

Для самки червеца Комстока отличительным признаком является их наличие на тазаках задних конечностей, в отличие от близких видов, у которых просвечивающие поры отсутствуют на тазаках, а имеются только на бедрах и голенях. Просвечивающие поры у самки червеца Комстока многочисленные и присутствуют на тазике, бедре и голени задних конечностей (рис. 13).

ВЫВОДЫ

В ходе проведенного микроскопического исследования особенностей строения диагностических структур тела самки червеца Комстока, расположенных на вентральной и дорсальной поверхностях, получен иллюстративный сравнительный материал, который позволяет выявлять морфологическим методом отличительные признаки самки червеца Комстока, имеющего статус карантинного объекта.

Данная статья имеет практическое значение для сотрудников испытательных лабораторий в области карантина растений, проводящих энтомологические исследования на выявление карантинных видов мучнистых червецов, а также для специалистов в области защиты растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Данциг Е.М., Гаврилов-Зимин И.А. Псевдококциды (Homoptera: Coccinea: Pseudococcidae) Палеарктики. Часть 1. Подсемейство Pseudococcinae / Е.М. Данциг, И.А. Гаврилов-Зимин. – СПб: ЗИН РАН, 2014. – 678 с. (Фауна России и сопредельных стран. Новая серия, № 148. Насекомые хоботные).
 2. Данциг Е.М., Гаврилов-Зимин И.А. Псевдококциды (Homoptera: Coccinea: Pseudococcidae) Палеарктики. Часть 2. Подсемейство Pseudococcinae / Е.М. Данциг, И.А. Гаврилов-Зимин. – СПб: ЗИН РАН, 2015. – 619 с. (Фауна России и сопредельных стран. Новая серия, № 149. Насекомые хоботные).
 3. CABI, 2020. – URL: <https://www.cabi.org/about-cabi> (дата обращения: 20.03.2020).
 4. EPPO Global Database, 2020. – URL: <https://gd.eppo.int/taxon/PSECCO> (дата обращения: 15.04.2020).
 5. Granara de Willink M.C., González P. Revisión taxonómica de *Pseudococcus* Westwood (Hemiptera: Pseudococcidae) de Centro y Sud América con descripciones de especies nuevas // *Insecta Mundi*. – 2018.
 6. Moghaddam M. A review of the mealybugs (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae, Putoidae and Rhizoecidae) of Iran, with descriptions of four new species and three new records for the Iranian fauna // *Zootaxa*. – 2013. – Vol. 3632, No. 1. – P. 1–107.
 7. Scale Insects. – URL: <http://www.idtools.org/id/scales/index.php> (дата обращения: 20.05.2020).
 8. Williams D.J., & Granara de Willink M.C. Mealybugs of Central and South America. – London, England: CAB International, 1992. – 635 p.

Translucent pores on hind legs of a female Comstock mealybug

Translucent pores are disc pores located on hind legs of mealybug females.

Presence of translucent pores on hind coxae is a distinctive feature of a female Comstock mealybug unlike closely related species that do not possess translucent pores on coxae but only on femurs and tibiae. Female Comstock mealybugs have numerous translucent pores on hind coxa, femur and tibia (Fig. 13).

CONCLUSION

Illustrative comparative material obtained from this microscopic study of the morphological characters of diagnostic structures of a female Comstock mealybug situated on the dorsal and ventral surfaces, allows, by using a morphological method, to identify distinctive features of a female Comstock mealybug that is of quarantine status.

This article has a practical importance for the staff of plant quarantine testing laboratories who carry out entomological research in order to identify quarantine species of mealybugs, as well as for the plant protection specialists.

REFERENCES

1. Danzig E.M., Gavrilov-Zimin I.A. Pseudococcidae (Homoptera: Coccinea: Pseudococcidae) of Palearctic. Part 1. Subfamily Pseudococcinae. [Pseudococcidy (Homoptera: Coccinea: Pseudococcidae) Palearktiki. Chast 1. Podsemejstvo Pseudococcinae] St. Petersburg: ZIN RAN, 2014. (Fauna of Russia and neighbouring countries. New series, No. 148. Insecta: Homoptera) (In Russian).
 2. Danzig E.M., Gavrilov-Zimin I.A. Pseudococcidae (Homoptera: Coccinea: Pseudococcidae) of Palearctic. Part 2. Subfamily Pseudococcinae. [Pseudococcidy (Homoptera: Coccinea: Pseudococcidae) Palearktiki. Chast 2. Podsemejstvo Pseudococcinae] St. Petersburg: ZIN RAN, 2015. (Fauna of Russia and neighbouring countries. New series, No. 149. Insecta: Homoptera) (In Russian).
 3. CABI, 2020. URL: <https://www.cabi.org/about-cabi> (accessed date: 20.03.2020).
 4. EPPO Global Database, 2020. URL: <https://gd.eppo.int/taxon/PSECCO> (accessed date: 15.04.2020).
 5. Granara de Willink M.C., González P. Revisión taxonómica de *Pseudococcus* Westwood (Hemiptera: Pseudococcidae) de Centro y Sud América con descripciones de especies nuevas. *Insecta Mundi*. 2018.
 6. Moghaddam M. A review of the mealybugs (Hemiptera: Coccoidea: Pseudococcidae, Putoidae and Rhizoecidae) of Iran, with descriptions of four new species and three new records for the Iranian fauna. *Zootaxa*. 2013; 3632 (1): 1–107.
 7. Scale Insects. URL: <http://www.idtools.org/id/scales/index.php> (accessed date: 20.05.2020).
 8. Williams D.J., & Granara de Willink M.C. Mealybugs of Central and South America. London, England: CAB International, 1992. 635 p.

УДК 579.26.632.3.01/.08

Характеристика и распространение возбудителя бактериальной пятнистости цветной капусты *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al.

