2017 г. на основании новейших филогенетических исследований была проведена ревизия европейских видов рода, в результате чего было выделено 5 негибридных родов, представляющих отдельные эволюционные линии (*Aria* (Pers.) Host, *Chamaemespilus* Medik., *Cormus* Spach, *Sorbus* L., *Torminalis* Medik.), а также 5 гибридогенных родов, в общей сложности включающих 201 вид диплоидных и апомиктных видов и гибридов [20]. В 2018 г. *S. intermedia* (Ehrh.) Pers. и ее гибрид с *S. aucuparia* L. были выделены в новый род *Scandosorbus* Sennikov [21].

На территории европейской части РФ наиболее широко распространена *S. aucuparia* L. (Рябина обыкновенная); *S. sibirica* Hedl., или *S. aucuparia* ssp. *sibirica* (Hedl.) Krylov (Рябина сибирская), преобладает от северо-восточных территорий европейской части до юго-восточных территорий Дальнего Востока [22]. На Кавказе, в Республике Крым, а также в регионах Крайнего Севера и Дальнего Востока встречаются местные, в т. ч. реликтовые, виды и формы [22, 23, 24].

Представители рода *Sorbus* sensu lato достаточно долговечны (до 200–300 лет), начинают плодоносить в 10–12-летнем возрасте. В природе размножаются семенами. При вырубке или повреждении надземной части дают обильную поросль и корневые отпрыски. Цветочные почки закладываются осенью, растения трогаются в рост и цветут рано, плодоносят практически ежегодно [22].

Рябина – ценное плодовое и декоративное растение, в культуру введено не менее 14 видов, имеет много садовых форм и сортов. Виды рябины зимостойки и засухоустойчивы, неприхотливы к почвам, избегают лишь заболоченных, чрезмерно сухих и засоленных. Светолюбивы, но выдерживают

are actively visited by insects (especially during flowering), serve as resting and feeding places for birds; without being exposed to protective measures, can accumulate infection and serve as its source for the surrounding agrocenoses.

Among wild and ornamental host plants, the representatives of the genus *Crataegus* Tourn. ex L. (hawthorn) play a special role in the spreading of *E. amylovora*. Due to their high susceptibility to fire blight, as well as the ability to regenerate and keep a viable pathogen in the affected tissues for a long time, hawthorns are recognized as *E. amylovora* reservators [6, 12, 13, 14, 15, 16, 17]. In Russia, fire blight often affects *Crataegus monogyna* Jacq. (common hawthorn) which is widespread in Kaliningrad region, and occurs in the central and southern regions of the European part of Russia and the Volga region [18].

Other widespread host plants of fire blight are *Sorbus* L. spp. (mountain-ash). The genus *Sorbus* sensu lato is represented by deciduous trees and shrubs and includes about 100 species and many hybrid forms (these species and hybrids are common in the temperate zone of the Northern Hemisphere) [19]. In 2017, based on the latest phylogenetic studies, a revision of European species of the genus was carried out, as a result 5 non-hybrid genera were identified, representing separate evolutionary lines (*Aria* (Pers.) Host, *Chamaemespilus* Medik., *Cormus* Spach, *Sorbus* L., *Torminalis* Medik.), as well as 5 hybridogenic genera, a total of 201 species of diploid and apomictic species and hybrids [20]. In 2018, *S. intermedia* (Ehrh.) Pers. and its hybrid with *S. aucuparia* L. were classified as a new genus *Scandosorbus* Sennikov [21].

In the European part of the Russian Federation, the most widespread is *S. aucuparia* L. (mountain-ash); *S. sibirica* Hedl., or *S. aucuparia* ssp. *sibirica* (Hedl.) Krylov (Siberian mountain-ash), prevails from the north-eastern territories of the European part to the south-eastern territories of the Far East [22]. There are local, including relict, species and forms in the Caucasus, the Republic of Crimea, as well as in the regions of the Far North and the Far East [22, 23, 24].

The plants of genus *Sorbus* sensu lato are quite longevous (up to 200–300 years), begin to bear fruit at the age of 10–12. In nature, they reproduce by seeds. When cutting down or damaging the aboveground part, they give abundant shoots and root stalks. Flower buds are laid in autumn, plants start to grow and bloom early, bear fruit almost every year [22].

Mountain-ash is a valuable fruit and ornamental plant, at least 14 species have been introduced into the culture, it has many garden forms and varieties. Mountain-ash species are winter-hardy and drought-resistant, unpretentious to soils, avoid only swampy, excessively dry and saline soils. They are light-demanding, but withstand shading, therefore they can grow both in open habitats and in the 2nd forest storey, and in the undergrowth. Due to its high ecological plasticity, mountain-ash is widely used in urban landscaping and in the creation of forest shelter belts in the steppe zone [19]. Mountain-ashes are used as rootstock for pears, as well as in intergeneric selection of some pomaceous

затенение, поэтому могут расти как на открытых местообитаниях, так и в 2-м ярусе леса, и в подлеске. В связи с высокой экологической пластичностью рябины широко используют в городском озеленении и при создании лесозащитных полос в степной зоне [19]. Рябины используют в качестве подвоя для груши, а также в межродовой селекции семечковых культур. Плоды – ценное сырье для пищевой и фармакологической промышленности. Они служат важным пищевым ресурсом для многих видов птиц [22].

Бактериальный ожог на видах рода *Sorbus* неоднократно выявлялся в разных странах мира. На родине бактериального ожога в США van der Zwet описывает обычные симптомы на рябине как побурение и мумификацию листьев, остающихся на побегах [6].

В 1995 г. в коллекционных насаждениях в штате Нью-Джерси на азиатских видах *S. folgneri* (C. Schneider) Rehd. и *S. alnifolia* (Siebold & Zucc.) Koch был отмечен ожог в форме типичного увядания побегов, называемого «пастуший посох» [25].

В Старом Свете первое выявление бактериального ожога на рябине относится к 1959 г. Заболевание было отмечено на *S. aucuparia* и *S. aria* (L.) Crantz (Рябина круглолистная, или мучнистая) в Великобритании [26]. Таким образом, возбудитель колонизировал рябину вскоре после его первого обнаружения в 1957 г. на плодовых культурах, завезенных из США [6].

В последующем на рябине заболевание выявляли в 1986 г. в Ирландии, в 1991 г. в Италии, в 1994 и 1996 гг. на *S. aucuparia* во Франции [27], на *S. aria* в 1996 г. в Венгрии [28], в Австрии в 2001 г. на *S. aria* и в 2003-м на *S. aucuparia* [29], в 2002 г. в Нидерландах [30], в 2004 г. в Бельгии [31], в 2005 г. в Швейцарии [32].

В 2005 г. симптомы листового ожога, а также некрозы и язвы на коре побегов с красновато-бурым окрашиванием пораженных тканей были отмечены на *Sorbus* spp. в Республике Сербия. Возбудитель был идентифицирован как *E. amylovora*. Авторы провели инокуляцию черешков и побегов рябины суспензиями выделенных изолятов и получили типичные симптомы бактериального ожога [33]. В 2012 г. в Турции был выявлен ожог с симптомами некротического поражения побегов и листьев [34]. Новая плазида pEA68 *E. amylovora* была обнаружена у изолята, выделенного с рябины в Республике Польша [35]. Сообщается о неоднократном выявлении возбудителя на рябине в Киевской области (Украина) [9]. В 2011 г. при проведении сертификации польских питомников сотрудниками Всероссийского центра карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР») было выявлено растение рябины с симптомами увядания побегов, некроза соплодия и соседних листьев, с выделением бактериального экссудата. При проведении лабораторного исследования образца был изолирован возбудитель, идентифицированный как *E. amylovora*.

В 2000 г. опубликовано сообщение о выделении *E. amylovora* из некрозов и язв на коре ветвей и побегов рябины в Королевском ботаническом саду Мельбурна (Австралия) [36]. В 2005 г. возбудитель выявлен на рябине в Новой Зеландии [37].

В Российской Федерации неоднократно были опубликованы сообщения о выявлении

plants. Fruits are a valuable raw material for the food and pharmaceutical industries. They serve as an important food resource for many bird species [22].

Fire blight on *Sorbus* spp. has been repeatedly detected in different countries. In the USA, the homeland of the fire blight, van der Zwet describes common symptoms on mountain-ash as browning and mummification of leaves remaining on the shoots [6].

In 1995, fire blight in the form of a typical shoot wilting called a “shepherd’s crook” was detected in collectible plantations in New Jersey on the Asian species of *S. folgneri* (C. Schneider) Rehd. and *S. alnifolia* (Siebold & Zucc.) Koch [25].

In the Old World, the first detection of a fire blight on mountain-ash dates back to 1959. The infection was noted on *S. aucuparia* and *S. aria* (L.) Crantz in Great Britain [26]. Thus, the pathogen colonized the mountain-ash shortly after its first discovery in 1957 on fruit crops imported from the United States [6].

Later, the infection was detected on mountain-ash in 1986 in Ireland, in 1991 in Italy, in 1994 and 1996 on *S. aucuparia* in France [27], on *S. aria* in 1996 in Hungary [28], in Austria in 2001 on *S. aria* and in 2003 on *S. aucuparia* [29], in 2002 in the Netherlands [30], in 2004 in Belgium [31], in 2005 in Switzerland [32].

In 2005, symptoms of leaf burn, as well as necrosis and cancers on the shoots bark with a reddish-brown discoloration of the affected tissues were detected on *Sorbus* spp. in the Republic of Serbia. The causative agent was identified as *E. amylovora*. The authors inoculated the mountain-ash petioles and shoots with suspensions of the extracted isolates and obtained typical symptoms of fire blight [33]. In 2012, fire blight with symptoms of necrotic damage to shoots and leaves was detected in Turkey [34]. The new plasmid pEA68 *E. amylovora* was detected on an isolate extracted from mountain-ash in the Republic of Poland [35]. The pathogen has been repeatedly detected on mountain-ash in Kiev region (Ukraine) [9]. In 2011, when certifying Polish nurseries, the specialists of FGBU “VNIKR” detected a mountain-ash with symptoms of shoots wilting, necrosis of infructescence and neighboring leaves, with the release of bacterial ooze. During the laboratory study of the sample, the isolated pathogen was identified as *E. amylovora*.

In 2000, the Royal Botanic Gardens in Melbourne (Australia) reported the isolation of *E. amylovora* from necrosis and cancers on the mountain-ash branches and shoots bark [36]. In 2005, the pathogen was detected on mountain-ash in New Zealand [37].

In the Russian Federation, the detection of fire blight on forest crops, including mountain-ash, has been repeatedly reported [38, 39]. However, the causative agent identification of the infection similar in symptoms to fire blight (*E. amylovora*) was based only on the use of microbiological methods (isolation, biochemical analyzes and pathogenicity test), which is not enough for the accurate identification of a quarantine pathogen, in accordance with international and Russian diagnostic Standards [40, 41, 42].