С.И. ПРИХОДЬКО, научный сотрудник – заведующая лабораторией бактериологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР», e-mail: svetlana.prik@yandex.ru

А.Б. ЯРЕМКО, младший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР», e-mail: an_ya94@mail.ru

К.П. КОРНЕВ, к. б. н., заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР», e-mail: konstantin.kornev@gmail.com

Аннотация. В статье представлены общие сведения о происхождении, таксономии, биологии, географическом распространении и основных методах диагностики возбудителя бактериальной пятнистости цветной капусты – *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al. Возбудитель бактериальной пятнистости включен в список вредных организмов, имеющих карантинное значение для Китая, Израиля, Египта и Мексики. На базе лаборатории бактериологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР» были проведены исследования образцов рапса, которые получены из мест выращивания экспортных семян, предназначенных только для переработки. Мониторинг распространения вредного организма на территории РФ проводился в некоторых регионах Дальневосточного и Сибирского федеральных округов. Диагностику образцов вегетативных частей рапса осуществляли методами как классическими микробиологическими, так и молекулярно-генетическими.

Ключевые слова. Бактериальная пятнистость цветной капусты, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, экспорт, рапс, мониторинг, лабораторное исследование, микробиологический посев, секвенирование.



ВВЕДЕНИЕ

условиях развития рыночных отношений Российской Федерации с Китайской Народной Республикой в части экспорта зерновой продукции,

UDC 579.26.632.3.01/.08

Characterization and spread of bacterial leaf spot of cabbage *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al.

S.I. PRIKHODKO, Senior Researcher, Head of the Bacteriology Laboratory of the Laboratory Testing Center of FGBU “VNIICR”, e-mail: svetlana.prik@yandex.ru

A.B. IAREMKO, Junior Researcher of the Scientific Department for Molecular Genetic Diagnostic Methods of FGBU “VNIICR”, e-mail: an_ya94@mail.ru

K.P. KORNEV, PhD in Biology, Deputy Head of FGBU “VNIICR”, e-mail: konstantin.kornev@gmail.com

Abstract. The article presents general information about the origin, taxonomy, biology, geographical distribution and the main diagnostic methods of bacterial leaf spot of cabbage *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al. Bacterial leaf spot of cabbage is included in the list of pests of quarantine importance for China, Israel, Egypt and Mexico. The bacteriology laboratory of the Testing Laboratory Center of FGBU “VNIICR” analyzed rape samples, obtained from the places where export seeds intended only for processing are cultivated. Pest spread on the territory of Russia was monitored in some regions of the Far Eastern and Siberian Federal Districts. Samples of vegetative parts of rape were diagnosed by classical microbiological and molecular genetic techniques.

Keywords. Bacterial leaf spot of cabbage, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, export, rape, monitoring, laboratory testing, microbiological inoculation, sequencing.

INTRODUCTION

In the conditions of development of market relations between the Russian Federation and the People’s Republic of China in terms of export of grain products, corn, soybean, rice and rape, compliance of plant production areas with phy-

кукурузы, сои, риса и рапса огромное значение приобретает соответствие мест производства растительной продукции фитосанитарным требованиям страны-импортера.

Согласно протоколу между Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору Российской Федерации и Главным государственным управлением по контролю качества, инспекции и карантину Китайской Народной Республики, семена рапса, предназначенные для экспорта в Китай, должны быть выращены в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах. В местах производства страной-экспортером проводятся мониторинги распространения вредных организмов, имеющих карантинное значение для КНР.

Одним из показателей, отсутствие которого в местах производства экспортных семян рапса регламентируется соответствующими требованиями КНР, является возбудитель бактериальной пятнистости цветной капусты *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al. В этой связи исследовательские мероприятия с дальнейшей диагностикой бактериального возбудителя на этапе выращивания растительной продукции позволяют выявить свободные от фитопатогена зоны производства рапса.

Целью настоящего исследования стало описание основных характеристик возбудителя бактериальной пятнистости цветной капусты *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al. и установление распространения фитопатогена на территории Российской Федерации в регионах производства рапса, предназначенного для экспортных целей.

В ходе проведения исследования авторами решались следующие задачи:

1. Проанализировать имеющиеся мировые литературные данные касательно сведений о происхождении, таксономии, биологии и экологии, географическом распространении в мире и основных методах диагностики возбудителя бактериальной пятнистости цветной капусты – *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al.

2. Провести лабораторное исследование образцов вегетативных частей рапса на присутствие *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ВОЗБУДИТЕЛЕ

Возбудитель относится к типу Proteobacteria, классу Gammaproteobacteria, семейству Pseudomonadaceae, роду *Pseudomonas* [10].

Клетки бактерии *P. s. pv. maculicola* представляют собой короткие граммотрицательные палочки с закругленными краями, подвижные лопотрихи, спор не образуют, аэробы. Размер клеток составляет 0,9 x 1,5–3,0 мкм [4, 9].

Впервые возбудитель бактериальной пятнистости был описан в 1911 г. на цветной капусте,



Рис. 1. Географическое распространение *P. s. pv. maculicola* в мире (<https://www.cabi.org/cpc/datasheet/44973>)

Fig. 1. Geographical distribution of *P. s. pv. maculicola* in the world (<https://www.cabi.org/cpc/datasheet/44973>)

tosanitary requirements of the importing country acquires great importance.

According to the protocol between the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance of the Russian Federation and the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, rape seeds intended for export to China must be grown in the Siberian and Far Eastern Federal Districts. At the places of production, the exporting country monitors the spread of pests of quarantine importance to China.

One of the pathogens is bacterial leaf spot of cabbage *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al. Its absence at the places of production of rape seeds is regulated by the relevant requirements of China. In this regard, survey activities with further diagnosis of the bacteria at the stage of plant production will make it possible to identify phytopathogen-free areas of rape production.

The purpose of this study was to describe the main characteristics of bacterial leaf spot of cabbage *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al. and to establish the spread of the phytopathogen in the regions of the Russian Federation where rape is produced for export purposes.