Considering the possibility of *Sorbus* spp. and other wild and ornamental host plants to be infected

Таблица 1

Сведения об образцах из Воронежской, Пензенской областей и Ставропольского края

Место отбора	Дата отбора	Кол-во	Часть растения	Симптомы	Тест
ВОРОНЕЖСКАЯ ОБЛАСТЬ					
Терновский р-н	27 мая	5	соцветия	нет	«Проба-ГС» + FLASH ООО «АгроДиагностика»
Хохольский р-н*	27 мая	4	соцветия	нет	
г. Воронеж*	3 июня	2 + 3	плодики	нет	
ПЕНЗЕНСКАЯ ОБЛАСТЬ					
Пензенский р-н	7–8 июля	2	листья	пятнистость, краевой некроз	«Проба-ГС» + FLASH ООО «АгроДиагностика»
р. п. Тамала*	4 августа	1	листья	пятнистость, краевой некроз, хлороз	
СТАВРОПОЛЬСКИЙ КРАЙ					
Железноводск*	август	3	ветви, листья, плоды	усыхание	«ФитоСорб» + ПЦР-РВ ООО «Синтол»
Пятигорск*	сентябрь	2			

* – площадь очага или буферной зоны.

бактериального ожога на лесных культурах, в т. ч. на рябине [38, 39]. Однако идентификация возбудителей заболеваний, схожих по симптомам с бактериальным ожогом плодовых культур (*E. amylovora*), была основана исключительно на использовании классических методов микробиологии (культурально-морфологических, биохимических анализах и изучении патогенности), что в соответствии с международными и российскими диагностическими стандартами недостаточно для точной идентификации карантинного патогена [40, 41, 42].

Понимая вероятность заражения растений рода *Sorbus* и других дикорастущих и декоративных растений-хозяев возбудителем бактериального ожога, авторы настоящей статьи начиная с 2003 г. периодически проводили наблюдения за их состоянием в различных регионах РФ, отбирали и тестировали образцы с использованием принятых методик [41, 42]. До последнего времени нами не было выявлено растений рябины с характерными симптомами бактериального ожога [6], проведенные тесты также были отрицательны. Однако начиная с 2017–2018 гг. в Московской области мы отмечали на *S. aucuparia* поражения, в некоторой степени схожие с симптомами, вызываемыми *E. amylovora*. Наиболее подозрительными из них были мумификация плодовых веточек, некроз отдельных завязей и молодых плодов в соплодии, некроз коры, а также пятнистости листьев. На питательные среды во многих случаях выделяли флуоресцирующие псевдомонады, которые в последние годы нередко встречаются в образцах с симптомами бактериального ожога. Однако при тестировании растительных экстрактов с помощью методов ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в отдельных случаях были получены слабые положительные реакции, соответствующие наличию единичных копий ДНК возбудителя на реакцию, или около 10²–10³ КОЕ/мл растительного экстракта, что не могло быть причиной возникновения

with fire blight, since 2003, the authors of this article have periodically monitored them in various regions of the Russian Federation, tested the samples using the accepted methods [41, 42]. So far, no mountain-ashes with the typical fire blight symptoms have been detected [6], the tests performed have also been negative. However, starting from 2017–2018 in Moscow region some symptoms similar to fire blight have been detected on *S. aucuparia*. The most suspicious of these were the mummification of peduncles, necrosis of individual ovaries and fruitlets in infructescence, necrosis of the bark, as well as leaf spot. In many cases, fluorescent pseudomonads were isolated, which have been often found in samples with symptoms of fire blight in the last years. However, when testing some plant extracts using qPCR methods, weak positive reactions were obtained, corresponding to the presence of single copies of the pathogen DNA for the reaction, or about 10²–10³ CFU/ml of the plant extract, which could not be the cause of the symptoms. During this period, there was a tendency to both an increase in symptoms in mountain-ash plants and an increase in the signal level obtained by qPCR.

Based on the previously obtained data, the aim of the research was to examine *Sorbus* spp. plants to detect the fire blight agent (*E. amylovora*) and study its role in the necrotic damage development of mountain-ash plants.

MATERIALS AND METHODS

The research and sampling were carried out in 2020 mainly in the areas of known fire blight foci in the Voronezh, Penza, Tula regions and in the Stavropol Krai, as well as in regions where fire blight had not officially been registered before: Moscow (1 location, 30 samples),

Table 1

The data about the samples taken in the Voronezh, Penza regions and the Stavropol Krai

Place of sampling	Date of sampling	Number	Plant part	Symptoms	Test
VORONEZH REGION					
Ternovsky district	May 27	5	inflorescences	no	“PREP-GS” + FLASH (AgroDiagnostics)
Khokholsky district*	May 27	4	inflorescences	no	
Voronezh*	June 3	2 + 3	fruitlets	no	
PENZA REGION					
Penza district	July 7–8	2	leaves	spotting, marginal necrosis	“PREP-GS” + FLASH (AgroDiagnostics)
Tamala*	August 4	1	leaves	spotting, marginal necrosis, chlorosis	
STAVROPOL KRAI					
Zheleznovodsk*	August	3	branches, leaves, fruits	drying out	“PhytoSorb” + RT-PCR (Syntol)
Pyatigorsk*	September	2			

* – focus area or buffer zone.

симптомов. В течение указанного периода наметилась тенденция как к усилению симптоматики на растениях рябины, так и к увеличению уровня сигнала, полученного методами ПЦР-РВ.

С учетом ранее полученных данных нашей целью было обследование растений р. *Sorbus* на выявление возбудителя бактериального ожога плодовых культур (*E. amylovora*) и изучение его роли в развитии некротических поражений растений рябины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования и отбор образцов проводили в 2020 г. преимущественно в районах известных очагов бактериального ожога в Воронежской, Пензенской, Тульской областях и в Ставропольском крае, а также в регионах, где ранее бактериальный ожог официально не был зарегистрирован: г. Москве (1 точка, 30 образцов), Московской (Раменский городской округ – 10 точек, 49 образцов, г. Коломна – 1 точка, 1 образец) и Калужской (1 точка, 4 образца) областях. Образцы отбирали от начала периода цветения до созревания плодов.

Сведения об образцах, отобранных в Воронежской, Пензенской областях и Ставропольском крае, представлены в таблице 1.

При лабораторных исследованиях образцов из г. Москвы, Московской, Калужской и Тульской областей растительный материал разделяли на пробы, включающие отдельные части растений с симптомами (рис. 1, 2) и без симптомов. В различные периоды основной интерес представляли прошлогодние мумифицированные плодовые веточки (живые ткани на границе поражения и мертвые ткани), цветки (ножницами срезали около четверти цветков с нескольких щитков, объединяя их в 1 пробу), завязи, плоды (скальпелем срезали верхнюю часть 10–20 плодов на 1 пробу), листья, побеги, кора ветвей и стволов.

Пробы фотографировали, отбирали растительный материал в пластиковые стаканчики,

Moscow region (Ramenskoye – 10 locations, 49 samples, Kolomna – 1 location, 1 sample) and Kaluga region (1 location, 4 samples). Samples were taken from the beginning of the flowering period to fruit ripening.

The data about the samples taken in the Voronezh, Penza regions and the Stavropol Krai are presented in Table 1.

In laboratory studies of the samples from Moscow and Moscow, Kaluga, and Tula regions, the plant material was divided into subsamples that included individual parts of plants with symptoms (Fig. 1, 2) and without symptoms. The main interest was the previous year’s mummified peduncles (living tissue at the border of the damage as well as dead tissue), flowers (about a quarter of the flowers were cut with scissors from several inflorescences combining them into 1 sample), ovaries, fruits (the apical part of 10–20 fruits per 1 sample was cut off with a scalpel), leaves, shoots, bark of branches and trunks.

The samples were photographed, plant material was selected in plastic containers, 30–40 ml of phosphate buffer was added [40, 41, 42]. The flowers were placed in bags for homogenization, and 50–100 ml of buffer was added depending on the sample volume. Microbiota extraction was performed in accordance with the Methodological Recommendations [42]. Some bark samples were taken directly from the trees into sterile plastic containers, after cleaning the bark at the border of the damage with a cotton pad dipped in 70% ethanol, and removing the top layer of the bark with a sterile scalpel. The ants collected from the samples infected with aphids (3–8 per sample) were placed in a microtube with 500 µL of phosphate buffer, shaken gently, insects were removed, and suspensions were used for testing.



Рис. 1. Основные типы поражений исследованных генеративных органов рябины:
а–д – мумификация плодовых веточек;
е–г – увядание, мумификация, некроз, отставание в росте завязей и плодов

Fig. 1. The main damage types of the investigated mountain-ash generative organs:
а–d – mummification of peduncles;
е–g – wilting, mummification, necrosis, growth retardation of fruitlets and fruits

добавляли 30–40 мл фосфатного буфера [40, 41, 42]. Цветки помещали в пакеты для гомогенизации и добавляли 50–100 мл буфера в зависимости от объема пробы. Проводили экстракцию микробиоты в соответствии с Методическими рекомендациями [42]. Некоторые образцы коры отбирали непосредственно с дерева в стерильные пластиковые стаканчики, предварительно очистив кору на границе поражения с помощью ватного тампона, смоченного в 70%-м этиловом спирте, и сняв верхний слой коры стерильным скальпелем. Муравьев, собранных с образцов, пораженных тлей (3–8 шт. в образце), помещали в микропробирку с 500 мкл фосфатного буфера, слегка встряхивали, удаляли насекомых, смывы использовали для исследования.

To carry out direct PCR-based tests, DNA was extracted from 200 µl of the plant extract using the purification kit “PREP-GS” (AgroDiagnostica, Russia) according to the instruction.

The samples were tested with 2 qPCR tests using commercial kits «*Erwinia amylovora*-RT» (Syntol, Russia) and “Fire blight-RT» (or “Fire blight F” in FLASH format) (AgroDiagnostica, Russia). Commercial kits include internal amplification control necessary when working with plant extracts. Amplification was carried out in accordance with the manufacturer's instructions

Plant extracts were plated on levan agar [40, 41, 42]. Inoculation was carried out using a bacteriological loop. From flowers extracts, as well as from some other samples, three 10-fold dilutions were prepared and 50 µl of each extract and dilution were plated using a Drygalski spatula. The Petri dishes were incubated for up to 96 hours, at a temperature of 27 °C, starting to being watched after 48 hours. Mucoid colonies were selected under a binocular microscope and replated on King B agar [40, 41, 42]. Incubated as described above.

Non-fluorescent cultures were tested by qPCR according to Gottsberger [42, 43]. For this, suspensions at a concentration of about 10⁹ cfu/ml were prepared in 200 µl of PCR grade water, heated for 10 min at 97 °C, cooled in a sample cooler, and centrifuged for 3 min at 7000 rpm. 2 µl DNA per reaction were used.

Some extracts were enriched in levan broth (LB), King B broth (KB) [40, 41, 42], as well as in a medium containing 1% of peptone and sorbitol (SB) [42]. 1 ml of the medium and 200 µl of the plant extract were transferred into the microtube. The tubes were incubated for 48 hours at a temperature of 27 °C. The enriched extracts were centrifuged for 5 min at 7000 rpm, the supernatant was removed, pellets were resuspended in 900 µl of sterile phosphate buffer or distilled water, centrifuged as described above, then the supernatant was removed. 200 µl of sterile distilled water or PCR grade water was added, DNA was extracted by boiling, and the qPCR test was performed according to Gottsberger [43], as described above.

Растительные экстракты высевали на левановый агар [40, 41, 42]. Посев проводили с помощью бактериологической петли. Из экстрактов цветков, а также из части других образцов готовили по 3 10-кратных разведения и высевали по 50 мкл экстракта и разведений с помощью шпателя Дригальского. Чашки инкубировали до 96 ч, начиная просматривать после 48 ч, при температуре 27 °C. Мукоидные колонии отбирали под бинокулярным микроскопом и отсеивали на агар Кинга Б [40, 41, 42]. Инкубировали, как описано выше.

Нефлуоресцирующие культуры тестировали методом ПЦР-РВ по Gottsberger [42, 43]. Для этого в 200 мкл воды для ПЦР готовили суспензии в концентрации около 10⁹ КОЕ/мл, нагревали 10 мин при 97 °C, остужали в охладителе проб, центрифугировали 3 мин при 7000 об/мин. Использовали 2 мкл ДНК на реакцию.

Часть экстрактов обогащали в левановом бульоне (LB), бульоне Кинга Б (KB) [40, 41, 42], а также в среде, содержащей по 1% пептона и сорбита (SB) [42]. В микропробирку вносили 1 мл среды и 200 мкл растительного экстракта. Пробирки инкубировали 48 ч при температуре 27 °C. Обогащенные экстракты центрифугировали 5 мин при 7000 об/мин, сливали супернатант, промывали в 900 мкл стерильного фосфатного буфера или дистиллированной воды, центрифугировали, как описано выше, затем удаляли супернатант. Вносили 200 мкл стерильной дистиллированной воды или воды для ПЦР, выделяли ДНК методом кипячения и проводили тест ПЦР-РВ по Gottsberger [43], как описано выше.

Для проведения прямых тестов на основе ПЦР из 200 мкл экстракта выделяли ДНК с помощью набора для выделения «Проба-ГС» (ООО «АгроДиагностика») в соответствии с инструкцией.

Образцы исследовали с помощью 2 тестов ПЦР-РВ с использованием коммерческих наборов «*Erwinia amylovora*-РВ» (ООО «Синтол») и «Ожог плодовых Rt» (или «Ожог плодовых F» в формате FLASH) (ООО «АгроДиагностика»). Коммерческие наборы включают внутренний контроль амплификации (ВК), необходимый при работе с растительными экстрактами. Амплификацию проводили в соответствии с инструкциями производителей на приборе «ДТ-лайт» (ЗАО «НПФ «ДНК-Технология»).

Также использовали 2 теста на основе классической ПЦР с праймерами по Stöger *et al.* (2006) и Obradovic *et al.* (2007) [цит. по 40]. Тесты унифицированы и валидированы с коммерческой смесью для ПЦР 5x ScreenMix-HS (ЗАО «Евроген»). Реакцию проводили в объеме 25 мкл, включая 5 мкл ДНК. Условия амплификации: 96 °C – 15 мин; 45 циклов: 94 °C – 15 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 45 с; 72 °C – 5 мин. Амплификацию проводили на приборах Veriti (Applied Biosystems, США) и C1000 (Bio-Rad, США). Реакцию с ВК проводили в отдельной пробирке для возможности дальнейшего секвенирования продукта.

Избранные продукты классических ПЦР-тестов секвенировали по Сенгеру на генетическом анализаторе «Нанофор-05» (ООО «Синтол») с использованием реактивов Applied Biosystems, США. Последовательности обрабатывали с помощью программы BioEdit, сравнивали с базой данных NCBI BLAST для подтверждения результатов ПЦР.

on a DTLite device (DNA-Technology, Research & Production LLC).

Also 2 tests were used based on conventional PCR with primers according to Stöger *et al.* (2006) and Obradovic *et al.* (2007) [cit. ex 40]. The tests are unified and validated with the commercial PCR mix 5x ScreenMix-HS (Evrogen, Russia). The reaction was carried out in a volume of 25 µl, including 5 µl of DNA. Amplification conditions: 96 °C – 15 min; 45 cycles: 94 °C – 15 s, 58 °C – 30 s, 72 °C – 45 s; 72 °C – 5 min. Amplification was performed on devices Veriti (Applied Biosystems, USA) and C1000 (Bio-Rad, USA). The reaction with internal control was carried out in a separate test tube to allow the further sequencing of the product.

The selected products of conventional PCR tests were sequenced according to Sanger on a Nano-for-05 genetic analyzer (Syntol, Russia) using the reagents from Applied Biosystems, USA. The sequences were processed using the software BioEdit and compared to the database NCBI BLAST to confirm the PCR results.

RESULTS AND DISCUSSION

The detection of fire blight agent in samples

As a result, the research involved taking and testing a total of 103 combined samples, or 173 subsamples of various organs of *S. aucuparia* and cultivated varieties with pathogen infection symptoms and without symptoms (Fig. 1, 2). The fire blight agent *E. amylovora* has not been detected in the samples from Voronezh, Kaluga, Penza, Tula regions and Stavropol Krai.

In the samples from Moscow, *E. amylovora* DNA was detected in 18 out of 25 samples (72%), or in 28 out of 54 subsamples of various plant parts (52%). In 13 samples (52%), or in 20 subsamples (37%), the result was obtained by at least 3 tests, which is enough to diagnose the fire blight causative agent, in accordance with the Methodological Recommendations [42] used in the Rosselkhoz nadzor laboratories.

In Ramenskoye, DNA was detected in 23 of 49 samples (47%) and in 29 of 87 subsamples (33%). The infected samples were taken at 6 out of 7 locations in different areas of Ramenskoye, in the village Dergaev, Vyalki and Bykovo.

In 2 subsamples of the sample from Kolomna, the genetic material was detected by 4 PCR tests and confirmed by the results of conventional PCR products sequencing.

Despite the fact that some samples were taken at the optimal season time for the pathogen multiplication, under favorable weather conditions, from the trees untreated with pesticides and with characteristic symptoms, a pure culture of *E. amylovora* could not be isolated. It should be noted that according to the results of qPCR tests, the pathogen concentration in the extracts of most samples can be estimated in the range of 10⁵–10⁷ cfu/ml (Ct value from 26 to 20, respectively, according to the test with a Syntol diagnostic kit). Besides, by bio-PCR-RT it was shown that in at least 1 out of 3 tested samples the pathogen was in a viable state, Ct value changed from 32.0 in direct qPCR to 26.5 with enrichment in LB, 29.1 in KB and 27.9 in SB, i. e. the

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление возбудителя бактериального ожога в образцах

В результате исследований было отобрано и протестировано в общей сложности 103 образца, или 173 пробы различных частей *S. aucuparia* и культурных сортов с симптомами поражения патогенами (рис. 1, 2) и без симптомов. В образцах из Воронежской, Калужской, Пензенской, Тульской областей и Ставропольского края возбудитель бактериального ожога плодовых культур *E. amylovora* выявлен не был.

В образцах из г. Москвы был выявлен генетический материал в 18 из 25 образцов (72%), или в 28 из 54 проб различных частей растений (52%). В 13 образцах (52%), или в 20 пробах (37%), результат был получен не менее чем 3 методами, что в соответствии с Методическими рекомендациями [42], использующимися в лабораториях Россельхознадзора, достаточно для установления диагноза о выявлении возбудителя бактериального ожога.

В Раменском ГО ДНК выявили в 23 из 49 образцов (47%) и в 29 из 87 проб (33%). При этом зараженные образцы были отобраны в 6 из 7 точек в разных районах г. Раменское, в дер. Дергаево, Вязки и в р. п. Быково.

В 2 пробах образца, отобранного в г. Коломне, генетический материал был выявлен 4 ПЦР-тестами и подтвержден результатами секвенирования продуктов классических ПЦР.

Несмотря на то, что некоторые образцы были отобраны в оптимальные для развития патогена сроки, при благоприятных погодных условиях, с необработанных пестицидами деревьев и имели характерные симптомы, чистую культуру *E. amylovora* изолировать не удалось. При этом следует отметить, что по результатам тестов ПЦР-РВ концентрация возбудителя в экстрактах значительного количества образцов может оцениваться в пределах 10^5 – 10^7 КОЕ/мл (значение Ct от 26 до 20 соответственно по тесту с набором ООО «Синтол»). Кроме того, методом био-ПЦР-РВ было показано, что по крайней мере в 1 из 3 протестированных образцов возбудитель присутствовал в жизнеспособном состоянии, значение Ct изменилось с 32,0 в прямой ПЦР-РВ до 26,5 с обогащением в левановом бульоне, 29,1 в бульоне Кинга Б и 27,9 в сорбитово-пептонном бульоне, т. е. концентрация патогена возросла на 1–2 порядка.

В 30 образцах (39% от общего количества сборных образцов из г. Москвы и МО), или в 43 пробах (30%), были выявлены флуоресцирующие изоляты бактерий *Pseudomonas* sp., которые способны вызывать симптомы, схожие с симптомами бактериального ожога. Интересно отметить, что в 17 образцах (46% от зараженных), или 27 пробах (46%), была выявлена совместная инфекция *E. amylovora* и *Pseudomonas* sp. В работах встречаются данные о прямо противоположном влиянии бактерий *Pseudomonas* sp. на *E. amylovora*. Так, украинские исследователи в эксперименте доказали отсутствие антагонизма между *E. amylovora* и *P. syringae* pv. *syringae* van Hall, отмечая синергизм патогенного воздействия этих видов на растение [9]. В других работах показано сильное подавляющее воздействие *P. fluorescens* Migula и *P. aeruginosa* (Schroeter) Migula на

pathogen concentration increased by 1–2 orders of magnitude.

In 30 samples (39% of the total number of samples from Moscow and Moscow region), or in 43 subsamples (30%), fluorescent isolates of *Pseudomonas* sp. were detected that can cause symptoms similar to those of a fire blight. It is interesting to note that in 17 samples (46% of the infected ones), or in 27 subsamples (46%) the infection of both *E. amylovora* and *Pseudomonas* sp. has been detected. In different studies there are data on the opposite effect of the bacteria *Pseudomonas* sp. on *E. amylovora*. Thus, Ukrainian researchers experimentally proved the absence of antagonism between *E. amylovora* and *P. syringae* pv. *syringae* van Hall, pointing out the synergism of the pathogenic effect of these species on the plant [9]. Other assays show strong suppressive effect of *P. fluorescens* Migula and *P. aeruginosa* (Schroeter) Migula on *E. amylovora* [44, 45]. In addition, there is evidence of suppression of the fire blight pathogen by other bacterial species associated with host plants [46, 47], as well as yeast [48] which were also often found during isolation from mountain-ash extracts. Thus, the problem of *E. amylovora* pure culture isolation from mountain-ash plant material can be associated with the spread of antagonistic microorganisms in the environment, which at this stage prevent the introduction of an invasive species. In this case, in the future, it is necessary to use a selective medium for *E. amylovora* isolation.