In the course of the study, the authors solved the following tasks:

1. Analysis of the available international literature data concerning information on origin, taxonomy, biology and ecology, world geographical spread and main diagnostic methods of bacterial leaf spot of cabbage *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (McCulloch) Young et al.

2. Laboratory testing of samples of rape vegetative parts for the presence of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*.

GENERAL INFORMATION ABOUT THE PATHOGEN

The pathogen belongs to the Proteobacteria type, Gammaproteobacteria class, Pseudomonadaceae family, *Pseudomonas* genus [10].



Рис. 2. Симптомы бактериальной пятнистости на белокачанной капусте (<https://www.nexles.com>, 2018 г.)

Fig. 2. Symptoms of bacterial leaf spot on white cabbage (<https://www.nexles.com>, 2018)

выращенной в Вирджинии (США), и получил название *Bacterium maculicolum* (McCulloch, 1911). В 1913 г. бактерия была переименована в *Pseudomonas maculicola* (McCulloch) Stevens. В 1966 г. в Новой Зеландии с цветной капусты (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) был изолирован штамм *Pseudomonas maculicola* [15]. В настоящее время типовой штамм *P. s. pv. maculicola* хранится в мировых бактериологических коллекциях, таких как Национальная коллекция патогенных бактерий растений (Англия); Международный центр микробиологических ресурсов – Французская коллекция бактерий, ассоциированных с растениями; Международная коллекция растительных микроорганизмов (Новая Зеландия); Бельгийская коллекция микроорганизмов. В этих коллекциях указанный типовой штамм хранится под номерами NCPPB 2039, CFBP 1657, ICMP 3935, LMG 5071.

В 1978 г. Young et al. установили, что возбудитель бактериальной пятнистости является патоваром *maculicola* вида *Pseudomonas syringae*. Позднее, в 2015 г., расшифрован полный геном штамма и подтверждена его таксономическая принадлежность [7].

Бактерия распространена во многих странах (рис. 1), возделывающих культурные растения семейства Brassicaceae, в том числе на территории бывшего СССР [5].

В Японии симптомы бактериальной пятнистости впервые были выявлены в 1931 г. на пекинской капусте, а в 1932 г. они были обнаружены на дайконе, выращенном на острове Тайвань [15]. В 1992 г. опубликовано первое упоминание о присутствии возбудителя бактериальной пятнистости в Аргентине на брюссельской капусте [6]. В 2004 г. *P. s. pv. maculicola* вызвала вспышку бактериальной пятнистости на цветной капусте в Австралии [13]. Возбудитель широко распространен на территории США. Так, в 90-х годах XX века в Оклахоме

Cells of the bacterium *P. s. pv. maculicola* are short gram-negative rods with rounded edges, mobile lophotrichs. They do not form spores and are aerobes. Cell size is 0.9 x 1.5–3.0 μm [4, 9].

The pathogen of bacterial leaf spot of cabbage was first described in 1911 on cauliflower grown in Virginia (USA) and was called *Bacterium maculicolum* (McCulloch, 1911). In 1913, the bacterium was renamed *Pseudomonas maculicola* (McCulloch) Stevens. In 1966 in New Zealand the strain *Pseudomonas maculicola* (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) was isolated from cauliflower [15]. At present, a typical strain of *P. s. pv. maculicola* is stored in world bacteriological collections, such as the National Collection of Plant Pathogenic Bacteria (England); International Centre for Microbiological Resources – French collection of plant associated bacteria; International Collection of Microorganisms from Plants (New Zealand); and Belgian Coordinated Collections of Microorganisms. In these collections, the specified standard strain is stored under numbers NCPPB 2039, CFBP 1657, ICMP 3935, LMG 5071.

In 1978, Young et al. established that bacterial leaf spot of cabbage is the pathovar *maculicola* of the species *Pseudomonas syringae*. Later, in 2015, the complete genome of the strain was sequenced and its taxonomic identity was confirmed [7].

The bacterium is widespread in many countries (Fig. 1) that cultivate plants of the Brassicaceae family, including the former USSR territory [5].

In Japan, symptoms of bacterial leaf spot of cabbage were first detected in 1931 on Chinese cabbage, and in 1932 they were found on a daikon grown on the island of Taiwan [15]. In 1992, the presence of bacterial leaf spot of cabbage in Argentina on Brussels sprouts was first recorded [6]. In 2004 *P. s. pv. maculicola* caused an outbreak of bacterial leaf spot of cabbage in Australia [13].

The pathogen is widely spread in the USA. Thus, in the 1990s in Oklahoma, bacterial leaf spot of cabbage caused significant damage to such cultures as cabbage, spinach, mustard and turnip [16]. There are also data on outbreaks of bacterial leaf spot of cabbage on cruciferous plants in France [11].

Bacterial leaf spot of cabbage affects Brassicaceae plants, such as Chinese mustard (*Brassica juncea* var. *juncea*), cauliflower (*B. oleracea* var. *botrytis*), Brussels sprouts (*B. oleracea* var. *gemmifera*), asparagus broccoli (*B. oleracea* var. *italica*), Chinese cabbage (*B. rapa* subsp. *pekinensis*), garden radish (*Raphanus sativus*), black mustard (*Brassica nigra*), cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*), kohlrabi (*B. oleracea* var. *gongylodes*), borecole (*B. oleracea* var. *viridis*), forage turnip (*B. rapa* subsp. *rapa*), rape (*B. Napus*), and others. But cauliflower, white and red cabbage are the most damaged plants [4, 9, 17].