Seasonal dynamics of the infection of mountain-ash organs

The plant samples taken in Moscow and the Moscow region were grouped according to the time of their collection during the growing season, from the flowering period to fruit ripening. It should be noted that the number of samples taken at each location was not the same in different periods. Nevertheless, there is a definite tendency in the dynamics of the infection level and its connection with various plant parts (Table 2, Fig. 3).

Due to the cool spring, the flowering period of mountain-ash in Moscow region began around May 20th. In the period from May 20th to 26th, no symptoms of fire blight were detected on the flowers, the analysis of asymptomatic material did not reveal the presence of a latent infection.

When examining the plants, a frequent occurrence of the previous year's mummified peduncles was noted, which have a clear outer and inner border with healthy shoot tissues (Fig. 1 a–d). Among other reasons, organs mummification (their drying out and the lack of timely detachment from the shoot) may be caused by fire blight. Besides, it is a typical symptom of this infection. The infection can move to older plant parts (up to the root system), persist at the border of diseased and healthy tissue, as well as in the mummified parts of some plant species [6]. The presence of pathogen DNA was noted in mummified fruits of apple and pear trees after wintering [49]. We repeatedly detected the genetic material of *E. amylovora* in mummified fruitlets of pear, apple and quince. However, only once in March 2019 the pure culture

E. amylovora [44, 45]. Кроме того, имеются данные о подавлении возбудителя бактериального ожога другими видами бактерий, ассоциированных с растениями-хозяевами [46, 47], а также дрожжами [48], которые также часто встречались в посевах экстрактов рябины на питательные среды. Таким образом, проблема изоляции чистой культуры *E. amylovora* из растительного материала рябины может быть связана с распространением в окружающей среде антагонистических микроорганизмов, на данном этапе препятствующих внедрению инвазивного вида. В этом случае в дальнейшем необходимо использовать селективную среду для изоляции *E. amylovora*.

Сезонная динамика зараженности различных частей рябины

Растительные образцы, отобранные в г. Москве и Московской области, были сгруппированы по времени их отбора в течение вегетационного сезона, начиная с периода цветения и до созревания плодов. Следует отметить, что в разные периоды количество образцов, отобранных в каждой из точек, было неодинаково. Тем не менее прослеживается определенная тенденция в динамике уровня инфекции и ее приуроченности к различным частям растения (табл. 2, рис. 3).

В связи с прохладной весной период цветения рябины в МО начался около 20 мая. В период с 20 по 26 мая нами не были выявлены симптомы бактериального ожога на цветках, анализ бессимптомного материала не выявил наличия латентной инфекции.

При осмотре растений была отмечена частая встречаемость прошлогодних мумифицированных плодовых веточек, имеющих четкую внешнюю и внутреннюю границу со здоровыми тканями побега (рис. 1 a–d). Среди прочих причин мумификация органов (их усыхание и отсутствие своевременного отсоединения от побега) может быть обусловлена ожогом плодовых. Кроме того, она является характерным симптомом данного заболевания. Инфекция может мигрировать в более старые части растения (вплоть до корневой системы), сохраняться на границе больной и здоровой ткани, а также и в мумифицированных частях некоторых видов растений [6]. В мумифицированных плодах яблонь и груш после зимовки было



Рис. 2. Основные типы поражений исследованных вегетативных органов рябины:

a – краевой некроз листа; b, c – пятнистость, некроз листа; d – увядание побегов; e – поражение побегов тлей; f – усыхание побегов; g – некроз коры, язвы

Fig. 2. The main damage types of the investigated mountain-ash vegetative organs:

a – marginal leaf necrosis; b, c – spotting, leaf necrosis; d – wilting shoots; e – aphid infestation of shoots; f – drying of shoots; g – bark necrosis, cankers

of the pathogen was isolated from mummified pear ovaries collected from a fire blight focus in the Voronezh region.

The authors also noted a high degree of young shoots infestation by aphids (Fig. 2e). It is interesting to note that renewal buds are often located right under the peduncles (Fig. 1 a, f), as a result, when growing in spring, the young shoots are in close contact with the mummified tissues (Fig. 1b). The aphid infestation contributes to the shoots twisting around the peduncles, which creates inside favorable conditions

показано наличие ДНК возбудителя [49]. В ходе собственных исследований авторы неоднократно выявляли генетический материал *E. amylovora* в мумифицированных плодах груши, яблони и айвы. Однако выделить культуру возбудителя удалось только в марте 2019 г., когда патоген был изолирован из мумифицированных завязей груши, отобранных в очаге ожога в Воронежской области.

Авторы также отмечали высокую степень пораженности молодых побегов тлей (рис. 2е). Интересно отметить, что на плодоносящих ветвях *S. aucuparia* почки возобновления часто расположены под плодовой веточкой текущего года (рис. 1 а, f), вследствие чего при отрастании весной молодой побег тесно соприкасается с мумифицированными тканями (рис. 1b). Поражение тлей способствует закручиванию побегов вокруг плодовой веточки, что создает внутри благоприятные условия повышенной влажности и защищенности от внешних воздействий; также процесс усугубляется повреждением молодой ткани побега и листьев этими насекомыми. Совокупность этих факторов при наличии жизнеспособного возбудителя может стать мощным стимулом развития болезни на молодых побегах.

В данном исследовании генетический материал *E. amylovora* был достоверно выявлен на границе больной и здоровой ткани в 2 из 9 образцов (22%), а также еще в 2 образцах с помощью единичных тестов. В мумифицированных частях плодовых веточек ДНК возбудителя не была выявлена более чем 1 тестом. Как и предполагалось, внутри пораженных тлей побегов наблюдали в той или иной степени увядающие и некротизированные листья (рис. 2е). Однако ДНК *E. amylovora* достоверно была выявлена только в 1 пробе, в большинстве случаев были изолированы флуоресцирующие псевдомонады. В нескольких исследованных образцах листьев и побегов, а также на поверхности тела пасущих тлю муравьев возбудитель достоверно выявлен не был. В целом ДНК *E. amylovora* была выявлена в 15% сборных образцов (в генеративных органах – в 15%, в вегетативных – в 9% случаев).

В период 5–16 июня образцы были отобраны в Раменском ГО и г. Коломне. Отмечалось наличие подозрительных и характерных симптомов на различных частях растений рябины. Были проанализированы отцветшие цветки с побуревшими лепестками или сухие отделяющиеся неопылившиеся цветки; завязи с симптомами увядания, некроза и без симптомов; прошлогодние мумифицированные плодовые веточки; побеги; листья с симптомами пятнистостей и некрозов, увядания, некроза центральной жилки и без симптомов; побеги, пораженные тлей; кора ствола с симптомами некрозов и язв (рис. 2g). Генетический материал *E. amylovora* был выявлен во всех исследованных частях растений, в т. ч. в бессимптомных, за исключением побега, пораженного тлей. Концентрация копий генома составляла в большинстве случаев не менее 10⁴–10⁵ (Ct 29–25 соответственно). Наиболее высокие концентрации ДНК были отмечены в листьях с признаками пятнистости (Ct 20,3, что соответствует не менее 10⁷ копиям генома на мл растительного экстракта). Общая доля зараженных проб генеративных органов составила 67%,

for high humidity and protection from external influences; the process is also aggravated by the damage caused by these insects to the young tissue of shoots and leaves. With a viable pathogen being present, the combination of these factors can become a powerful stimulus for the development of the disease on young shoots.

In this study, the *E. amylovora* genetic material was reliably detected at the border of the infected and healthy tissue in 2 out of 9 samples (22%), as well as in 2 more samples using single tests. In the mummified parts of the peduncles, the pathogen DNA was not detected by more than 1 test. As expected, wilting and necrotic leaves were observed inside the shoots affected by aphids (Fig. 2e). However, *E. amylovora* DNA was reliably detected only in 1 subsample, fluorescent pseudomonads were isolated in most cases. In several studied samples of leaves and shoots, as well as on the body surface of aphid-herding ants, the pathogen was not reliably detected. In general, *E. amylovora* DNA was detected in 15% of the collected samples (in generative organs – in 15%, in vegetative ones – in 9%).

In the period June 5th–16th, samples were collected in Ramenskoye and Kolomna. Some suspicious and typical symptoms were noted on various mountain-ash parts. The analysis involved faded flowers with brown petals or dry separating unpollinated flowers; ovaries with symptoms of wilting, necrosis and asymptomatic, without symptoms; previous year’s mummified peduncles; shoots; leaves with symptoms of spotting and necrosis, wilting, central vein necrosis and no symptoms; shoots affected by aphids; trunk bark with symptoms of necrosis and cancers (Fig. 2g). *E. amylovora* genetic material was detected in all the studied plant organs, including those without symptoms, except for the shoot infested with aphids. The concentration of genome copies was in most cases no less than 10⁴–10⁵ (Ct 29–25 respectively). The highest DNA concentrations were found in leaves with signs of spotting (Ct 20.3, which corresponds to at least 10⁷ copies of the genome per 1 ml of plant extract). The total proportion of infected samples of generative organs was 67%, vegetative shoots and bark – 80% each. The total number of infected combined samples amounts to 86%. Fluorescent strains of *Pseudomonas* sp. were detected in 100% of flower samples, 79% of ovaries, 83% of leaves, but were absent in the bark and the previous year’s mummified peduncles. The total proportion of the samples infected with pseudomonads in this period was 82%.

From June 29th to July 3rd, samples were taken in Moscow. The examination concerned dried flowers; fruitlets with symptoms of wilting, stunting, necrosis (Fig. 1f), and asymptomatic ones; leaves with spotting, necrosis (Fig. 2 b, c) and chlorosis; shoots with symptoms of necrosis, wilting, drying out (Fig. 2f). *E. amylovora* DNA was detected practically in all plant parts, in 69% of the combined samples. Shoots accounted for the highest proportion of infected samples (67%). The highest concentration (Ct 24.3) was also noted in a sample of wilted and shrinking shoot with leaves. Among the leaf samples, 60%

вегетативных побегов и коры – по 80%. Общее количество зараженных сборных образцов – 86%. Флуоресцирующие бактерии *Pseudomonas* sp. были выявлены в 100% проб цветков, 79% завязей, 83% листьев, но отсутствовали в коре и в мумифицированных плодовых веточках прошлого года. Общая доля зараженных псевдомонадами образцов в данный период составила 82%.

В период с 29 июня по 3 июля образцы отбирали в г. Москве. Исследовали усохшие цветки; плоды с симптомами увядания, отставания в росте и некроза (рис. 1f), а также без симптомов; листья с пятнистостью, некрозами (рис. 2 b, c) и пожелтением; побеги с симптомами некроза, увядания, усыхания (рис. 2f). Генетический материал *E. amylovora* был выявлен практически во всех частях растений рябины, в 69% сборных образцов. Наиболее высокая доля зараженных проб приходилась на побеги (67%). Наибольшая концентрация (Ct 24,3) отмечена также в образце увядающего и усыхающего побега с листьями. Среди проб листьев зараженными оказались 60%. Доля зараженных плодов составила 53%, причем значения Ct проб с симптомами и без не отличались. Предельный цикл большинства положительных образцов составил 26–32. В 40% проб плодов с симптомами некроза и без симптомов, а также в 1 пробе листьев с симптомами некроза и пожелтения выявлены бактерии *Pseudomonas* sp.

Таблица 2
Зараженность отдельных частей растений рябины и сборных образцов, отобранных в г. Москве и МО
 (на основании положительных результатов 3 и более тестов)

	20–26.05			05–16.06			29.06–03.07			10–28.07			28.08–19.09			Итого		
Части растения	заражено	всего	%	заражено	всего	%	заражено	всего	%	заражено	всего	%	заражено	всего	%	заражено	всего	%
цветки	0	4	0	4	4	100	–	–	–	–	–	–	0	1	0	4	9	44
завязи	–	–	–	7	14	50	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7	14	50
плоды	–	–	–	–	–	–	8	15	53	1	4	25	0	12	0	9	31	29
плод. вет.	2	9	22	5	6	83	–	–	–	–	–	–	0	7	0	7	22	32
ГЕНЕРАТ.	2	13	15	16	24	67	8	15	53	1	4	25	0	20	0	26	79	33
листья	1	7	14	4	5	80	3	5	60	2	8	25	0	3	0	10	32	31
побеги	0	5	0	–	–	–	4	6	67	0	1	0	–	–	–	4	11	36
ВЕГЕТАТ.	1	12	8	4	5	80	7	11	64	2	9	22	0	3	0	14	44	33
КОРА	–	–	–	4	5	80	–	–	–	1	9	11	0	4	0	5	18	28
Всего	3	25	12	24	34	71	15	26	58	4	22	18	0	27	0	45	141	32
СБОРНЫЕ ОБРАЗЦЫ	2	13	15	18	22	82	9	14	64	5	17	29	0	12	0	34	78	44

resulted to be infected. The proportion of the infected fruitlets was 53%, with the Ct values of the samples with and without symptoms being equal. For the most positive samples it was 26–32. In 40% of the fruitlet samples with necrosis and without any symptoms, as well as in 1 leaves sample with necrosis and bacteria *Pseudomonas* sp. were detected.

During July, samples were taken in Moscow and Ramenskoye, where special attention was paid to the trunk bark necrosis, which has been observed in recent years, leading to the death of trees. In sterile taken bark samples, *E. amylovora* DNA was detected only in 1 case out of 9, *Pseudomonas* sp. was not isolated. Among other subsamples, shoots and leaves with symptoms of wilting, drying out, chlorosis, spotting and necrosis, and vein necrosis were analyzed (2 subsamples of leaves from 10 subsamples of vegetative organs are reliably positive (20%), or 2 out of 8 samples (25%)). Ct values exceeded 31. Among 4 fruitlet subsamples, *E. amylovora* DNA was detected only in 1 case – in wilting and asymptomatic ones. In this subsample, the pathogen viability was confirmed by the bio-PCR-RT method. The total proportion of the infected samples was 29%.

In late August – early September, a study was carried out mainly for combined samples, as well as samples of mature fruits without symptoms and with symptoms of wilting and mummification, peduncles with signs of chlorosis and drying out, as well as leaves with

Table 2
Infection of individual parts of mountain-ash plants and combined samples from Moscow and Moscow region
 (based on positive results of 3 or more tests)

	20–26.05			05–16.06			29.06–03.07			10–28.07			28.08–19.09			Total		
Plant parts	infected	total	%	infected	total	%	infected	total	%	infected	total	%	infected	total	%	infected	total	%
flowers	0	4	0	4	4	100	–	–	–	–	–	–	0	1	0	4	9	44
ovaries	–	–	–	7	14	50	–	–	–	–	–	–	–	–	–	7	14	50
fruitlets	–	–	–	–	–	–	8	15	53	1	4	25	0	12	0	9	31	29
peduncles	2	9	22	5	6	83	–	–	–	–	–	–	0	7	0	7	22	32
GENERAT.	2	13	15	16	24	67	8	15	53	1	4	25	0	20	0	26	79	33
leaves	1	7	14	4	5	80	3	5	60	2	8	25	0	3	0	10	32	31
shoots	0	5	0	–	–	–	4	6	67	0	1	0	–	–	–	4	11	36
VEGETAT.	1	12	8	4	5	80	7	11	64	2	9	22	0	3	0	14	44	33
BARK	–	–	–	4	5	80	–	–	–	1	9	11	0	4	0	5	18	28
Total	3	25	12	24	34	71	15	26	58	4	22	18	0	27	0	45	141	32
COMBINED SAMPLES	2	13	15	18	22	82	9	14	64	5	17	29	0	12	0	34	78	44

В течение июля образцы отбирали в г. Москве и в Раменском ГО, где особое внимание уделили некрозам коры ствола, который наблюдается в течение последних лет, приводя к гибели деревьев. В отобранных стерильно пробах коры ДНК *E. amylovora* была выявлена только в 1 случае из 9, не были изолированы и бактерии *Pseudomonas* sp. Среди других проб анализировали побеги и листья с симптомами увядания, усыхания, хлороза, пятнистостей и некрозов, некроза жилок (достоверно положительны 2 пробы листьев из 10 проб вегетативных органов (20%), или 2 из 8 образцов (25%)). Значения Ct превышали 31. Среди 4 проб плодов ДНК *E. amylovora* выявлена в 1 случае – в увядающих и бессимптомных плодах. В данном образце жизнеспособность возбудителя была подтверждена методом био-ПЦР-РВ. Общая доля зараженных образцов составила 29%.

В конце августа – начале сентября провели исследование в основном сборных образцов, а также проб зрелых плодов без симптомов и с симптомами увядания и мумификации, плодовых веточек с признаками пожелтения и усыхания, листьев с пятнистостью и некрозом жилки. Получены 3 положительных результата одного из двух использованных тестов на основе ПЦР-РВ. Таким образом, в данный период зараженные образцы достоверно выявлены не были.

ВЫВОДЫ

В ходе исследования образцов, отобранных с растений рода *Sorbus* в период с мая по сентябрь 2020 г. в Воронежской, Калужской, Пензенской, Тульской

spotting and vein necrosis. 3 positive results of one of the two qPCR-based tests used were obtained. Thus, during this period, the infected samples were not reliably identified.

CONCLUSION

As a result of the testing of the samples taken from genus *Sorbus* plants from May to September 2020 in Voronezh, Kaluga, Penza, Tula regions and Stavropol Krai, the fire blight causative agent *E. amylovora* has not been detected.

The pathogen has not been isolated from the samples taken in Moscow and Moscow region, however, in accordance with the Methodological recommendations for the detection and identification of the fire blight causative agent *Erwinia amylovora* (Burrill.) Winslow et al. [42], DNA of the pathogen has been reliably detected by at least 3 tests based on conventional PCR and qPCR, confirmed by sequencing at 8 out of 9 sampling locations in Moscow, Ramenskoye and Kolomna and in 44% of the tested samples.

The genetic material of *E. amylovora* has been detected in the samples of all tested parts of mountain-ash plants (flowers, ovaries, fruitlets, peduncles, shoots, leaves, trunk bark) both with symptoms and without symptoms at concentrations corresponding to 10²–10⁷ copies of the genome per 1 ml of extract. However, at the moment, the leading role of the fire blight

областях и Ставропольском крае, возбудитель бактериального ожога плодовых культур *E. amylovora* выявлен не был.

Из образцов, отобранных в г. Москве и Московской области, возбудитель не был изолирован, однако в соответствии с Методическими рекомендациями по выявлению и идентификации возбудителя бактериального ожога плодовых культур *Erwinia amylovora* (Burrill.) Winslow et al. [42] генетический материал возбудителя был достоверно выявлен не менее чем 3 тестами на основе классической ПЦР и ПЦР-РВ, а также методом секвенирования продуктов амплификации классической ПЦР в 8 из 9 точек отбора в г. Москве, Раменском городском округе и г. Коломне и в 44% исследованных образцов.

Генетический материал *E. amylovora* был выявлен в пробах всех исследованных частей растений рябины (цветки, завязи, плоды, плодовые веточки, побеги, листья, кора ствола) как с симптомами, так и без симптомов в концентрациях, соответствующих 10²–10⁷ копиям генома на 1 мл экстракта. Однако в настоящий момент ведущая роль возбудителя бактериального ожога в формировании некротических поражений рябины не подтверждена.

Динамика зараженности сборных образцов и отдельных органов в целом соответствует динамике заболевания на плодовых культурах, за исключением отсутствия выявлений инфекции на цветках в период цветения, что может быть связано с малым количеством отобранных образцов. В остальном наиболее высокий уровень инфекции (как в процентном отношении от исследованных образцов (до 82%), так и по концентрации ДНК в экстрактах проб

causative agent in the formation of necrotic damage of mountain-ash has not been confirmed.

Generally, the infection dynamics of the combined samples and individual organs corresponds to the disease dynamics on fruit trees, except for no detection of the infection on flowers during the flowering period, which may be due to the small number of samples. In all other respects, the highest level of infection (both as a percentage of the tested samples (up to 82%), and in terms of DNA concentration in samples extracts of individual mountain-ash organs (average number Ct 28.3–30 in qPCR test with a Syntol commercial kit) was observed in June. Thus, the surveys of mountain-ash and fruit crops for the detection of *E. amylovora* in central Russia should be carried out in late May – June before the hot dry weather. Combined samples of symptomatic and asymptomatic vegetative and generative organs should be collected.

Fluorescent isolates of *Pseudomonas* sp. have been detected in a significant number of symptomatic and asymptomatic samples, both with *E. amylovora* co-infection and unaffected ones. Besides, many samples have shown fast growth of other bacteria species, as well as fungal and yeast-like organisms, which at this stage may prevent the introduction of the invasive species *E. amylovora*. In further studies, it is advisable to study the effect of microbiota on the fire blight causative agent. This will contribute to the understanding of its potential harmfulness, as well as the development of selective media for isolation and creating biological products to control the rapidly spreading pathogen across the territory of the Russian Federation.