At present, diagnostic methods of bacterial leaf spot of cabbage are limited to isolation on the nutrient medium with subsequent identification of isolates by biochemical methods [2]. However, even when isolating the bacterium on the nutrient medium, it is possible to identify the culture only to the species *Pseudomonas syringae* sp. [14]. Molecular techniques are limited to the identification of the genus *Pseudomonas* sp. The *maculicola* pathovar is heterogeneous and has similarity both

бактериальная пятнистость нанесла значительный ущерб таким культурам, как капуста, шпинат, горчица и репа [16]. Также есть данные о вспышках бактериальной пятнистости на крестоцветных во Франции [11].

Бактериальная пятнистость цветной капусты поражает растения семейства Brassicaceae, такие как горчица сарептская (*Brassica juncea* var. *juncea*), цветная капуста (*B. oleracea* var. *botrytis*), брюссельская капуста (*B. oleracea* var. *gemmifera*), брокколи (*B. oleracea* var. *italica*), пекинская капуста (*B. rapa* subsp. *pekinensis*), редька (*Raphanus sativus*), горчица черная (*Brassica nigra*), кочанная капуста (*B. oleracea* var. *capitata*), кольраби (*B. oleracea* var. *gongylodes*), листовая капуста (*B. oleracea* var. *viridis*), репа (*B. rapa* subsp. *rapa*), рапс (*B. napus*) и другие. Но больше всего повреждается цветная, бело- и краснокочанная капуста [4, 9, 17].

В настоящее время методы диагностики возбудителя бактериальной пятнистости цветной капусты ограничиваются изоляцией на питательную среду с последующей идентификацией изолятов биохимическими методами [2]. Но даже при выделении бактерии на питательной среде, можно идентифицировать культуру только до вида *Pseudomonas syringae* sp. [14]. Молекулярные же методы ограничиваются определением рода *Pseudomonas* sp. Патовар *maculicola* является гетерогенным и имеет сходство как в патогенезе, так и генетически с другими патоварами *P. syringae* [15, 17]. Поэтому важной задачей является разработка методов, позволяющих идентифицировать *P. s. pv. maculicola*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований являлись вегетативные части рапса *Brassica napus* L.

Образцы рапса получали из следующих регионов РФ: Республики Хакасия, Красноярского края, Алтайского края, Забайкальского края, Кемеровской, Томской, Омской, Иркутской и Новосибирской областей.

Поступившие в лабораторию образцы осматривали на наличие симптомов бактериальной пятнистости. Затем фрагменты растительной ткани помещали в контейнер с фосфатным буфером и встряхивали при 200 об/мин в течение 90 мин. Мацерат фильтровали через обеззоленный фильтр и концентрировали при 8000 об/мин. Полученный концентрат ресуспендировали в 1 мл фосфатно-солевого буфера.

Растительный экстракт использовали для посева на среду Кинга Б [14, 16].

Колонии с характерными культуральными признаками *Pseudomonas syringae* отбирали для выделения нуклеиновых кислот методом кипячения (нагревания при температуре 96 °C в течение 10 мин с последующим охлаждением).

Суспензию нуклеиновых кислот использовали для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) в соответствии с Kazempour et al., 2010 [12] с праймерами PSF/PSR. Для постановки реакции применяли готовую смесь для ПЦР 5x ScreenMix («Евроген», Россия).

Амплификацию проводили на термоциклере модели T100 (Bio-Rad, США) с последующей визуализацией результатов ПЦР методом горизонтального электрофореза в 1,5%-м трисборатном

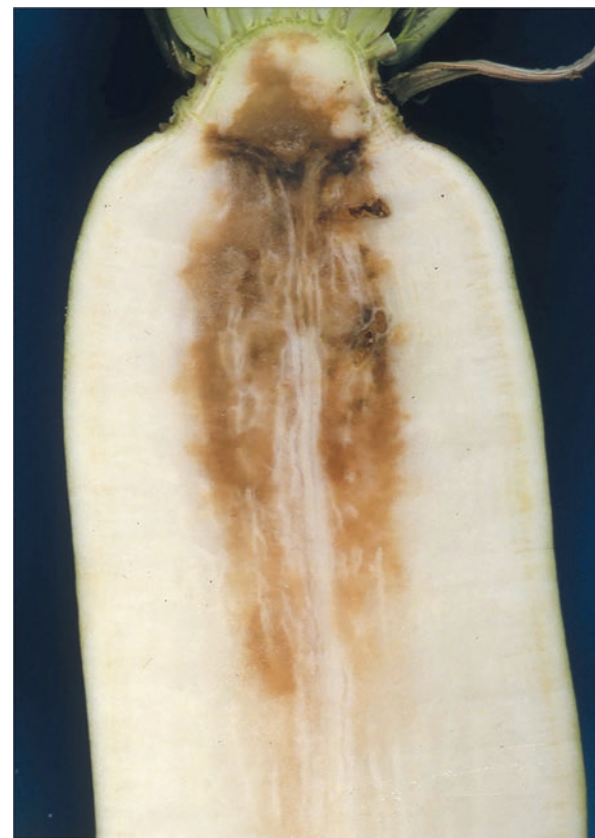


Рис. 3. Гниль японской редьки (дайкона) *Raphanus sativus* var. *longipinnatus*, вызванная *P. s. pv. maculicola*, группа II (Y. Takikawa, F. Takahashi, 2014 [15])

Fig. 3. Rot of Chinese radish (daikon) *Raphanus sativus* var. *longipinnatus* caused by *P. s. pv. maculicola*, group II (Y. Takikawa, F. Takahashi, 2014 [15])

in pathogenetically and genetically with other *P. syringae* pathovars [15, 17]. It is therefore important to develop methods to identify *P. s. pv. maculicola*.

MATERIALS AND METHODS

The object of research was vegetative parts of rape *Brassica napus* L.

Rape samples were obtained from the following regions of the Russian Federation: Republic of Khakassia, Krasnoyarsk Krai, Altai Krai, Transbaikal Krai, Kemerovo, Tomsk, Omsk, Irkutsk and Novosibirsk Oblast.

Samples submitted to the laboratory were examined for symptoms of bacterial leaf spot of cabbage. Then fragments of plant tissue were placed in a container with a phosphate buffer and shaken at 200 rpm for 90 min. Macerate was filtered through an ash filter and concentrated at 8000 rpm. The obtained concentrate was resuspended in 1 ml of phosphate-salt buffer.

The plant extract was used for inoculation on King B medium [14, 16].

Colonies with characteristic cultural features of *Pseudomonas syringae* were selected for the extraction of nucleic acids by boiling (heating at 96 °C for 10 min with subsequent cooling).

The nucleic acid suspension was used for polymerase chain reaction (PCR) according to Kazempour

агарозном геле, окрашенном 1%-м раствором бромистого этидия. Визуализацию продуктов ПЦР осуществляли на гелъдокументирующей системе Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

В случае получения ПЦР-продуктов определяли их нуклеотидную последовательность методом секвенирования на генетическом анализаторе 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™, США). Выравнивание и редактирование последовательностей вручную проводили с помощью программы CodonCode Aligner v.7.0 (Green, 2017), проверку и сравнение полученных нуклеотидных последовательностей с последовательностями базы данных GenBank выполняли с помощью программы NCBI BLAST [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

При проведении обследования мест производства рапса особое внимание уделяли наличию симптомов на вегетирующих растениях.

В полевых условиях симптомы заболевания проявляются на листьях растений на начальном этапе в виде небольших водянистых пятен – угловатых или округлых. Впоследствии пятна сливаются в более крупные вытянутые пятна темно-коричневого или фиолетового цвета, окруженные хлоротичным ореолом (рис. 2). Размер пятен может достигать от 3 до 7 мм. Особенно отчетливо симптомы пятнистости проявляются на нижней стороне листа. Такие повреждения искажают форму листа и придают ему морщинистый, шероховатый вид. При сильном повреждении листья усыхают и опадают, а всходы растений могут погибнуть. Если всходы выживают, в дальнейшем такие растения сильно отстают в росте и не образуют семян [1, 3, 4].

Бактериоз поражает как вегетативные, так и генеративные части растения. На соцветиях цветной капусты пятнистость носит поверхностный характер, но с течением заболевания инфекция проникает в глубь тканей, приводя к их разрушению. Цвет пятен варьирует от коричневых до серовато-коричневых. Пораженные головки быстро гниют в результате проникновения вторичной сапрофитной микрофиты [4, 5].

При поражении цветоносов наблюдаются черно-бурые пятна неопределенной формы, что впоследствии приводит к значительному снижению качества семян. Снаружи и внутри створок стручков зараженных растений также образуются черные пятна, имеющие блестящую поверхность. Бактериальная инфекция переходит со стручков на семена, которые позднее становятся черными [4, 5].

Также бактерия может вызывать симптомы гнили корнеплодов на редьке, дайконе и других растениях семейства Brassicaceae (рис. 3).

et al., 2010 [12] with PSF/PSR primers. The ready mixture for PCR 5x ScreenMix (Evrogen, Russia) was used for reaction.

Amplification was carried out on a thermal cycler of model T100 (Bio-Rad, USA) with subsequent visualization of PCR results by horizontal electrophoresis in 1.5% trisborate agarose gel painted with 1% ethidium bromide solution. Visualization of PCR products was carried out on gel-documenting system Gel Doc XR+ (Bio-Rad, USA).

If PCR products were obtained, their nucleotide sequence was determined by sequencing on the 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™, USA). Sequences were manually aligned and edited using CodonCode Aligner v.7.0 (Green, 2017); the verification and comparison of the obtained nucleotide sequences with the sequences in the GenBank database was performed using NCBI BLAST [8].

RESULTS AND DISCUSSIONS

When surveying rape production sites, special attention was paid to the presence of symptoms on vegetative plants.

In the field, symptoms appear on plant leaves at first in the form of small angular or rounded watery spots. Subsequently, the spots merge into larger elongated spots of dark brown or purple color, surrounded

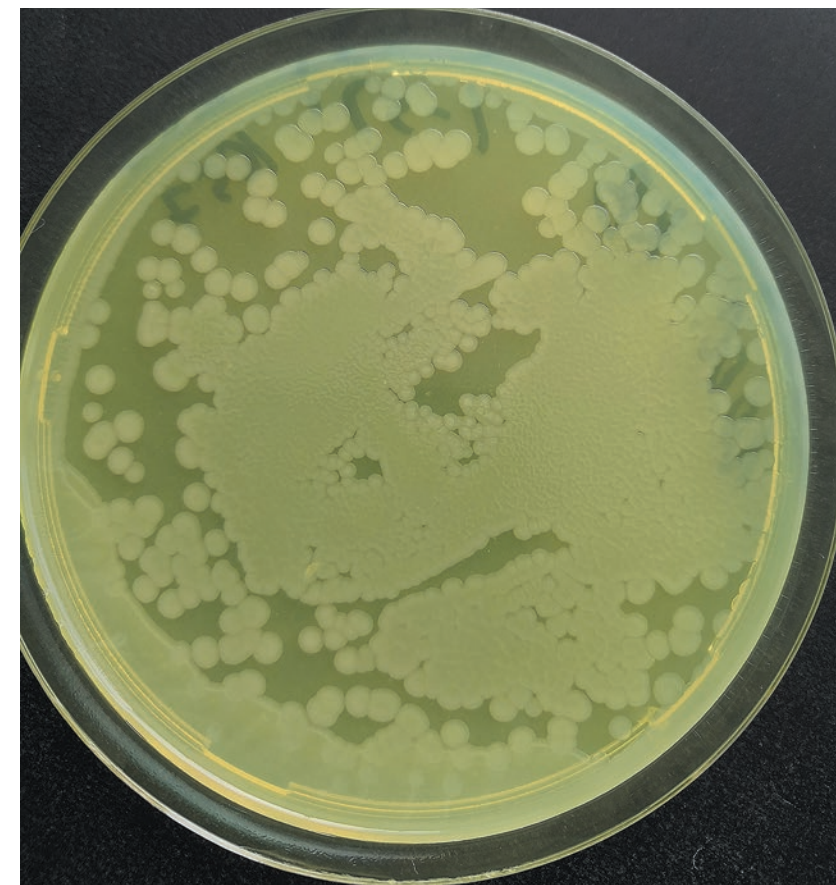


Рис. 4. Культура *P. s. pv. maculicola* (штамм CFBP 1657) на среде Кинга Б через 72 ч (фото А.Б. Яремко)

Fig. 4. Culture of *P. s. pv. maculicola* (strain CFBP 1657) on King B medium after 72 hours (photo by A.B. Iaremko)



Рис. 5. Культура *P. s. pv. maculicola* на безглюкозном пептонно-дрожжевом агаре через 48 ч (фото А.Б. Яремко)

Fig. 5. Culture of *P. s. pv. maculicola* glucose-free pepton-yeast agar after 48 hours (photo by A.B. Iaremkov)

Распространению заболевания способствует влажная, прохладная погода, заморозки. Таким образом, бактерии в течение вегетационного сезона передаются от растения к растению через дождевую и поливную воду. Бактерии длительное время, как минимум год, способны сохраняться в почве и растительных остатках, откуда фитопатоген проникает в здоровые растения через устьица, механические повреждения, вызывая новую вспышку заболевания [1, 3, 4].

Есть данные о переносе инфекции с насекомыми и сорными растениями семейства Крестоцветные. Поэтому профилактика бактериоза должна представлять комплекс мер, включая борьбу с насекомыми и сорняками, а также использование здорового посадочного материала, обработку семян и применение устойчивых сортов. Основным путем распространения на большие расстояния являются зараженные семена и рассада [1, 3].

В ходе мониторинга распространения на территории РФ вредных организмов, имеющих карантинное значение для Китая, лабораторией бактериологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР» в 2019 г. были проанализированы 250 образцов вегетативных частей рапса.

P. s. pv. maculicola на среде Кинга Б образовывала диффузный флуоресцирующий пигмент (рис. 4), служивший диагностическим признаком при анализе микробиологического посева.

В результате анализа генетических последовательностей большинство изолированных штаммов были отнесены к видам *Pseudomonas fluorescens* и *P. putida*. В ходе исследований образцов экспортного рапса не было выявлено представителей вида *Pseudomonas syringae*.

by a chlorotic halo (Fig. 2). The size of the spots can reach from 3 to 7 mm. The symptoms of spotting are particularly pronounced on the underside of the leaf. Such damage distorts the shape of the leaf and give it a wrinkled, roughish look. If the damage is severe, the leaves die back and fall off, and the young plants may die. If the seedlings survive, the plants lag far behind in growth and do not form seeds [1, 3, 4].

Both vegetative and generative parts of the plant are affected by bacteriosis. At first the spotting is located on the surface of cauliflower inflorescences, but as the disease progresses infection penetrates deep into tissues, leading to their destruction. The color of the spots varies from brown to grayish-brown. Affected capitates rot quickly as a result of secondary saprophyte microbiota penetration [4, 5].

Black and brown spots of undefined shape are observed in the affected pedicels, which subsequently lead to a significant decrease in seed quality. Black spots

with shiny surface are also formed outside and inside the pods of infected plants. Bacterial infection passes from pods to seeds, which later become black [4, 5].

The bacteria may also cause symptoms of root rot on radish, daikon and other Brassicaceae plants (Figure 3).

Wet, cool weather and frost contribute to the spread of the disease. During the growing season, bacteria are transmitted from plant to plant through rainwater and irrigation. Bacteria are able to persist for at least a year in soil and plant residues, from where the phytopathogen penetrates into healthy plants through stomata, mechanical lesions, causing a new outbreak of disease [1, 3, 4].

There are data on the transfer of infection with insects and weeds of the cruciferous plants. Therefore, bacteriosis should be prevented by a set of measures, including insect and weed control, as well as the use of healthy propagative material, seed treatment, resistant varieties. Contaminated seeds and seedlings are the main means of long-range spread [1, 3].

In the course of monitoring the spread of pests of quarantine importance to China on the territory of the Russian Federation, 250 samples of rape vegetative parts were analyzed by the bacteriology laboratory of the Laboratory Testing Center of FGBU "VNIICR" in 2019.

P. s. pv. maculicola formed on King B medium a diffuse fluorescent pigment (Fig. 4), which served as a diagnostic feature in the analysis of microbiological inoculation.

Согласно исследованиям японских ученых [15], различные изоляты *P. s. pv. maculicola* были разделены на 4 группы по культуральным признакам и симптоматике на растениях-хозяевах. Группы III и IV образовывали непрозрачные, слизистые, выпуклые с ровным краем колонии на чашках с безглюкозным пептонно-дрожжевым агаром (рис. 5), а изоляты групп I и II образовывали прозрачные выпуклые колонии на этой среде. Колонии группы IV впоследствии становились крупнее (на 2–3 мм), чем колонии группы III, через 3 дня при 28 °C. Впоследствии к группе I было отнесено большинство изолятов из мировых коллекций, в том числе новозеландский типовой изолят с цветной капусты и 1 изолят с цветной капусты из Японии. В группу II вошли изоляты, полученные с дайкона и вызывавшие мелкую пятнистость листьев и гниль корня, также британский изолят с горчицы. В группу III вошли изоляты с пекинской капусты, репы, бок-чоя (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*) и цветной капусты из Японии. В группу IV вошли изоляты с дайкона из Японии, вызывавшие крупные некрозы, и с редиса из США. Впоследствии группа IV была отнесена к *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis*.

Таким образом, для диагностики возбудителя требуется комплексный подход в связи с высоким культурально-морфологическим и генетическим сходством патоваров внутри вида *Pseudomonas syringae*, а также возможностью поражения растений-хозяев другими фитопатогенами со сходной симптоматикой течения инфекции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее в России бактериальные болезни рапса были изучены в недостаточной степени. При этом исследования, заключающиеся в определении культурально-морфологических, биохимических свойств, являются актуальными методами лабораторных исследований возбудителя бактериальной пятнистости цветной капусты. Поэтому диагностика *P. s. pv. maculicola* представляет собой комплекс методов, включающих обязательное выделение чистой культуры патогена и работу с симптомным материалом.

Анализ существующих данных показал необходимость разработки и совершенствования методов диагностики, позволяющих достоверно выявить и идентифицировать бактерию *P. s. pv. maculicola* для своевременного обнаружения заболевания в растительном материале и семенах рапса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Габор Б., Као Дж., Краузе Д. Руководство по болезням крестоцветных. Практическое пособие для семеноводов, овощеводов и консультантов по сельскому хозяйству. – Seminis, 2013. – 50 с.
2. Матвеева Е.В., Игнатов А.Н., Политыко В.А., Фокина В.Г. Бактериальные болезни рапса // Защита и карантин растений. – 2008. – С. 23–24.
3. Стандарт ЕОКЗР PP 2/7 (1) Guidelines on good plant protection practice. Vegetable brassicas // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 1996. – No. 26. – P. 311–347.
4. Станчева Й. Атлас болезней сельскохозяйственных культур I. Болезни овощных культур. – София – Москва: Пенсофт, 2005. – 181 с.
5. AgroAtlas, 2020. – URL: <http://www.agroAtlas.ru> (дата обращения: 06.06.2020).

As a result of genetic sequence analysis, most isolated strains were attributed to *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. No representatives of the species *Pseudomonas syringae* were identified in the studies of export rape samples.

According to studies by Japanese researchers [15], various isolates of *P. s. pv. maculicola* were divided into 4 groups according to cultural features and symptomatology on host plants. Groups III and IV formed opaque, mucous, convex colonies in dishes with glucose-free pepton-yeast agar (Fig. 5), and isolates of groups I and II formed transparent convex colonies on this medium. Colonies of group IV later became larger (by 2–3 mm) than colonies of group III, after 3 days at 28 °C. Subsequently, most of the isolates from the world collections were assigned to group I, including New Zealand colonies of cauliflower and 1 colony of cauliflower from Japan. Group II included isolates derived from daikon that caused fine small leaf spotting and root rot, and British mustard isolate. Group III included isolates from Beijing cabbage, turnips, bok choy (*Brassica rapa* subsp. *chinensis*) and cauliflower from Japan. Group IV included isolates from Japanese daikon, which caused large necrosis, and from radish from the United States. Group IV was subsequently assigned to *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis*.

Thus, to diagnose the pathogen a comprehensive approach is required due to the high cultural, morphological and genetic similarity of the pathovars within the species *Pseudomonas syringae*, as well as the possibility of the host plants to be affected by other phytopathogens with similar symptoms of the infection course.

CONCLUSION

Previously, bacterial diseases of rape were insufficiently studied in Russia. At the same time, the studies, which determine cultural, morphological and biochemical properties, are actual methods of laboratory tests of bacterial leaf spot of cabbage. That is why diagnosis of *P. s. pv. maculicola* is a complex of methods that includes the required isolation of the pure culture of the pathogen and the handling of the symptomatic material.

The analysis of existing data has shown the need to develop and improve diagnostic methods to reliably detect and identify the bacteria *P. s. pv. maculicola* for timely detection of the disease in plant material and rape seeds.

REFERENCES

1. Gabor B., Kao J., Krauze D. Crucifer Disease Guide. A practical guide for seed growers, vegetable growers and agricultural consultants. Seminis, 2013. 50 p. (in Russian).
2. Matveeva E.V., Ignatov A.N., Polityko V.A., Fokina V.G. Rape bacterial diseases [Bakterialnye bolezni rapsa]. *Plant Health and Quarantine*. 2008; 23–24 (in Russian).
3. EPPO Standard PP 2/7 (1) Guidelines on good plant protection practice. Vegetable brassicas. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. 1996; 26: 311–347.

6. Alippi A.M., Ronco L. First Report of Crucifer Bacterial Leaf Spot Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Argentina // Plant Disease. – 1996. – Vol. 80. – P. 223.
7. Bartoli C., Carrere S., Lamichhane J.R., Varvaro L., Morris C.E. Whole-Genome Sequencing of 10 *Pseudomonas syringae* Strains Representing Different Host Range Spectra // Genome Announcements. – 2015. – Vol. 3, No. 2. – P. 1–3.
8. Basic local alignment search tool / NCBI. – URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 06.06.2020).
9. CABI, 2020. – URL: <https://www.cabi.org> (дата обращения: 06.06.2020).
10. EPPO Global Database, 2020. – URL: <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMMC> (дата обращения: 06.06.2020).
11. Gironde S., Manceau C. Housekeeping Gene Sequencing and Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis To Identify Subpopulations within *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* That Correlate with Host Specificity // Applied and Environmental Microbiology. – 2012. – Vol. 78, No. 9. – P. 3266–3279.
12. Kazempour M.N., Kheyrghoo M., Pedramfar H., Rahimian H. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran // African Journal of Biotechnology. – 2010. – Vol. 9, No. 20. – P. 2860–2865.
13. Peters B.J., Ash G.J., Cother E.J., Hailstones D.L., Noble D.H., Urwin N.A.R. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Australia: pathogenic, phenotypic and genetic diversity // Plant Pathology. – 2004. – Vol. 53. – P. 73–79.
14. Shaad N.W., Jones J.B., Chun W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (3rd edition). – APS Press, 2001. – 373 p.
15. Takikawa Y., Takahashi F. Bacterial leaf spot and blight of crucifer plants (Brassicaceae) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *P. cannabina* pv. *Alisalensis* // J Gen Plant Pathol. – 2014. – Vol. 80. – P. 466–474.
16. Zhao Y., Damicone J.P., Demezas D.H., Rangaswamy V., Bender C.L. Bacterial Leaf Spot of Leafy Crucifers in Oklahoma Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* // Plant Disease. – 2000. – Vol. 84, No. 9. – P. 1015–1020.
17. Zhao Y., Damicone J.P., Bender C.L. Detection, Survival, and Sources of Inoculum for Bacterial Diseases of Leafy Crucifers in Oklahoma // Plant Disease. – 2002. – Vol. 86, No. 8. – P. 883–888.

4. Stancheva Y. Atlas of crop diseases I. Diseases of vegetable crops. Sofia – Moscow: Pensoft, 2005. 181 p. (in Russian).
5. AgroAtlas, 2020. URL: <http://www.agroatlas.ru> (accessed date: 06.06.2020).
6. Alippi A.M., Ronco L. First Report of Crucifer Bacterial Leaf Spot Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Argentina. *Plant Disease*. 1996; 80: 223.
7. Bartoli C., Carrere S., Lamichhane J.R., Varvaro L., Morris C.E. Whole-Genome Sequencing of 10 *Pseudomonas syringae* Strains Representing Different Host Range Spectra. *Genome Announcements*. 2015; 3 (2): 1–3.
8. Basic local alignment search tool. NCBI. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed date: 06.06.2020).
9. CABI, 2020. URL: <https://www.cabi.org> (accessed date: 06.06.2020).
10. EPPO Global Database, 2020. URL: <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMMC> (accessed date: 06.06.2020).
11. Gironde S., Manceau C. Housekeeping Gene Sequencing and Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis To Identify Subpopulations within *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* That Correlate with Host Specificity. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012; 78 (9): 3266–3279.
12. Kazempour M.N., Kheyrghoo M., Pedramfar H., Rahimian H. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. *African Journal of Biotechnology*. 2010; 9 (20): 2860–2865.
13. Peters B.J., Ash G.J., Cother E.J., Hailstones D.L., Noble D.H., Urwin N.A.R. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Australia: pathogenic, phenotypic and genetic diversity. *Plant Pathology*. 2004; 53: 73–79.
14. Shaad N.W., Jones J.B., Chun W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (3rd edition). APS Press, 2001. 373 p.
15. Takikawa Y., Takahashi F. Bacterial leaf spot and blight of crucifer plants (Brassicaceae) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *P. cannabina* pv. *Alisalensis*. *J Gen Plant Pathol*. 2014; 80: 466–474.
16. Zhao Y., Damicone J.P., Demezas D.H., Rangaswamy V., Bender C.L. Bacterial Leaf Spot of Leafy Crucifers in Oklahoma Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. *Plant Disease*. 2000; 84 (9): 1015–1020.
17. Zhao Y., Damicone J.P., Bender C.L. Detection, Survival, and Sources of Inoculum for Bacterial Diseases of Leafy Crucifers in Oklahoma. *Plant Disease*. 2002; 86 (8): 883–888.

Применение метода полимеразной цепной реакции для идентификации преимагинальных стадий *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931)

Е.В. КОЛЕСНИКОВА, заведующая лабораторией энтомологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР», e-mail: katuxa-v@mail.ru

Г.Н. БОНДАРЕНКО, к. б. н., старший научный сотрудник, начальник Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР», старший преподаватель Аграрно-технологического института ФГАОВ «Российский университет дружбы народов», e-mail: reseachergm@mail.ru

Аннотация. В процессе работы была изучена возможность применения метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) определенных участков гена COI для идентификации азиатской ягодной дрозофилы *Drosophila suzukii* на преимагинальных стадиях развития и возможность применения изучаемых тестов для лабораторной диагностики. В статье приведены оригинальные данные (нуклеотидные последовательности) для идентификации целевого объекта методом ПЦР и их последующего использования в подборе видоспецифичных генетических маркеров.

Ключевые слова. Азиатская ягодная дрозофила *Drosophila suzukii*, видовая идентификация, ПЦР, ген COI, карантин растений.



ВВЕДЕНИЕ

последние годы значительно увеличился импорт плодово-ягодной продукции на территорию Российской Федерации. По данным Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (статистика поступающей продукции в испытательные лаборатории страны согласно информационной системе «Аргус-Фито»), только за 2018–2019 гг. на территорию России импортировали около 2 млрд т плодовой и ягодной продукции на сумму более 3 млрд долларов США из стран распростра-

Application of polymerase chain reaction method for identification of preimaginal stages of *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931)

E.V. KOLESNIKOVA, Head of the Entomology Laboratory of the Laboratory Testing Center of FGBU “VNIKR”, e-mail: katuxa-v@mail.ru

G.N. BONDARENKO, PhD in Biology, Senior Researcher, Head of the Laboratory Testing Center of FGBU “VNIKR”, Senior Lecturer of the Agrarian and Technological Institute of FGAOU VO “Peoples’ Friendship University of Russia” (RUDN University), e-mail: reseachergm@mail.ru

Abstract. In the process of work, the possibility of application of polymerase chain reaction (PCR) of certain COI gene fragments for identification of preimaginal developmental stages of spotted-wing drosophila *Drosophila suzukii* and possibility of application of these methods for laboratory diagnostics were studied. The article presents original data (base sequences) for identification of the target object by PCR method as well as further use for selection of species-specific genetic markers.

Keywords. The spotted-wing drosophila *Drosophila suzukii*, species-level identification, PCR, COI gene, plant quarantine.

INTRODUCTION

In recent years, the import of fruit products into the Russian Federation has increased significantly. According to the data of Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (statistics on products incoming to the testing laboratories of the country, according to the Argus-Phyto information system) in 2018–2019 only,