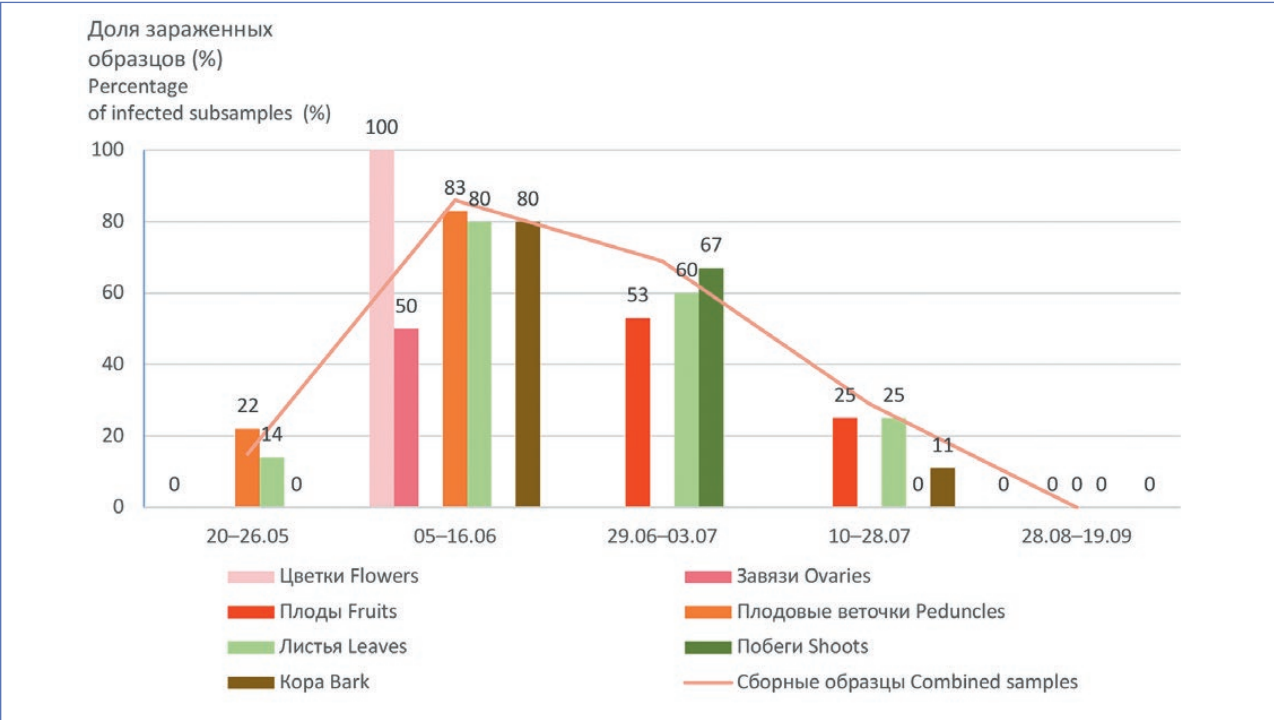


Рис. 3. Динамика зараженности различных частей растений рябины возбудителем бактериального ожога

Fig. 3. Fire blight infection dynamics of various parts of mountain-ash plants

отдельных частей растений рябины (среднее значение Ct 28,3–30 в тесте ПЦР-PB с набором ООО «Синтол») наблюдался в июне. Таким образом, обследования растений рябины, как и насаждений плодовых культур на выявление *E. amylovora* в средней полосе России следует проводить в конце мая – июне до наступления жаркой сухой погоды. Следует отбирать сборные образцы вегетативных и генеративных органов с симптомами и без симптомов.

В значительном количестве образцов с симптомами и без были выявлены флуоресцирующие бактерии *Pseudomonas* sp., как в совместной инфекции с *E. amylovora*, так и в незараженных образцах. Кроме того, во многих образцах наблюдался обильный рост других видов бактерий, а также грибных и дрожжеподобных организмов, которые могут на данном этапе препятствовать внедрению инвазивного вида *E. amylovora*. В дальнейших исследованиях целесообразно изучить влияние микробиоты на возбудителя бактериального ожога. Это способствует пониманию его потенциальной вредности, а также подбору селективных сред для изоляции и изучению возможности создания биопрепаратов для борьбы с быстро распространяющимся по территории РФ патогеном.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Харченко А.А. Ожог плодовых в Воронежской области // Защита и карантин растений. – 2009. – № 5. – С. 34–35.
2. Александров И.Н. Бактериальный ожог плодовых культур в Российской Федерации. Историческая справка // Защита и карантин растений. – 2009. – № 12. – С. 26–29.
3. Квашнина Н.А. Мониторинг очагов бактериального ожога плодовых культур на юге России // Защита и карантин растений. – 2010. – № 6. – С. 40–41.
4. Дренова Н.В. Ожог плодовых культур в Российской Федерации и современные подходы к его диагностике // Плодоводство и ягодоводство России. – 2019. – Т. 58. – С. 131–137.
5. В плодовых деревьях Тульской области обнаружили бактериальный ожог / сайт Управления Россельхознадзора по Москве, Московской и Тульской областям. – 24.09.2019. – URL: http://rsn-msk.ru/Pressa_ob_Upravlenii/n34607/ (дата обращения: 07.10.2020).
6. Van der Zwet T., Keil H.L. Fire blight: a bacterial disease of rosaceous plants. Agriculture Handbook 510. – Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, 1979. – 200 p.
7. Кудина И.В., Лагоненко А.Л., Евтушенков А.Н. Характеристика фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora*, выделенных на территории Беларуси // Труды БГУ. – 2008. – Том 3, часть 1. – С. 1–8.
8. Дренова Н.В., Исин М.М., Джаймурзина А.А., Жармухамедова Г.А., Айткулов А.К. Бактериальный ожог плодовых культур в Республике Казахстан. Карантин растений. Наука и практика. – 2013. – № 1 (3). – С. 39–48.
9. Яковлева Л.М., Мороз С.Н., Щербина Т.Н., Огородник Л.Е., Гвоздяк Р.И., Патыка В.Ф. *Erwinia amylovora* – возбудитель бактериального ожога деревьев в Украине // Микробиологический журнал. – 2014. – Т. 76, № 4. – С. 26–33.
10. Doolotkeldieva T., Bobusheva S. Fire Blight Disease Caused by *Erwinia amylovora* on Rosaceae Plants

REFERENCES

1. Kharchenko A.A. Fire blight in Voronezh Region [Ozhog plodovykh v Voronezhskoy Oblasti]. *Zashchita i karantin rasteniy*. 2009; 5: 34–35. (In Russian.)
2. Aleksandrov I.N. Fruit crop fire blight the Russian Federation. Historical note [Bakterialny ozhog plodovykh kultur v Rossiyskoy Federatsii. Istoricheskaya spravka]. *Zashchita i karantin rasteniy*. 2009; 12: 26–29. (In Russian.)
3. Kvashnina N.A. Monitoring of fruit crops fire blight foci in the south of Russia [Monitoring ochagov bakterialnogo ozhoga plodovykh kultur na yuge Rossii]. *Zashchita i karantin rasteniy*. 2010; 6: 40–41 (in Russian.)
4. Drenova N.V. Fire blight in the Russian Federation and current approaches to its diagnostics [Ozhog plodovykh kultur v Rossiyskoy Federatsii i sovremennye podkhody k ego diagnostike]. *Pomiculture and small fruits culture in Russia*. 2019; 58: 131–137. (In Russian.)
5. Fire blight was found in fruit trees of the Tula region. Website of the Rosselkhoz nadzor Administration for Moscow, Moscow and Tula regions. 24.09.2019. URL: http://rsn-msk.ru/Pressa_ob_Upravlenii/n34607/ (last accessed: 07.10.2020). (In Russian.)
6. Van der Zwet T., Keil H.L. Fire blight: a bacterial disease of rosaceous plants. Agriculture Handbook 510. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture, 1979. 200 p.
7. Kudina I.V., Lagonenko A.L., Evtushenkov A.N. Characteristics of phytopathogenic bacteria *Erwinia amylovora* extracted in Belarus [Kharakteristiki fitopatogennykh bakteriy *Erwinia amylovora* vydelennaykh na territorii Belarusi]. *Trudy BGU*. 2008; Vol. 3, Part 1: 1–8. (In Russian.)
8. Drenova N.V., Isin M.M., Dzhaïmurzina A.A., Zharmukhamedova G.A., Aitkulov A.K. Bacterial Fire Blight in the Republic of Kazakhstan [Bakterialny ozhog plodovykh kultur v Respublike Kazakhstan]. *Plant Health. Research and Practice*. 2013; 1 (3): 39–48. (In Russian.)
9. Yakovleva L.M., Moroz S.N., Shcherbina T.N., Ogorodnik L.E., Gvozdyak R.I., Patyka V.F. *Erwinia amylovora* – the fire blight pathogen of arbores in Ukraine [*Erwinia amylovora* – vzbuditel bakterialnogo ozhoga derevyev v Ukarine]. *Microbiological journal*. 2014; 76 (4): 26–33. (In Russian.)
10. Doolotkeldieva T., Bobusheva S. Fire Blight Disease Caused by *Erwinia amylovora* on Rosaceae Plants in Kyrgyzstan and Biological Agents to Control This Disease. *Advances in Microbiology*. 2016; 6 (11): 831–851. URL: <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.611080>.
11. Gaganidze D.L., Aznarashvili M.A., Sadunishvili T.A., Abashidze E.O., Gureilidze M.A., Gvritishvili E.S. Fire blight in Georgia. *Annals of Agrarian Science*. 2018; 16 (1): 12–16. URL: <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.02.001>.
12. Jovanovic G., Arsenijevic M., Gavrilović V. Occurrence and Spread of Fire Blight Pathogen (*Erwinia amylovora*) on Spontaneous and Ornamental Plants in Yugoslavia. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*. 2001; 36 (1–2): 55–59. URL: <https://doi.org/10.1556/aphyt.36.2001.1-2.7>.

in Kyrgyzstan and Biological Agents to Control This Disease // Advances in Microbiology. – 2016. – Vol. 6, No. 11. – P. 831–851. – URL: <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.611080>.

11. Gaganidze D.L., Aznarashvili M.A., Sadunishvili T.A., Abashidze E.O., Gureilidze M.A., Gvritishvili E.S. Fire blight in Georgia // Annals of Agrarian Science. – 2018. – Vol. 16, Issue 1. – P. 12–16. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.02.001>.
12. Jovanovic G., Arsenijevic M., Gavrilović V. Occurrence and Spread of Fire Blight Pathogen (*Erwinia amylovora*) on Spontaneous and Ornamental Plants in Yugoslavia // Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica. – 2001. – Vol. 36, Issue 1– 2. – P. 55–59. – URL: <https://doi.org/10.1556/aphyt.36.2001.1-2.7>.
13. Zeller W. Studies on fire blight in the German Federal Republic. 2. Susceptibility of woody ornamentals to *Erwinia amylovora* // Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes. – 1977. – No. 29 (1). – P. 1–10.
14. Ponti I., Calzolari A. *Erwinia amylovora* in Emilia-Romagna // Informatore Agrario. –1997. – Vol. 53, No. 33. – P. 76–77.
15. San S.P., Cullum J., Thomidis T. An assessment of the relative resistance of three hawthorn species to three strains of *Erwinia amylovora* using three different inoculation methods // Phytoparasitica. – 2009. – Vol. 37, Issue 4. – P. 371–373.
16. Bobev S.G., Crepel C., Maes M. First report of *Erwinia amylovora* on *Crataegus monogyna* and *Pyrus pyraister* in Bulgaria // Plant Disease. – 1998. – Vol. 82, No. 11. – P. 1283.
17. Дренова Н.В., Шнейдер Е.Ю., Квашнина Н.А., Коняева О.Н., Тарчоков А.Ю., Быковский А.В., Дубоделова И.В. Бактериальный ожог плодовых деревьев на Северном Кавказе и в Предкавказье // Материалы международной научно-практической конференции «Инновационно-технологическое обеспечение устойчивого развития садоводства, виноградарства и виноделия». – Махачкала: ГНУ Дагестанский НИИ СХ. – 2013. – С. 178–185.
18. Дикie родичи культурных растений. Ареал *Crataegus monogyna* Jacq. – Боярышник однопестичный / Агроэкологический атлас России и сопредельных стран: экономически значимые растения, их вредители, болезни и сорные растения. – URL: http://www.agroatlas.ru/ru/content/related/Crataegus_monogyna/ (дата обращения: 09.10.2020).
19. Красовская Л. С. Рябина // Большая российская энциклопедия. Электронная версия. – 2017. URL: <https://bigenc.ru/biology/text/3524412> (дата обращения: 07.10.2020).
20. Sennikov A.N., Kurtto A. A phylogenetic checklist of *Sorbus* s.l. (Rosaceae) in Europe // Memoranda Societatis pro Fauna et Flora Fennica. – 2017. – Vol. 93. – P. 1–78.
21. Sennikov A.N. *Scandosorbus* (Rosaceae), a new generic name for *Sorbus intermedia* and its hybrid // Ann. Bot. Fennici. – 2018. – Vol. 55. – P. 321–323.
22. Деревья и кустарники СССР. Дикорастущие, культивируемые и перспективные для интродукции. Т. 3. Покрытосеменные. Семейства Троходендровые – Розоцветные. – М.-Л.: Изд-во Академии наук СССР, 1954. – 872 с.
23. Род *Sorbus* / Атлас-определитель растений и лишайников России и сопредельных стран

13. Zeller W. Studies on fire blight in the German Federal Republic. 2. Susceptibility of woody ornamentals to *Erwinia amylovora*. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*. 1977; 29 (1): 1–10.

14. Ponti I., Calzolari A. *Erwinia amylovora* in Emilia-Romagna. *Informatore Agrario*. 1997; 53 (33): 76–77.
15. San S.P., Cullum J., Thomidis T. An assessment of the relative resistance of three hawthorn species to three strains of *Erwinia amylovora* using three different inoculation methods. *Phytoparasitica*. 2009; 37 (4): 371–373.
16. Bobev S.G., Crepel C., Maes M. First report of *Erwinia amylovora* on *Crataegus monogyna* and *Pyrus pyraister* in Bulgaria. *Plant Disease*. 1998; 82 (11): 1283.
17. Drenova N.V., Shneider E.Yu., Kvashnina N.A., Konyaeva O.N., Tarchokov A.Yu., Bykovsky A.V., Dubodelova I.V. Fire blight on the North Caucasus and Ciscaucasia [Bakterilany ozhog plodovykh derevyev na Severnom Kavkaze i v Predkavkazye]. Materials of the international scientific and practical conference “Innovative and technological support for sustainable development of horticulture, viticulture and winemaking”. Makhachkala: GNU Dagestan Research Institute of Agriculture. 2013: 178–185. (In Russian.)
18. Wild relatives of crops. The distribution area of Common hawthorn, may (*Crataegus monogyna* Jacq.) [Dikie rodichi kulturnykh rasteniy. Areal *Crataegus monogyna* Jacq. – boyaryshnik odnopestichny]. Agroecological atlas of Russia and neighboring countries: economically significant plants, their pests, diseases and weeds. URL: http://www.agroatlas.ru/ru/content/related/Crataegus_monogyna/map (last accessed: 09.10.2020). (In Russian.)
19. Krasovskaya L.S. Mountain-ash. Great Russian encyclopedia. Electronic version. 2017. URL: <https://bigenc.ru/biology/text/3524412> (last accessed: 07.10.2020). (In Russian.)
20. Sennikov A.N., Kurtto A. A phylogenetic checklist of *Sorbus* s.l. (Rosaceae) in Europe. Memoranda Societatis pro Fauna et Flora Fennica. 2017; 93: 1–78.
21. Sennikov A.N. *Scandosorbus* (Rosaceae), a new generic name for *Sorbus intermedia* and its hybrid. *Ann. Bot. Fennici*. 2018; 55: 321–323.
22. Trees and shrubs of the USSR. Wild, cultivated and promising for introduction. Vol. 3. Angiosperms. Families Trohodendra – Rosaceae [Derevya i kustarniki SSSR. Dikorastushchie, kultiviruemye i perspektivnye dlya introduksii. T. 3. Pokrytosemennye. Semeystva Trokhodendrovye – Rozotsvetnye]. M.-L.: Izdatelstvo Akademii Nauk SSSR, 1954. 872 p. (In Russian.)
23. *Sorbus* spp. Atlas-identifier of plants and lichens of Russia and neighboring countries “Plantarium” [Rod *Sorbus*. Atlas-opredelitel rasteniy i lishainikov Rossii i sopredelnykh stran “Plantarium”]. URL: <https://www.plantarium.ru/page/view/item/44399> (last accessed: 09.10.2020). (In Russian.)
24. Plants of Crimea: Rowan [Rasteniya Kryma: Ryabina]. Website flora.crimea.ru. URL: <http://flora.crimea.ru/rjabina/rjabina.html> (last accessed: 09.10.2020). (In Russian.)

«Плантариум». – URL: <https://www.plantarium.ru/page/view/item/44399> (дата обращения: 09.10.2020).

24. Растения Крыма: Рябина / [flora.crimea.ru](http://flora.crimea.ru/rjabina/rjabina.html). – URL: <http://flora.crimea.ru/rjabina/rjabina.html> (дата обращения: 09.10.2020).

25. Van der Zwet T. First report of *Erwinia amylovora* on new host species in the genus *Sorbus* // Plant Disease. – 1995. – Vol. 79, No. 4. – P. 424. – URL: <http://dx.doi.org/10.1094/pd-79-0424c>.

26. Billing E., Baker L.A.E., Crosse J.E., Garrett C.M.E. Characteristics of English isolates of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. // Journal of Applied Bacteriology, – 1961. – Vol. 24. – P. 195–211.

27. CFBP, collection of plant pathogenic bacteria. – URL: http://catalogue-cfbp.inra.fr/result_e.php (дата обращения: 09.10.2020).

28. ICMP 13414 – *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al. / Systematics Collections Data. URL: [https://scd.landcareresearch.co.nz/Specimen/ICMP%2013414?collection=ICMP&searchCollection=ICMP&query=Erwinia%20amylovora&appliedFacets=%7CpreferredName_ss%7CAria%20edulis%20\(Willd.\)%20M.Roem.¤tDisplayTab=list&pageNumber=0&sortField=relevance](https://scd.landcareresearch.co.nz/Specimen/ICMP%2013414?collection=ICMP&searchCollection=ICMP&query=Erwinia%20amylovora&appliedFacets=%7CpreferredName_ss%7CAria%20edulis%20(Willd.)%20M.Roem.¤tDisplayTab=list&pageNumber=0&sortField=relevance) (дата обращения: 09.10.2020).

29. Ruppitsch W., Stöger A.R., Keck M. Stability of short sequence repeats and their application for the characterization of *Erwinia amylovora* strains // FEMS Microbiology Letters. – Vol. 234, Issue 1. – May 2004. – P. 1–8. – URL: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09506.x>.

30. Van Teylingen M. Ornamental hosts of *Erwinia amylovora* and the effect of the fire blight control policy in the Netherlands // Acta Hort. – 2002. – No. 590. – P. 81–87. – URL: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.590.9>.

31. Belgian co-ordinated collections of micro-organisms. URL: <https://bccm.belspo.be/catalogues/lmg-search-results?LIST1=STRNUM&TEXT1=28361%20&LIST2=SPECIES&TEXT2=Erwinia%20amylovora&LIST3=ORIGSUBST&TEXT3=Sorbus&LIST4=ORIGIN&TEXT4=ALL%20FIELDS&TEXT5=&CONJ=OR&FIRSTITEM=101&PREVIOUSRANGE=50&RANGE=50> (дата обращения: 09.10.2020).

32. Duffy B., Schärer H.-J., Bünter M., Klay A., Holliger E. Regulatory measures against *Erwinia amylovora* in Switzerland // EPPO Bull. – 2005. – Vol. 35, Issue 2. – P. 239–244.

33. Gavrilović V., Zivković S., Obradović A., Miličević S., Arsenijević M., Vojinović M. *Sorbus* sp. – new host of *Erwinia amylovora* in Serbia // Acta Hort. – 2008. – No. 793. – P. 351–355. URL: <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.793.52>.

34. Bastas K. K. First Report of *Erwinia amylovora* on Firethorn (*Pyracantha coccinea*) and Mountainash (*Sorbus* sp.) in Turkey // Plant Disease. – 2012. – Vol. 96, No. 12. – P. 1818. URL: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-12-0014-PDN>.

35. Ismail E., Blom J., Bultreys A., Ivanović M., Obradović A., van Doorn J., Bergsma-Vlami M., Maes M., Willems A., Duffy B., Stockwell V.O., Smits T., Puławska J. A novel plasmid pEA68 of *Erwinia amylovora* and the description of a new family of plasmids // Archives of Microbiology. – 2014. – Vol. 196, Issue 12. – P. 891–899.

36. Jock S., Rodoni B., Gillings M., Kim W.-S., Copes C., Merriman P., Geider K. Screening of

25. Van der Zwet T. First report of *Erwinia amylovora* on new host species in the genus *Sorbus*. *Plant Disease*. 1995; 79 (4): 424. URL: <http://dx.doi.org/10.1094/pd-79-0424c>.

26. Billing E., Baker L.A.E., Crosse J.E., Garrett C.M.E. Characteristics of English isolates of *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. *Journal of Applied Bacteriology*. 1961; 24: 195–211.

27. CFBP, collection of plant pathogenic bacteria. URL: http://catalogue-cfbp.inra.fr/result_e.php (last accessed: 09.10.2020).

28. ICMP 13414 – *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al. Systematics Collections Data. URL: [https://scd.landcareresearch.co.nz/Specimen/ICMP%2013414?collection=ICMP&searchCollection=ICMP&query=Erwinia%20amylovora&appliedFacets=%7CpreferredName_ss%7CAria%20edulis%20\(Willd.\)%20M.Roem.¤tDisplayTab=list&pageNumber=0&sortField=relevance](https://scd.landcareresearch.co.nz/Specimen/ICMP%2013414?collection=ICMP&searchCollection=ICMP&query=Erwinia%20amylovora&appliedFacets=%7CpreferredName_ss%7CAria%20edulis%20(Willd.)%20M.Roem.¤tDisplayTab=list&pageNumber=0&sortField=relevance) (last accessed: 09.10.2020).

29. Ruppitsch W., Stöger A.R., Keck M. Stability of short sequence repeats and their application for the characterization of *Erwinia amylovora* strains. *FEMS Microbiology Letters*. May 2004; 234 (1): 1–8. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09506.x>.

30. Van Teylingen M. Ornamental hosts of *Erwinia amylovora* and the effect of the fire blight control policy in the Netherlands. *Acta Hort.* 2002; 590: 81–87. URL: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.590.9>.

31. Belgian co-ordinated collections of micro-organisms. URL: <https://bccm.belspo.be/catalogues/lmg-search-results?LIST1=STRNUM&TEXT1=28361%20&LIST2=SPECIES&TEXT2=Erwinia%20amylovora&LIST3=ORIGSUBST&TEXT3=Sorbus&LIST4=ORIGIN&TEXT4=ALL%20FIELDS&TEXT5=&CONJ=OR&FIRSTITEM=101&PREVIOUSRANGE=50&RANGE=50> (last accessed: 09.10.2020).

32. Duffy B., Schärer H.-J., Bünter M., Klay A., Holliger E. Regulatory measures against *Erwinia amylovora* in Switzerland. *EPPO Bull.* 2005; 35 (2): 239–244.

33. Gavrilović V., Zivković S., Obradović A., Miličević S., Arsenijević M., Vojinović M. *Sorbus* sp. – new host of *Erwinia amylovora* in Serbia. *Acta Hort.* 2008; 793: 351–355. URL: <http://dx.doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.793.52>.

34. Bastas K. K. First Report of *Erwinia amylovora* on Firethorn (*Pyracantha coccinea*) and Mountainash (*Sorbus* sp.) in Turkey. *Plant Disease*. 2012; 96 (12): 1818. URL: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-12-0014-PDN>.

35. Ismail E., Blom J., Bultreys A., Ivanović M., Obradović A., van Doorn J., Bergsma-Vlami M., Maes M., Willems A., Duffy B., Stockwell V.O., Smits T., Puławska J. A novel plasmid pEA68 of *Erwinia amylovora* and the description of a new family of plasmids. *Archives of Microbiology*. 2014; 196 (12): 891–899.

36. Jock S., Rodoni B., Gillings M., Kim W.-S., Copes C., Merriman P., Geider K. Screening of

ornamental plants from the Botanic Gardens of Melbourne and Adelaide for the occurrence of *Erwinia amylovora* // Australasian Plant Pathology. – 2000. – Vol. 29, Issue 2. – P. 120–128. URL: <https://doi.org/10.1071/AP00020>.

37. ICMP 15973 – *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al. / Systematics Collections Data. URL: [https://scd.landcareresearch.co.nz/Specimen/ICMP%2015973?collection=ICMP&searchCollection=ICMP&query=Erwinia%20amylovora&appliedFacets=%7CpreferredName_ss%7CAria%20edulis%20\(Willd.\)%20M.Roem.¤tDisplayTab=list&pageNumber=0&sortField=relevance](https://scd.landcareresearch.co.nz/Specimen/ICMP%2015973?collection=ICMP&searchCollection=ICMP&query=Erwinia%20amylovora&appliedFacets=%7CpreferredName_ss%7CAria%20edulis%20(Willd.)%20M.Roem.¤tDisplayTab=list&pageNumber=0&sortField=relevance) (дата обращения: 09.10.2020).

38. Черпаков В.В. Бактериальные болезни лесных пород в патологии леса // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. – 2012. – Вып. 200. – С. 292–303.

39. Черпаков В.В. Рябина (*Sorbus* spp.) как модельный тест-объект при изучении бактериального ожога (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.) лесных пород // Известия Санкт-Петербургской лесотехнической академии. – 2015. – Вып. 211. – С. 174–188.

40. EPPO protocol for *E. amylovora*. PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora* // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2013. – Vol. 43, Issue 1. – P. 21–45.

41. СТО ВНИИКР 4.001-2010 «Возбудитель ожога плодовых деревьев *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. Методы выявления и идентификации». – П. Быково, Московская обл., 2010.

42. Дренова Н.В., Артемьева Т.В. Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя бактериального ожога плодовых культур. – Быково, 2018. – 73 с.

43. Gottsberger R.A. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora* // Letters in Applied Microbiology. – 2010. – Vol. 51, Issue 3. – P. 285–292.

44. Halgren A., Azevedo M., Mills D., Armstrong D., Thimmaiah M., McPhail K., Banowetz G. Selective inhibition of *Erwinia amylovora* by the herbicidally active germination-arrest factor (GAF) produced by *Pseudomonas* bacteria // J Appl Microbiol. – 2011. – Vol. 111, Issue 4. – P. 949–959. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05098.x>.

45. Lee X., Azevedo M.D., Armstrong D.J., Banowetz G.M., Reimann C. The *Pseudomonas aeruginosa* antimetabolite L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenic acid inhibits growth of *Erwinia amylovora* and acts as a seed germination-arrest factor // Environ Microbiol Rep. 2013; 5 (1): 83–89. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00395.x>.

46. Hassanein F., El-Goorani M. A. The Effect of *Bacillus subtilis* on in vitro Growth and Pathogenicity of Agrobacterium tumefaciens // Journal of Phytopathology. – 1991. – Vol. 133. P. 239–246.

47. Johnson K.B., Stockwell V.O. Management of fire blight: a case study in microbial ecology // Annu Rev Phytopathol. – 1998. – Vol. 36. – P. 227–248.

48. Seibold A., Fried A., Kunz S., Moltmann E., Lange E., Jelkmann W. Yeasts as antagonists against fire blight // EPPO Bulletin. – 2004. – Vol. 34, Issue 3. – P. 389–390.

49. Weißhaupt S., Köhl L., Kunz S., Hinze M., Ernst M., Schmid A., Voegelé R.T. Alternative Inoculum Sources for Fire Blight: the Potential Role of Fruit

37. ICMP 15973 – *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) Winslow et al. Systematics Collections Data. URL: [https://scd.landcareresearch.co.nz/Specimen/ICMP%2015973?collection=ICMP&searchCollection=ICMP&query=Erwinia%20amylovora&appliedFacets=%7CpreferredName_ss%7CAria%20edulis%20\(Willd.\)%20M.Roem.¤tDisplayTab=list&pageNumber=0&sortField=relevance](https://scd.landcareresearch.co.nz/Specimen/ICMP%2015973?collection=ICMP&searchCollection=ICMP&query=Erwinia%20amylovora&appliedFacets=%7CpreferredName_ss%7CAria%20edulis%20(Willd.)%20M.Roem.¤tDisplayTab=list&pageNumber=0&sortField=relevance) (last accessed: 09.10.2020).

38. Cherpakov V.V. Bacterial diseases of wood species in forest pathology [Bakterialnye bolezni lesnykh porod v patologii lesa]. *Izvestia Sankt-Peterburgskoj lesotekhniceskoj akademii*. 2012. 200: 292–303. (In Russian.)

39. Cherpakov V.V. Mountain ash (*Sorbus* spp.) as a model test taxon for studies of fire blight (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.) of forest species [Ryabina (*Sorbus* spp.) kak modelny test-obyekt pri izuchenii bakterialnogo ozhoga (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.) lesnykh porod]. *Izvestia Sankt-Peterburgskoj lesotekhniceskoj akademii*. 2015. 211: 174–188. (In Russian.)

40. EPPO protocol for *E. amylovora*. PM 7/20 (2) *Erwinia amylovora*. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 2013; 43 (1): 21–45.

41. STO VNIKR 4.001-2010 “The causative agent of the fire blight *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. Detection and identification methods”. Bykovo, Moscow region, 2010.

42. Drenova N.V., Artemieva T.V. Methodological recommendations for the detection and identification of the causative agent of fire blight. Bykovo, 2018. 73 p. (In Russian.)

43. Gottsberger R.A. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *Letters in Applied Microbiology*. 2010; 51 (3): 285–292.

44. Halgren A., Azevedo M., Mills D., Armstrong D., Thimmaiah M., McPhail K., Banowetz G. Selective inhibition of *Erwinia amylovora* by the herbicidally active germination-arrest factor (GAF) produced by *Pseudomonas* bacteria. *J Appl Microbiol*. 2011; 111 (4): 949–959. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05098.x>.

45. Lee X., Azevedo M.D., Armstrong D.J., Banowetz G.M., Reimann C. The *Pseudomonas aeruginosa* antimetabolite L-2-amino-4-methoxy-trans-3-butenic acid inhibits growth of *Erwinia amylovora* and acts as a seed germination-arrest factor. *Environ Microbiol Rep*. 2013; 5 (1): 83–89. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00395.x>.

46. Hassanein F., El-Goorani M. A. The Effect of *Bacillus subtilis* on in vitro Growth and Pathogenicity of Agrobacterium tumefaciens. *Journal of Phytopathology*. 1991; 133: 239–246.

47. Johnson K.B., Stockwell V.O. Management of fire blight: a case study in microbial ecology. *Annu Rev Phytopathol*. 1998; 36: 227–248.

48. Seibold A., Fried A., Kunz S., Moltmann E., Lange E., Jelkmann W. Yeasts as antagonists against fire blight. *EPPO Bulletin*. 2004; 34 (3): 389–390.

49. Weißhaupt S., Köhl L., Kunz S., Hinze M., Ernst M., Schmid A., Voegelé R.T. Alternative Inoculum Sources

Mummies and Non-Host Plants // Plant Pathology. – 2016. – Vol. 65, Issue 3. – P. 470–483.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Дренова Наталия Васильевна, начальник – старший научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия.

Кондратьев Максим Олегович, младший научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия.

Харченко Анжела Александровна, заведующая испытательной лабораторией Воронежского филиала ФГБУ «ВНИИКР», г. Воронеж, Россия.

Цымбал Юлия Сергеевна, агроном исследовательской лаборатории Воронежского филиала ФГБУ «ВНИИКР», г. Воронеж, Россия.

Сухолюзова Екатерина Александровна, младший научный сотрудник исследовательской лаборатории Пензенского филиала ФГБУ «ВНИИКР», г. Пенза, Россия.

Квашнина Наталья Алексеевна, кандидат биологических наук, ведущий агроном исследовательской лаборатории Пятигорского филиала ФГБУ «ВНИИКР», г. Пятигорск, Россия.

Джалилов Февзи Сеид-Умерович, доктор биологических наук, заведующий кафедрой защиты растений ФГБОУ ВО «РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева», г. Москва, Россия.

for Fire Blight: the Potential Role of Fruit Mummies and Non-Host Plants. *Plant Pathology*. 2016; 65 (3): 470–483.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nataliya Drenova, Head and Senior Researcher of Virology and Bacteriology Research and Methodology Department, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia.

Maksim Kondratyev, Junior Researcher, Virology and Bacteriology Research and Methodology Department, FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia.

Anzhela Kharchenko, Head of Test Laboratory, Voronezh Branch of FGBU “VNIICR”, Voronezh, Russia.

Yulia Tsymbal, Agronomist of Test Laboratory, Voronezh Branch of FGBU “VNIICR”, Voronezh, Russia.

Ekaterina Sukholozova, Junior Researcher, Test Laboratory, Penza Branch of FGBU “VNIICR”, Penza, Russia.

Natalia Kvashnina, PhD in Biology, Leading Agronomist, Test Laboratory, Pyatigorsk Branch of FGBU “VNIICR”, Pyatigorsk, Russia.

Fevzi Dzhaliylov, Doctor of Biology, Head of the Plant Protection Department, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia.