

ФИТОСАНИТАРИЯ. КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

PLANT HEALTH AND QUARANTINE

Свидетельство
о регистрации СМИ ПИ
№ ФС 77-76606

Русско-английский научный журнал

Сентябрь № 3 (7) 2021

СТАТЬЯ НОМЕРА:

**Новый подход к карантинным для РФ
бактериозам видов *Ralstonia***

10



Редакционная коллегия

Editorial board

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

Е.И. НАЗИН, директор ФГБУ «ВНИИКР»

ШЕФ-РЕДАКТОР:

Д.А. САБОВ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ ЖУРНАЛА

Ю.А. ШВАБАУСКЕНЕ – заместитель Руководителя Россельхознадзора

Н.Н. СОЛОВЬЕВА – начальник Управления фитосанитарного надзора и семенного контроля Россельхознадзора, кандидат биологических наук

А.Д. ОРЛИНСКИЙ – научный советник ЕОКЗР, доктор биологических наук

А.С. ШАМИЛОВ – эксперт ФАО по сельскому хозяйству, заместитель начальника группы по разработке стандартов Секретариата МККЗР, кандидат биологических наук

А.В. КОЧЕТОВ – директор ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», член-корреспондент РАН, профессор РАН, доктор биологических наук

М.Т. УПАДЫШЕВ – заведующий отделом биотехнологии и защиты растений ФГБНУ «ВСТИСП», член-корреспондент РАН, профессор РАН, доктор сельскохозяйственных наук

М.В. ПРИДАННИКОВ – заместитель директора Центра паразитологии при ИПЭЭ РАН им. А.Н. Северцова, кандидат биологических наук

Н.В. АЛЕЙНИКОВА – заместитель директора по научно-организационной работе ФГБНУ «Магарач» РАН, доктор сельскохозяйственных наук

А.В. ХЮТТИ – заведующий сектором «Грибных, вирусных, микоплазменных и нематодных болезней картофеля и овощных культур» ФГБНУ «ВНИИЗР», кандидат биологических наук

И.Т. БАЛАШОВА – главный научный сотрудник лаборатории новых технологий ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства», доктор биологических наук

Ф.С. ДЖАЛИЛОВ – заведующий лабораторией защиты растений МСХА им. К.А. Тимирязева, профессор, доктор биологических наук

А.И. УСКОВ – заведующий отделом биотехнологии и иммунодиагностики ФГБНУ ВНИИКХ им. А.Г. Лорха, доктор сельскохозяйственных наук

М.М. АБАСОВ – начальник Центра развития и внедрения инновационных методов защиты растений ФГБУ «ВНИИКР», доктор биологических наук

Н.А. ШЕРОКОЛАВА – главный эксперт ФГБУ «ВНИИКР»

К.П. КОРНЕВ – заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР», кандидат биологических наук

О.Б. ДОБРОВОЛЬСКАЯ – и. о. заместителя директора ФГБУ «ВНИИКР», доктор биологических наук

Ю.А. ШНЕЙДЕР – начальник научно-методического и экспериментального центра ФГБУ «ВНИИКР», кандидат биологических наук

С.Г. ЗИНОВЬЕВА – специалист по связям с общественностью редакционно-издательского отдела ФГБУ «ВНИИКР»

РЕДАКЦИЯ

В.В. ЧЕРЕПАНОВА – редактор-корректор

Г.Н. БОНДARENKO – начальник ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», кандидат биологических наук

Е.М. ВОЛКОВА – заведующая лабораторией сорных растений ФГБУ «ВНИИКР», кандидат биологических наук

О.Г. ВОЛКОВ – начальник отдела биометода ФГБУ «ВНИИКР»

Е.В. КАРИМОВА – начальник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», кандидат биологических наук

О.А. КУЛИНИЧ – начальник отдела лесного карантинаФГБУ «ВНИИКР», доктор биологических наук

М.Б. КОПИНА – начальник научно-методического отдела микологии и гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР», кандидат сельскохозяйственных наук

С.А. КУРБАТОВ – начальник научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР», кандидат биологических наук

С.В. СУДАРИКОВА – старший научный сотрудник лаборатории гельминтологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР»

В.С. КУЧЕРЯВЫХ – переводчик, кандидат филологических наук

CHIEF EDITOR:

Е.И. NAZIN, Director of FGBU "VNIIKR"

MANAGING EDITOR:

D.A. SABOV

EDITORIAL BOARD

Y.U.A. SHVABAUSKENE – Deputy Head of Rosselkhoznadzor

N.N. SOLOVYOVA – Head of the Directorate for Phytosanitary Surveillance and Seed Control of Rosselkhoznadzor, PhD in Biology

A.D. ORLINSKI – EPPO Scientific Advisor, Doctor of Advanced Studies in Biological Sciences

A.S. SHAMILOV – FAO Agricultural Officer, Deputy Head of the Standards Setting Unit of IPPC Secretariat, PhD in Biology

A.V. KOCHETOV – Director of FGBNU “Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS”, Corresponding Member of the RAS, Professor of the RAS, Doctor of Advanced Studies in Biological Sciences

M.T. UPADYSHEV – Head of the Biotechnology and Plant Protection Department of FGBNU “All-Russian Horticultural Institute for Breeding, Agrotechnology and Nursery”, Corresponding Member of the RAS, Professor of the RAS, Doctor of Advanced Studies in Agricultural Sciences

M.V. PRIDANNIKOV – Deputy Director of the Center of Parasitology of A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, PhD in Biology

N.V. ALEINIKOVA – Deputy Director for Scientific and Organizational Work of the FGBNU “Magarach” of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Advanced Studies in Agricultural Sciences

A.V. KHIUTTI – Head of the Group for Potato and Vegetable Crop Fungal, Viral, Mycoplasma and Nematode Diseases of FGBNU “VNIIZR”, PhD in Biology

I.T. BALASHOVA – Chief Researcher of the Laboratory of New Technologies of FGBNU “Federal Scientific Center of Vegetable Growing”, Doctor of Advanced Studies in Biological Sciences

F.S. DZHALILOV – Head of the Plant Protection Laboratory of the RSAU – MAA n. a. K.A. Timiryazev, Professor, Doctor of Advanced Studies in Biological Sciences

A.I. USKOV – Head of the Biotechnology and Immunodiagnostics Department of FGBNU “Lorch Potato Research Institute”, Doctor of Advanced Studies in Agricultural Sciences

M.M. ABASOV – Head of the Center for Development and Implementation of Innovative Methods of Plant Protection of FGBU “VNIIKR”, Doctor of Advanced Studies in Biological Sciences

N.A. SHEROKOLAVA – Chief Expert of FGBU “VNIIKR”

K.P. KORNEV – Deputy Director of FGBU “VNIIKR”, PhD in Biology

O.B. DOBROVOLSKAYA – Acting Deputy Director, FGBU “VNIIKR”, Doctor of Biology

Y.U.A. SHNEYDER – Head of Research and Methodology and Experimental Center, FGBU “VNIIKR”, PhD in Biology

S.G. ZINOVYEVA – PR specialist, Editorial and Publishing Department, FGBU “VNIIKR”

EDITORSHIP

V.V. CHEREPANOVA – Copy Editor

G.N. BONDARENKO – Head of the Testing Laboratory Center of FGBU “VNIIKR”, PhD in Biology

E.M. VOLKOVA – Head of the Laboratory of Weed Plants of FGBU “VNIIKR”, PhD in Biology

O.G. VOLKOV – Head of the Biomethod Department of FGBU “VNIIKR”

E.V. KARIMOVA – Head of the Scientific and Methodological Department of Virology and Bacteriology of the FGBU “VNIIKR”, PhD in Biology

O.A. KULINICH – Head of the Forest Quarantine Department of FGBU “VNIIKR”, Doctor of Advanced Studies in Biological Sciences

M.B. KOPINA – Head of the Research and Methodology Department for Mycology and Helminthology, PhD in Agriculture

S.A. KURBATOV – Head of the Entomological Research and Methodology Department of FGBU “VNIIKR”, PhD in Biology

S.V. SUDARIKOVA – Senior Researcher of the Helminthology Laboratory of the Testing Laboratory Center of FGBU “VNIIKR”

V.S. KUCHERYAVYKH – Translator, PhD in Philology

Содержание | Content

МЕЖДУНАРОДНОЕ СОТРУДНИЧЕСТВО

INTERNATIONAL COOPERATION

Euphresco: новые возможности для совместных международных исследований

Б. ДЖОВАНИ, Ю.А. ШНЕЙДЕР,
Н.А. ШЕРОКОЛАВА

Euphresco – new opportunities for international research collaboration

2

B. GIOVANI, Y.U.A. SHNEYDER,
N.A. SHEROKOLAVA

НАУЧНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

SCIENTIFIC RESEARCH

Карантинные для Российской Федерации бактериозы видов *Ralstonia*

Е.Ю. ШНЕЙДЕР, Н.В. ДРЕНОВА, Е.В. КАРИМОВА

Quarantine bacterioses *Ralstonia* spp. for the Russian Federation

10

E.YU. SHNEYDER, N.V. DRENOVA, E.V. KARIMOVA

О некоторых пикнидиальных грибах на вегетирующем картофеле в Нечерноземье средней полосы России

М.Б. КОПИНА, Д.А. УВАРОВА, Д.И. ШУХИН,
Л.М. ГОРЛОВА, Н.А. ЧАЛАЯ

On some pycnidial fungi on growing potatoes in the Nonchernozem region of Central Russia

27

M.B. KOPINA, D.A. UVAROVA, D.I. SHUKHIN,
L.M. GORLOVA, N.A. CHALAYA

Применение теста на патогенность в диагностике возбудителя бактериального ожога гороха

И.М. ИГНАТЬЕВА, О.Ю. СЛОВАРЕВА,
И.Г. БАШКИРОВА

Using a pathogenicity test for the diagnosis of the bacterial pea blight agent

40

I.M. IGNATYEVA, O.YU. SLOVAREVA,
I.G. BASHKIROVA

Разработка методов диагностики вириода латентной мозаики персика (PLMVd)

Ю.Н. ПРИХОДЬКО, Т.С. ЖИВАЕВА, Е.Н. ЛОЗОВАЯ,
Ю.А. ШНЕЙДЕР, Е.В. КАРИМОВА

Development of diagnostic methods of Peach Latent Mosaic Viroid (PLMVd)

47

YU.N. PRIKHODKO, T.S. ZHIVAEVA, E.N. LOZOVAYA,
Y.U.A. SHNEYDER, E.V. KARIMOVA

ИСТОРИЯ НАУКИ

HISTORY OF SCIENCE

Некоторые результаты исследований насекомых – фитофагов повилик *Cuscuta* spp. (Cuscutaceae), проведенных сотрудниками ВНИИ карантина растений

О.Г. ВОЛКОВ

Some results of studying phytophagous insects feeding on *Cuscuta* spp. (Cuscutaceae) conducted by FGBU "VNIIKR" researchers

58

O.G. VOLKOV

ПОМНИМ

REMEMBER

Памяти С.А. Федосова

В.Н. ЖИМЕРИКИН

In memory of S.A. Fedosov

72

Журнал «Фитосанитария. Карантин растений» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор), свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77-76606 от 15 августа 2019 года

Фото на обложке: Симптомы увядания картофеля в полевых условиях, вызванные *Ralstonia solanacearum* (автор фото: Monree Srihawong / shutterstock)

Дизайн и верстка: Мария Бондарь
Учредитель: ФГБУ «ВНИИКР», 140150, Московская область, г. Раменское, р. п. Быково, ул. Пограничная, д. 32

Издатель: ООО «Вейнارد»

Телефон редакции: 8 (495) 925-06-34

Электронная почта: veinardltd@gmail.com

Индексы издания

для подписки в каталогах:

АО «Агентство «Роспечать» – 81075

ООО «Агентство Книга-Сервис» – 33095

Отпечатано в типографии

ООО «Полиграфический комплекс»

123298, г. Москва, ул. 3-я Хорошевская,

дом 18, корпус 1

Тираж 3000 экз.

Подписано в печать: 06.09.2021

Дата выхода в свет: 13.09.2021

The Journal "Plant Health and Quarantine" is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor), Registration Certificate No. FS 77-76606, August 15, 2019.

Photo on the cover: Potato wilt symptoms in the field caused by *Ralstonia solanacearum* (photo by Montree Srihawong / shutterstock)

Design & Composition: Mariya Bondar
Establisher: FGBU VNIIKR, 140150, Moskovskaya oblast, Ramenskoye, r. p. Bykovo, Pogranichnaya ulitsa, 32

Publisher: OOO "Veynard"

Editorial Board Office:

Tel: +7 (495) 925-06-34

E-mail: veinardltd@gmail.com

Subscription indexes:

A0 Agentstvo "Rospechat" – 81075

ООО Agentstvo "Kniga-Servis" – 33095

Printing house:

ООО "Poligrafichesky kompleks", 123298, ul. 3-ya Khoroshevskaya, 18, build. 1

Circulation: 3000 copies

Approved for print: 06/09/2021

Issue date: 13/09/2021

Euphresco: новые возможности для совместных международных исследований

Б. ДЖОВАНИ¹, Ю.А. ШНЕЙДЕР²,
Н.А. ШЕРОКОЛАВА³

¹ Европейская и Средиземноморская
организация по карантину и защите
растений (ЕОКЗР), г. Париж, Франция

^{2,3} ФГБУ «Всероссийский центр карантина
растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково,
г. Раменское, Московская обл., Россия

¹ ORCID 0000-0001-9217-3555,
e-mail: bgiovani@euphresco.net

² ORCID 0000-0002-7565-1241,
e-mail: yury.shneyder@mail.ru

³ e-mail: natalia_sh@mail.ru



uphresco – это международная сеть организаций, заинтересованных в сотрудничестве в области здоровья растений. Эти организации являются спонсорами исследований, регулирующими и управляющими органами, научными институтами. Основная цель Euphresco – обеспечение координации и развитие сотрудничества в области фитосанитарных исследований, а также формирование сильной и долгосрочной сети спонсоров с привлечением новых участников (Euphresco, 2021).

Научная координация и сотрудничество обеспечивают оптимальное использование ограниченных ресурсов в области здоровья растений, предотвращают дублирование работ и расширяют возможности для синергии. Хотя на первых этапах своего существования Euphresco опиралась на 2 цикла финансирования от Евросоюза (EC) – Euphresco I (2006–2010) и Euphresco II (2011–2014) – для развития транснационального европейского сотрудничества в области здоровья растений, Euphresco к настоящему моменту реформировалась в самодостаточную сеть с международным участием.

Euphresco обрела стабильность с апреля 2014 г., а ее секретариат разместился в Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР).

Со временем сеть значительно выросла. Финансируемый ЕС проект состоял из 24 организаций-членов (17 стран) в 2006 г. и 35 организаций-членов (23 страны) в 2011 г. Самостоятельная сеть образовалась в 2014 г., куда вошли 29 организаций-членов (22 страны). В настоящее время членами Euphresco являются 69 организаций, которые расположены более чем в 50 странах мира.

Руководство Euphresco посчитало важным оценить то, как самоподдерживающая сеть решила

Euphresco – new opportunities for international research collaboration

B. GIOVANI¹, YU.A. SHNEYDER²,
N.A. SHEROKOLAVA³

¹ European and Mediterranean Plant Protection
Organization (EPPO), Paris, France

^{2,3} All-Russian Plant Quarantine Center
(FGBU “VNIIKR”), Bykovo, Ramenskoye,
Moscow Oblast, Russia

¹ ORCID 0000-0001-9217-3555,
e-mail: bgiovani@euphresco.net

² ORCID 0000-0002-7565-1241,
e-mail: yury.shneyder@mail.ru

³ e-mail: natalia_sh@mail.ru

Euphresco is a network of organisations interested to collaborate on plant health research matters. These organizations are research funders, regulators and policy makers and scientific institutes. The overall goal of Euphresco is to support coordination and collaboration in the area of phytosanitary research, and to become a strong, long-term network of funders that fully incorporate existing and new members (Euphresco, 2021).

Research coordination and collaboration ensure that optimal use of the limited resources available in plant health is made, avoid duplication of work, and increase opportunities for synergies. While, during its first stages of life, Euphresco relied on two cycles of EU financing – i. e. Euphresco I (2006–2010) and Euphresco II (2011–2014) – to promote transnational European cooperation in the plant health area, Euphresco has since developed into a self-sustaining network with an international outreach.

Euphresco became a sustainable network in April 2014 and the network secretariat is hosted by the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO).

The network has grown significantly over time. The EU-funded project was composed of 24 member organisations (17 countries) in 2006 and 35 member organisations (23 countries) in 2011. The self-sustainable network started in 2014 with 29 member organisations (22 countries). Currently, Euphresco's membership encompasses 69 member organisations that are located in more than 50 countries worldwide.



свои стратегические задачи, и проанализировать влияние, которое она оказала на исследования в области здоровья растений, чтобы опираться на достигнутые ранее успехи и определять возможности для совершенствования, чтобы устанавливать глобальные цели и будущие приоритеты. Оценка сосредоточена на периоде 2014–2020 гг. и охватывает функционирование Euphresco и влияние ее деятельности (Arcadia Int, 2021¹).

Всероссийский центр карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР») активно задействован в исследовательских проектах Euphresco с 2010 г. Ежегодно специалисты отделов ФГБУ «ВНИИКР» принимают участие в проектах, посвященных различным направлениям: вирусологии, бактериологии, гельминтологии, защите растений и др.

Пандемия COVID-19 показала важность науки и исследований и необходимость коммуникации между учеными и политиками. Без общения, взаимопонимания и согласованных действий сообщение, адресованное обществу, искажается, и принятие мер затрудняется. Параллель с защитой растений очевидна. Ежедневно Euphresco содействует коммуникации и сотрудничеству в области защиты растений. Значение сети, которая может объединять заинтересованные стороны из разных регионов мира и решать разные задачи, было раскрыто в публикации «Научная дипломатия для защиты растений» (Giovani et al., 2020). С пресс-релизом и статьей можно ознакомиться на веб-сайте² Международной конвенции по карантину и защите растений (МККЗР). Эта публикация дала Euphresco возможность укрепить связи с региональными организациями по карантину и защите растений, Секретариатом МККЗР и Секретариатом Конвенции о биологическом разнообразии (все они в настоящее время являются консультантами сети). Продолжаются обсуждения с рядом организаций по всему миру о расширении членства в Euphresco и создании более инклюзивной сети.

Скорое начало транснационального исследовательского сотрудничества

Завершены обсуждения по предложенным в 2020 г. темам исследований, налажено сотрудничество между организациями из 37 стран мира и запущены 15 проектов по темам, обозначенным в таблице 1.

Организации по-прежнему могут присоединяться к консорциумам при условии, что их вклад вписывается в рамки исследований Euphresco. Взносы в эквивалентной форме и согласование существующей исследовательской деятельности позволяют организациям присоединяться к консорциумам Euphresco без прямого вложения денежных средств.

The Euphresco governance has considered it essential to evaluate how the self-sustaining network has addressed its strategic objectives and to review the impact it has had in plant health research, to build on past successes and to identify opportunities for improvement, to reflect on the overall objectives and future priorities of the network. The evaluation focusses on the 2014–2020 period and covers Euphresco's functioning and the impacts of its activities (Arcadia Int, 2021¹).

The All-Russian Plant Quarantine Center (VNIIKR) is an active participant in Euphresco research projects since 2010. Every year, specialists from the departments of All-Russian Plant Quarantine Center take part in projects dedicated to various areas (virology, bacteriology, nematology, plant protection, etc.).

The COVID-19 pandemic showed the importance of science and research and how essential communication between scientists and policy makers is. Without communication, mutual comprehension and concerted actions, the message that gets to the public is distorted and acceptance of measures more difficult. The parallel with Plant Health is evident. Euphresco works every day to facilitate communication and collaboration on plant health research. The importance of a network that can bring together stakeholders from different regions of the world and with different missions has been explained in the publication 'Science diplomacy for plant health' (Giovani et al., 2020). A press release and the article can be viewed from the International Plant Protection Convention (IPPC) website². The publication was an opportunity for Euphresco to strengthen the links with the Regional Plant Protection Organisations, the Secretariat of the International Plant Protection Convention and of the Convention of Biological Diversity, that are now advisors of the network. Discussions are ongoing with a number of organisations worldwide to broaden Euphresco membership and make the network more inclusive.

Transnational research collaboration to start soon

Discussions on the research topics proposed in 2020 have come to an end, collaborations have been secured between organisations in thirty-seven countries worldwide and fifteen research projects have started on the following topics (Table 1).

It is still possible for organisations to join consortia, provided that their contributions will fit within the Euphresco research framework. In-kind contributions and alignment of existing research activities allows organisations to join the Euphresco consortia without committing monetary funds.

¹ <https://zenodo.org/record/4468457#.YRKp9YgzaUm>.

² https://www.nature.com/articles/s41477-020-0744-x.epdf?sharing_token=nqmOieMF00rOrgmSf_e1BtRgN0jAjWel9jnR3ZoTv0M1uwRovN7Hh-jLVMWMLmrkrCi9eSS0LinYXoh1vwkY7-lx3s_OI7GGU-6q8fLRdLqHQljWO9TfHS10KRjK9HiBSQobFdATfzai9x_OeH_Fly742ayJBwbCwZROYhU-r-M%3D.

Таблица 1
Проекты Euphresco,
начинающиеся в 2021 г.

Название	Краткое описание
2020-A-334 «Фитосанитарное состояние растений <i>Fagus spp.</i> »	В рамках проекта будут собраны сведения о риске интродукции и распространении болезни листвьев буков в Европе ³ .
2020-A-335 «Патотипы <i>Globodera pallida</i> »	В рамках проекта будут изучены патотипы <i>Globodera pallida</i> . Информация будет использована для тестирования и создания устойчивых сортов картофеля.
2020-F-336 «Таксономия и эпидемиология <i>Pectobacterium</i> и <i>Dickeya</i> spp. в Европе, Северной Америке и Южной Африке»	В рамках проекта будут разработаны и валидированы методы, которые позволяют быстро и правильно идентифицировать виды <i>Pectobacterium</i> и <i>Dickeya</i> на уровне (под)видов и использовать эти методы для лучшего понимания таксономии и эпидемиологии указанных бактерий ⁴ .
2020-A-337 «Разработка и оценка подходов к мониторингу жуков рода <i>Agrilus</i> »	В рамках проекта будут разработаны методы мониторинга некоторых видов <i>Agrilus</i> и/или разработаны более общие методы отлова для этой группы насекомых-ксилофагов ⁵ .
2020-A-339 «Патогены, распространяющиеся с семенами хвойных растений»	В рамках проекта будут собраны сведения о вредных организмах хвойных растений, распространяющихся с семенами, и будут разработаны методы метабаркодирования для одновременного обнаружения патогенов. Основное внимание в работе должно быть уделено хвойным растениям родов <i>Pinus</i> , <i>Picea</i> , <i>Abies</i> , <i>Pseudotsuga</i> и <i>Cedrus</i> , а также возбудителям язвенных болезней хвойных – патогенам родов <i>Neonectria</i> и <i>Sirococcus</i> ⁶ .
2020-A-340 «Совершенствование знаний об эпидемиологии и распространении приоритетных инвазивных и (повторно) появляющихся членистоногих вредителей плодовых культур и винограда»	В рамках проекта будет собрана информация о фенологии и встречаемости членистоногих вредителей, таких как <i>Aromia bungii</i> , <i>Popillia japonica</i> и <i>Halyomorpha halys</i> , на различных растениях-хозяевах с упором на плодовые культуры и виноградники в странах-партнерах ⁷ .
2020-F-341 «Насекомые – переносчики <i>Xylella fastidiosa</i> »	Проект будет способствовать развитию знаний о биологии и эпидемиологии (потенциальных) переносчиков <i>Xylella fastidiosa</i> . Также будет рассмотрена разработка ловушек или приманок для наиболее распространенных переносчиков ⁸ .

Table 1
List of the Euphresco projects
will start in 2021

Topic name	Short description
2020-A-334 ‘Plant health status of <i>Fagus spp.</i> ’	The project will gather knowledge on the risk of introduction and establishment of beech leaf disease in Europe ³ .
2020-A-335 ‘Pathotypes of <i>Globodera pallida</i> ’	The project will survey pathotypes of <i>Globodera pallida</i> . Information will be used for testing and developing resistant potato varieties.
2020-F-336 ‘Taxonomy and epidemiology of <i>Pectobacterium</i> and <i>Dickeya</i> spp. in Europe, North America and South Africa’	The project will develop and validate tools that allow quick and proper characterisation of <i>Pectobacterium</i> and <i>Dickeya</i> species at the (sub)species level and to use these tools to get a better understanding of the taxonomy and epidemiology of these bacteria ⁴ .
2020-A-337 ‘Developing and assessing surveillance methodologies for <i>Agrilus</i> beetles’	The project will develop monitoring tools for specific <i>Agrilus</i> species and/or develop a more generic trapping technique for this group of wood boring insects ⁵ .
2020-A-339 ‘Seed borne pathogens of conifers’	The project will gather knowledge on seed borne pests of conifers and develop metabarcoding methods for the generic detection of pathogens. The main focus of the work should be on the conifer genera <i>Pinus</i> , <i>Picea</i> , <i>Abies</i> , <i>Pseudotsuga</i> and <i>Cedrus</i> and on pests such as those that cause <i>Neonectria</i> canker and <i>Sirococcus</i> blight ⁶ .
2020-A-340 ‘Improved knowledge about the epidemiology and distribution of priority invasive and (re)emerging arthropod pests in fruit crops and grapevines’	The project will gather information on the phenology and occurrence of arthropods pests such as <i>Aromia bungii</i> , <i>Popillia japonica</i> and <i>Halyomorpha halys</i> on different host plants with emphasis on fruits crops and vineyards in the partner countries ⁷ .
2020-F-341 ‘The insect vectors of <i>Xylella fastidiosa</i> ’	The project will develop knowledge on the biology and epidemiology of (potential) vectors of <i>Xylella fastidiosa</i> . The development of traps or lures for the most common vectors will also be considered ⁸ .

³ <https://zenodo.org/record/4817558#.YRKQ8YgzaUI>.⁴ <https://zenodo.org/record/4675688#.YRKRB1gzaUI>.⁵ <https://zenodo.org/record/4672531#.YRKREYgzaUI>.⁶ <https://zenodo.org/record/4672620#.YRKRHogzaUI>.⁷ <https://zenodo.org/record/4672660#.YRKRLLogzaUI>.⁸ <https://zenodo.org/record/4675795#.YRKROIgzaUI>.

Название	Краткое описание	Topic name	Short description
2020-A-343 «Штаммы тосповируса пятнистого увядания томатов, подавляющие резистентность растений: распространение и оценка их воздействия на производство томатов и перца»	В рамках проекта будет определено распространение подавляющих резистентность у растений изолятов тосповируса пятнистого увядания томатов и оценено их потенциальное влияние на производство томатов и перца ⁹ .	2020-A-343 'Resistance breaking strains of <i>Tomato spotted wilt tospovirus</i> : distribution and evaluation of their impact on tomato and pepper production'	The project will determine the distribution of <i>Tomato spotted wilt tospovirus</i> resistance-breaking isolates and estimate their potential impact on tomato and pepper production ⁹ .
2020-A-344 «Разработка эффективных методов, в том числе баркодирования, для отличия фитоплазмы золотистого пожелтения винограда <i>Grapevine flavescence dorée sensu stricto</i> от других родственных фитоплазм»	В рамках проекта будет оценена возможность разработки надежного метода исследования, который будет использоваться в рутинном анализе для различия фитоплазмы GFD и других фитоплазм 16SrV ¹⁰ .	2020-A-344 'Development of efficient methods and identification of barcodes for discriminating <i>Grapevine flavescence dorée sensu-stricto</i> from other related phytoplasmas'	The project will evaluate the possibility to develop a reliable test, to be used in routine analysis, to distinguish between GFD phytoplasma and other 16SrV phytoplasmas ¹⁰ .
2020-G-346 «Инициатива по обмену данными»	Партнеры по проекту изучат различные методы и протоколы обмена данными и рассмотрят, как они могут быть реализованы в области защиты растений.	2020-G-346 'Data sharing initiative'	The project partners will investigate different methods and protocols for data-sharing and consider how they could be implemented in plant health.
2020-A-347 «Базовое исследование резерваторов вирусов в местных растениях и сельскохозяйственных культурах»	Проект определит, какие вирусы присутствуют в соответствующих культурах или потенциальных хозяевах-резерваторах, связанных с сельскохозяйственными угодьями ¹¹ .	2020-A-347 'Baseline study on virus reservoirs in native plant species and crops'	The project will determine which viruses are present in relevant crops or potential reservoir hosts associated with agricultural fields ¹¹ .
2020-A-352 « <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> на фасоли и сое: борьба со старым врагом»	В рамках проекта будет проведена оценка имеющихся селективных сред и молекулярных тестов для выявления <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> subsp. <i>flaccumfaciens</i> в семенах ¹² .	2020-A-352 ' <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> on bean and soybean: engaging the old enemy'	The project will evaluate available selective media and molecular detection tests for the detection of <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> subsp. <i>flaccumfaciens</i> on seeds ¹² .
2020-C-353 «Основные вещества (щелочки) как экологически чистая альтернатива синтетическим пестицидам для защиты растений»	В рамках проекта будет проверено и подтверждено использование основных веществ (щелочей) в фитосанитарных обработках ¹³ .	2020-C-353 'Basic substances as an environmentally friendly alternative to synthetic pesticides for plant protection'	The project will test and validate the use of basic substances as phytosanitary treatments ¹³ .
2020-C-360 «Предотвращение распространения карантинных вирусов и виридов посредством очистки и дезинфекции»	В рамках проекта будет собрана информация о протоколах дезинфекции сельскохозяйственного оборудования и поверхностей теплиц от ряда вирусов и виридов.	2020-C-360 'Countering quarantine viruses and viroids through cleaning and disinfection'	The project will gather information on disinfection protocols for tools and greenhouses surfaces against a number of viruses and viroids.
2020-C-361 «Готовность к биологическому контролю над приоритетными угрозами биобезопасности»	В рамках проекта будет создана сеть биологического контроля для обмена знаниями и информацией о приоритетных угрозах биобезопасности и агентах биологической борьбы с целью повышения готовности к проникновению инвазивных видов беспозвоночных ¹⁴ .	2020-C-361 'Preparedness in biological control of priority biosecurity threats'	The project will establish a biological control network to share knowledge and information on priority biosecurity threats and biological control agents to increase preparedness for incursions of invasive invertebrate species ¹⁴ .

⁹ <https://zenodo.org/record/5040236#.YRKRT4gzaUm>.¹⁰ <https://zenodo.org/record/5040384#.YRKRY4gzaUl>.¹¹ <https://zenodo.org/record/5172673#.YRKRD4gzaUl>.¹² <https://zenodo.org/record/5172129#.YRKRIYgzaUl>.¹³ <https://zenodo.org/record/5113865#.YRKRIlogzaUl>.¹⁴ <https://zenodo.org/record/5040474#.YRKRoogzaUl>.



Рис. 1 и 2. Визит участников проектов Eupresco NGS-Detect и VirusCollect II в коллекцию DSMZ (г. Брауншвейг, Германия, октябрь 2016 г.) (фото: Klára Nyerges)

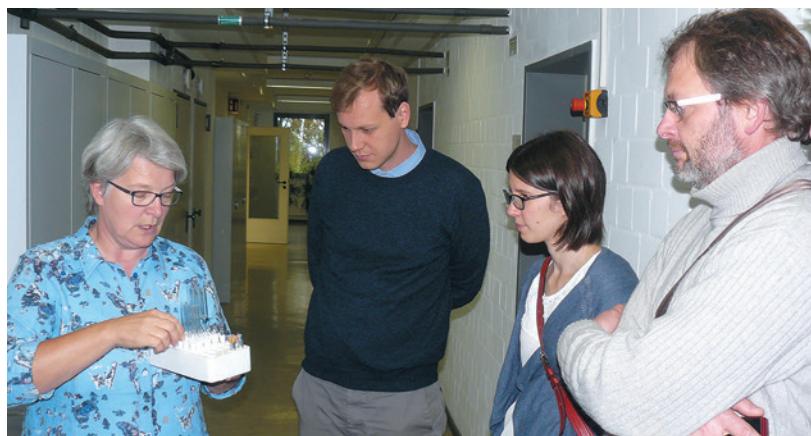


Fig. 1 and 2. A visit of the participants of the projects Eupresco NGS-Detect and VirusCollect II to the DSMZ collection (Braunschweig, Germany, October 2016) (photo by Klára Nyerges)

Для дальнейшего научного сотрудничества в 2021 г. были предложены новые темы. В таблице 2 представлены те проекты, которые вызвали наибольший интерес участников и для которых был назначен координатор.

Более подробная информация по темам исследований доступна на веб-сайте Eupresco¹⁵. Любой запрос об участии в вышеупомянутых проектах следует направлять координатору Eupresco.

В настоящее время ФГБУ «ВНИИКР» работает над несколькими проектами, которые позволяют получать самую свежую информацию о современных методах диагностики карантинных организмов, а также углубить знания об их биологии и экологии. Некоторые актуальные проекты представлены ниже.

2019-A-316 «Раннее обнаружение фитофторы в питомниках ЕС и третьих стран и продаваемых растениях». В рамках проекта будут проверены протоколы, основанные на (уже разработанных) методах метабаркодирования, для проверки питомников и продаваемых растений на наличие *Phytophthora* spp.¹⁶.

2019-F-310 «Биология и эпидемиология *Candidatus Liberibacter solanacearum* и фитоплазм картофеля и их влияние на управление риском, связанным с картофелем и другими культурами». Число видов листоблошек, являющихся переносчиками *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Lso), растет. В рамках проекта будет изучена их способность распространять *Candidatus Liberibacter solanacearum* и оценены потенциальные риски, которые фитоплазмы картофеля и Lso представляют для сельскохозяйственных культур¹⁷.

2019-E-320 «Молекулярная характеристика очагов рака картофеля». Недавно стала доступна аннотированная геномная последовательность *Synchytrium endobioticum*, что дает возможность молекулярного отслеживания изолятов на основе митохондриальной ДНК. Проект будет направлен на сбор материала *S. endobioticum* из самых разных источников; будут собраны данные о последовательности mtДНК¹⁸.

New research topics have been proposed for collaboration in 2021 too. Those that have attracted the largest number of expressions of interest and for which a coordinator has been identified are presented below (Table 2).

More information on the research topics is available from the Eupresco website¹⁵. Any request for participation in the above-mentioned projects should be sent to the Eupresco coordinator.

Currently, the All-Russian Plant Quarantine Center is working on several projects that allow to have the most up-to-date information on modern methods for the diagnosis of quarantine organisms, and to deepen knowledge on their biology and ecology. Some relevant projects are:

2019-A-316 ‘Early detection of *Phytophthora* in EU and third country nurseries and traded plants’. The project will validate protocols based on (already developed) meta-barcoding methods to screen nurseries and traded plants for *Phytophthora* spp.¹⁶.

2019-F-310 ‘The biology and epidemiology of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ and potato phytoplasmas and their contribution to risk management in potato and other crops’. The number of psyllid species known to harbour ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ is increasing. The project will investigate the ability of these psyllids to vector ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ and evaluate the potential risks they pose to crop plants¹⁷.

2019-E-320 ‘Molecular characterisation of potato wart disease outbreaks’. Recently, the annotated genomic sequence of *Synchytrium endobioticum* has become available, allowing the possibility to molecularly trace isolates on the basis of mitochondrial DNA. The project will aim to collect *S. endobioticum* material from a wide variety of sources; mtDNA sequence data will be gathered¹⁸.

2019-I-321 ‘Community Network for practices in Plant Virology’. The project will strengthen knowledge exchange on High-Throughput Sequencing as a diagnostic tool for plant viruses by facilitating exchange of information and practices.

¹⁵ https://www.eupresco.net/funding/current_calls.

¹⁶ <https://zenodo.org/record/3989869#.YRKTOYgzaUI>.

¹⁷ <https://zenodo.org/record/4585973#.YRKTTIgzaUI>.

¹⁸ <https://zenodo.org/record/3992032#.YRKTaogzaUI>.

Таблица 2

Проекты Euphresco, которые стартуют в 2022 г.

Название	Краткое описание	Ожидаемый результат
«Определение мер интегрированной защиты растений (IPM) для некоторых комбинаций вредных организмов и культур для улучшения защиты растений и уменьшения зависимости от химических пестицидов»	В рамках проекта будут определены сочетания культур/вредителей, для которых особенно необходима альтернатива использования нехимических пестицидов, будут устранены научные/технические пробелы, чтобы побудить заинтересованные стороны принять методы интегрированной защиты растений.	Сведения и знания, которые помогут заинтересованным сторонам внедрить методы интегрированной защиты растений.
«Методы быстрого выявления карантинных видов Tephritisidae»	В рамках проекта будет проведен сбор информации о существующих или разрабатываемых в настоящее время диагностических методах быстрого выявления и идентификации Tephritisidae spp. и их валидация. Генетический материал из образцов будет расшифрован, информация о доступных последовательностях ДНК будет доступна.	Сведения для возможности диагностики Tephritisidae на уровне родов и видов.
«Диагностика и эпидемиология вирусов, поражающих зерновые культуры»	Проект расширит знания об эпидемиологии вирусов зерновых (например, пшеницы, ячменя, кукурузы, овса, ржи, тритикале и риса), об их переносчиках и резерваторах, а также будет способствовать разработке/валидации методов диагностики.	Знание эпидемиологии (например, исторические записи о вирусных вспышках, насекомых-переносчиках) и разработка/валидация диагностических протоколов.
«Платформа для обмена зараженными партиями семян для разработки и валидации тестов»	В рамках проекта будут разработаны критерии и протоколы для характеристики зараженных партий семян и будет поддерживаться создание платформы для облегчения доступа к зараженным партиям семян и обмена ими, включая юридические требования.	Платформа для обмена зараженными семенными партиями.
«Инвентаризация и валидация процедур контроля качества выделения нуклеиновых кислот, используемых для диагностики вредителей»	В рамках проекта будет собрана информация о процедурах выделения ДНК/РНК, используемых в участвующих лабораториях, и доступная из литературы. Процедуры будут проверены на широком спектре матриц растений, инфицированных интересующими патогенами, с целью разработки рекомендаций для диагностических лабораторий.	Валидированные протоколы выделения нуклеиновых кислот.
«Нехимическая обработка дубовых бревен для предотвращения увядания дуба, которое вызывается <i>Bretziella fagacearum</i> »	В рамках проекта будет подтверждено использование вакуумной паровой обработки дубовых бревен в качестве альтернативы бромистому метилу.	Валидация промышленной вакуумной паровой обработки в отношении <i>Bretziella fagacearum</i> на дубовых бревнах для экспорта в Европу.
«Возможность использования мер интегрированной защиты растений для ликвидации очагов самшитовой огневки (<i>Cydalima perspectalis</i>)»	В рамках проекта будут проверены комплексные методы борьбы с вредителями в отношении <i>Cydalima perspectalis</i> . Эти методы будут включать расширенные мероприятия обследования и выявления, технологию стерилизации насекомых, метод дезориентации и обработку пестицидами.	Разработка и проверка методов контроля для использования в стратегиях мер интегрированной защиты растений.
«Присутствие и точное обнаружение <i>Xylophilus ampelinus</i> в питомниках и виноградниках»	Проект будет способствовать развитию знаний об эпидемиологии <i>X. ampelinus</i> и будет поддерживать диагностические мероприятия, а также способствовать доступности референсных изолятов. В ходе проекта будут проверены молекулярные методы исследования.	Знания и инструментарий в отношении <i>Xylophilus ampelinus</i> .
«Предотвращение распространения <i>Meloidogyne graminicola</i> на рисовых полях Европы»	В рамках проекта будут получены знания об эпидемиологии <i>Meloidogyne graminicola</i> в Европе и, в частности, в Средиземноморском регионе. Проект будет поддерживать диагностические мероприятия, способствовать доступности референсных изолятов; при проведении проекта будут проверены молекулярные методы исследования.	Сведения и инструментарий для поддержки разработки диагностики нематод и борьбы с ними.

Table 2
List of the Euphresco projects will start in 2022

Topic name	Short description	Expected output
'Identifying IPM measures for selected pest/crop combinations, to improve plant health and decrease dependency on chemical pesticides'	The project will identify crop/pest combinations where alternatives to non-chemical pesticides are particularly needed and will address the scientific/technical gaps to encourage stakeholders to adopt integrated pest management practices.	Data and knowledge to ease the uptake of integrated pest management practices by stakeholders.
'Fast detection methods for quarantine Tephritidae'	The project will make an inventory of existing or currently developed diagnostic tests for the rapid detection and identification of Tephritidae spp. and will validate them. The genetic material from specimens will be sequenced and information on available DNA sequences will be shared.	Knowledge to support the diagnosis of Tephritidae at genus and species level.
'Diagnosis and epidemiology of viruses infecting cereal crops'	The project will increase the knowledge on the epidemiology of cereal (e. g. wheat, barley, maize, oat, rye, triticale and rice) viruses and their vectors and reservoirs and will contribute to support the development/validation of diagnostic tests.	Knowledge on epidemiology (such as historical records of viral outbreaks, insect vectors) and development/validation of diagnostic protocols.
'Infrastructure for sharing infested seed lots for test development and validation'	The project will develop criteria and protocols to characterise infested seed lots and will support the establishment of a platform to facilitate the access and exchange of infested seed lots, including legal requirements.	Infrastructure for sharing infested seed lots.
'Inventory and validation of quality control procedures for the extraction of nucleic acids used for the diagnosis of pests'	The project will collect information on the DNA/RNA extraction procedures used in the participating laboratories and available from the literature. Procedures will be validated on a wide range of plant matrixes infected with pathogens of interest in order to formulate recommendations for diagnostic laboratories.	Validated protocols for nucleic acid extraction.
'A non-chemical oak log treatment for mitigating oak wilt caused by <i>Bretziella fagacearum</i> '	The project will validate the use of vacuum steam treatment of oak logs as an alternative to methyl bromide.	Validated commercial vacuum steam treatment for <i>Bretziella fagacearum</i> in oak logs for export to Europe.
'Potential for using IPM tools to eradicate box tree moth (<i>Cydalima perspectalis</i>) incursions'	The project will validate integrated pest management methods against <i>Cydalima perspectalis</i> . These methods will include enhanced survey and detection methods, the sterile insect technique, mating disruption, and pesticide treatments.	Development and validation of control methods to be used in IPM strategies.
' <i>Xylophilus ampelinus</i> presence and accurate detection in nurseries and vineyards'	The project will develop knowledge on the epidemiology of <i>X. ampelinus</i> and will support diagnostic activities by improving the availability of reference isolates and by validating molecular tests.	Knowledge and tools against <i>Xylophilus ampelinus</i> .
'Preventing <i>Meloidogyne graminicola</i> spread in European rice paddies'	The project will develop knowledge on the epidemiology of <i>Meloidogyne graminicola</i> in Europe and in particular in the Mediterranean region; the project will support diagnostic activities by improving the availability of reference isolates and by validating molecular tests.	Knowledge and tools to support preparedness, diagnosis and management of the nematode.

2019-I-321 «Сеть сообщества специалистов по вирусологии растений». Проект усилит обмен знаниями о высокопроизводительном секвенировании как диагностическом инструменте для вирусов растений, облегчая обмен информацией и практическими методами.

2019-C-326 «Выживаемость патогенов в почве». В рамках проекта будет изучена выживаемость выбранных бактериальных и грибных патогенов в почве и (разлагающихся) органических веществах после сбора урожая растения-хозяина¹⁹.

2019-C-326 'Pathogen survival in soil'. The project will study the survival of selected bacterial and fungal pathogens in the soil and (decomposing) organic matter after harvest of the host crop¹⁹.

2019-A-327 'Validation of molecular diagnostic tests for detection of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in seeds of tomatoes and chilies'. The project will validate conventional and real-time RT-PCR

¹⁹ <https://zenodo.org/record/4616407#.YRKTjYgzaU>

2019-A-327 «Валидация молекулярных методов диагностики для выявления вируса коричневой морщинистости плодов томата (ToBRFV) в семенах томата и перца». В рамках проекта будут проверены методы классической полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР в реальном времени, разработанные для диагностики вируса коричневой морщинистости плодов томата²⁰.

2020-C-360 «Предотвращение распространения карантинных вирусов и вириодов посредством очистки и дезинфекции». В рамках проекта будет собрана информация о протоколах дезинфекции сельскохозяйственного оборудования и поверхностей теплиц от ряда вирусов и вириодов.

2020-A-347 «Базовое исследование резерваторов вирусов в местных растениях и сельскохозяйственных культурах». Проект определит, какие вирусы присутствуют в соответствующих культурах или потенциальных хозяевах-резерваторах, связанных с сельскохозяйственными угодьями²¹.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Impact evaluation of the Euphresco network. Executive summary. Traon D., Montanari F., Amat L., Ferreira I. Arcadia Int. 2021.
- Giovani B., Blümel S., Lopian R. et al., 2020. Science diplomacy for plant health. *Nat. Plants*, 6: 902–905. – URL: <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0744-x>.
- Euphresco, 2021. – URL: www.euphresco.net (дата обращения: 01.08.2021).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Балдиссера Джованни, кандидат наук в области биохимии и молекулярной биофизики, координатор Euphresco в Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР), г. Париж, Франция; ORCID 0000-0001-9217-3555, e-mail: bgiovani@euphresco.net.

Юрий Андреевич Шнейдер, кандидат биологических наук, начальник научно-методического и экспериментального центра, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская область, Россия; ORCID 0000-0002-7565-1241, e-mail: yury.shneyder@mail.ru.

Наталья Александровна Шероколова, начальник центра обеспечения качества – главный эксперт ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская область, Россия; e-mail: natalia_sh@mail.ru.

tests developed for the diagnosis of *Tomato brown rugose fruit virus*²⁰.

2020-C-360 ‘Countering quarantine viruses and viroids through cleaning and disinfection’. The project will gather information on disinfection protocols for tools and greenhouses surfaces against a number of viruses and viroids.

2020-A-347 ‘Baseline study on virus reservoirs in native plant species and crops’. The project will determine which viruses are present in relevant crops or potential reservoir hosts associated with agricultural fields²¹.

REFERENCES

- Impact evaluation of the Euphresco network. Executive summary. Traon D., Montanari F., Amat L., Ferreira I. Arcadia Int. 2021.
- Giovani B., Blümel S., Lopian R. et al. Science diplomacy for plant health. *Nat. Plants*, 2020; 6: 902–905. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0744-x>.
- Euphresco, 2021. URL: www.euphresco.net (last accessed: 01.08.2021).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Baldissera Giovani, PhD in Biochemistry and molecular biophysics, Euphresco Co-ordinator at European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), Paris, France; ORCID 0000-0001-9217-3555, e-mail: bgiovani@euphresco.net.

Yuri Shneyder, PhD in Biology, Head of Research and Methodology and Experimental Center, Leading Researcher, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0002-7565-1241, e-mail: yury.shneyder@mail.ru.

Natalia Sherokolava, Head of the Quality Assurance Center – Chief Expert, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: natalia_sh@mail.ru.



Доступ на страницу веб-сайта
Euphresco

Access to the Euphresco website

²⁰ <https://zenodo.org/record/4002010#.YRKTqIgzaUl>.

²¹ <https://zenodo.org/record/5172673#.YRKTtogaUl>.

УДК 632.3.01/.08

UDC 632.3.01/.08

Карантинные для Российской Федерации бактериозы видов *Ralstonia*

Е.Ю. ШНЕЙДЕР¹, Н.В. ДРЕНОВА², Е.В. КАРИМОВА³^{1, 2, 3} ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), п.п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия¹ e-mail: seunch@mail.ru² ORCID 0000-0003-4020-2910, e-mail: drenova@mail.ru³ ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru

АННОТАЦИЯ

В ФГБУ «ВНИИКР» в 2018–2019 гг. подготовлены анализы фитосанитарного риска по возбудителям бактериальных болезней, входящих в видовой комплекс *Ralstonia solanacearum sensu lato*. Данный видовой комплекс включен в перечни Европейской и Средиземноморской организаций по карантину и защите растений (ЕОКЗР) и Европейского союза (ЕС) и реклассифицирован в 2018 г. в 3 различных вида: *R. solanacearum* (A2), *R. pseudosolanacearum* (A2) и *R. syzygii* (A1). В процессе подготовки анализов фитосанитарного риска проведено изучение таксономического положения данных видов, сбор, обобщение и анализ данных по их географическому распространению, фитосанитарному статусу, растениям-хозяевам в странах распространения, биологическим особенностям, методам выявления и идентификации, способам распространения данных видов, а также их вредоносности, в том числе в экономическом измерении. По результатам исследований биологии рассмотренных видов, анализа условий, способствующих проникновению и акклиматизации возбудителей, а также их потенциальной вредоносности определен их фитосанитарный риск для территории Российской Федерации. Установлено, что все рассмотренные виды отвечают критериям карантинных организмов и могут распространяться на территории Российской Федерации, принося значительный ущерб поражаемым культурам.

Ключевые слова. Анализ фитосанитарного риска, видовой комплекс, филотипы, *Ralstonia solanacearum sensu lato*, ареалы, растения-хозяева, ЕПКО ЕАЭС.

ВВЕДЕНИЕ



80-х гг. прошлого столетия в странах Европы впервые были зарегистрированы случаи поражения картофеля бактериальным заболеванием, вызываемым возбудителем *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Оно было широко распространено в странах с субтропическим и тропическим

Quarantine bacterioses *Ralstonia* spp. for the Russian Federation

E.YU. SHNEYDER¹, N.V. DRENOVA², E.V. KARIMOVA³^{1, 2, 3} FGBU “All-Russian Plant Quarantine Center” (FGBU “VNIIKR”), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia¹ e-mail: seunch@mail.ru² ORCID 0000-0003-4020-2910, e-mail: drenova@mail.ru³ ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru

ABSTRACT

In 2018–2019, FGBU “VNIIKR” prepared pest risk analyses on agents of bacterial diseases included in the species complex *Ralstonia solanacearum sensu lato*. This species complex is included in the lists of the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) and the European Union (EU) and reclassified in 2018 into 3 different species: *R. solanacearum* (A2), *R. pseudosolanacearum* (A2) and *R. syzygii* (A1). In the process of preparing pest risk analyses, the taxonomic position of these species was studied, the collection, synthesis and analysis of data on their geographical distribution, phytosanitary status, host plants in the countries of distribution, biological characteristics, methods of detection and identification, pathways of these species, as well as their harmfulness, including in the economic dimension. According to the results of studies of the biology of the considered species, analysis of conditions favorable for the introduction and adaptation of pests, as well as their potential harmfulness, their phytosanitary risk for the territory of the Russian Federation was determined. It has been established that all considered species meet the criteria of quarantine organisms and can spread on the territory of the Russian Federation, causing significant damage to crops.

Key words. Pest risk analysis, species complex, phylotypes, *Ralstonia solanacearum sensu lato*, areas, host plants, Common List of Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union.

INTRODUCTION

Since the 1980s, in European countries, cases of potato infection with a bacterial disease caused by the pest *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. have been first recorded. It was widespread in countries with subtropical and tropical climates and caused serious damage not only to potatoes, but also to a number of

климатом и наносило серьезный ущерб не только картофелю, но и ряду других растений семейства пасленовых, а также возделываемым растениям других семейств. С 1975 г. возбудитель *R. solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. был включен в Перечень вредных организмов ЕОКЗР (список А2), с 1992 г. – в Перечень ЕС, а с 2016 г. – в Единый перечень ЕАЭС. Патоген был описан Prior & Fegan (Prior, Fegan, 2005) как бактерия, распространенная в четырех филотипах видового комплекса. Каждый филотип включает множество филогенетических и патогенных вариантов, различающихся генами баркодирования (включая ITS, *hrpB*, *mutS* и *egl*), известными как последовательности. Исторически сложилось, что видовой комплекс был признан как ряд фенотипически разнообразных штаммов, которые первоначально были помещены в 5 патогенных рас и 5 биоваров (Buddenhagen et al., 1962; Buddenhagen et al., 1964; Hayward, 1964). Недавно он был реклассифицирован (Safni et al., 2014) в 3 различных вида: *R. solanacearum* (филотип II), *R. pseudosolanacearum* (филотипы I и III) и *R. syzygii* (филотип IV). В настоящее время *R. solanacearum* классифицируют не только как отдельный вид, но в связи с большим количеством различных поражаемых растений-хозяев, патогенной специализацией, культуральными и физиологическими свойствами, а также его филогенией описывается видовым комплексом *R. solanacearum sensu lato*. Понятие «видовой комплекс» стало более распространенным. Филогенетические исследования выявили 4 филотипа (на основе анализа последовательностей региона ITS) в этом комплексе: филотип I (штаммы азиатского происхождения), филотип II (штаммы южноамериканского происхождения), филотип III (штаммы, появившиеся в высокогорных районах Африки) и филотип IV (штаммы Индонезии, Японии, Австралии). В настоящее время таксономия видового комплекса *R. solanacearum sensu lato* была пересмотрена с использованием комбинации геномных и протеомных методов. После ревизии видовой комплекс *Ralstonia solanacearum sensu lato* был реклассифицирован в 2018 г. в 3 отдельных вида: *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* и *R. syzygii*. Было установлено, что это новое разделение видов совпадает с предыдущей классификацией филотипов: *R. solanacearum* (филотип II), *R. pseudosolanacearum* (филотипы I и III), и *R. syzygii* (филотип IV). В связи с этим появилась необходимость изучения видов видового комплекса *Ralstonia solanacearum* в соответствии с новой классификацией.

Основной задачей службы карантинных растений является защита территории страны от опасных вредных организмов, способных нанести серьезный экономический ущерб сельскому хозяйству. Импорт продукции, зараженной карантинными вредными организмами, является одной из основных угроз для фитосанитарного благополучия Российской Федерации. На территории России действует Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза (ЕПКО ЕАЭС, далее Перечень), утвержденный Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 30 ноября 2016 г. В данный Перечень входят отсутствующие и ограниченно распространенные на территории Российской Федерации карантинные вредные организмы, способные поражать

other plants of the Solanaceae family, as well as cultivated plants of other families. Since 1975, the pathogen *R. solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. was included in the EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests, since 1992 – in the EU List, since 2016 – EAEU Common List. The pathogen was described by Prior & Fegan (Prior, Fegan, 2005) as a bacterium distributed in four phylotypes of a species complex. Each phylotype includes many phylogenetic and pathogenic variants differing in barcoding genes (including ITS, *hrpB*, *mutS* and *egl*), referred to as sequences. Historically, the species complex was recognized as a series of phenotypically diverse strains that were originally placed in 5 pathogenic races and 5 biovars (Buddenhagen et al., 1962; Buddenhagen et al., 1964; Hayward, 1964). It has been recently reclassified (Safni et al., 2014) into 3 different species: *R. solanacearum* (phylotype II), *R. pseudosolanacearum* (phylotypes I and III) and *R. syzygii* (phylotype IV). At present, *R. solanacearum* is classified not only as a separate species, but due to the large number of different affected host plants, pathogenic specialization, cultural and physiological properties, as well as its phylogeny, it is described by the species complex *R. solanacearum sensu lato*. The concept of “species complex” has become more widespread. Phylogenetic studies revealed 4 phylotypes (based on sequence analysis of the ITS region) in this complex: phylotype I (strains of Asian origin), phylotype II (strains of South American origin), phylotype III (strains that appeared in the highlands of Africa) and phylotype IV (strains of Indonesia, Japan, Australia). Currently, the taxonomy of species complex *R. solanacearum sensu lato* has been revised using a combination of genomic and proteomic techniques. After revision, the species complex *Ralstonia solanacearum sensu lato* was reclassified in 2018 into 3 separate species: *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii*. It was found that this new division of species coincides with the previous classification of phylotypes: *R. solanacearum* (phylotype II), *R. pseudosolanacearum* (phylotypes I and III), and *R. syzygii* (phylotype IV). In this regard, it became necessary to study the species of the species complex *Ralstonia solanacearum* according to the new classification.

The main task of the plant quarantine service is to protect the territory of the country from dangerous pests that can cause serious economic damage to agriculture. Import of products contaminated with quarantine pests is one of the main threats to the phytosanitary well-being of the Russian Federation. In Russia, there is a Common List of Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union (hereinafter the List), approved by the Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of November 30, 2016. This List includes quarantine pests that are absent and limitedly present in the territory of the Russian Federation, which can affect the main agricultural crops and cause significant crop losses. Until now, for the Russian Federation and the countries of the Eurasian Economic Union, the agent of brown potato rot *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. was the only bacterial quarantine pest in Solanaceae crops.

основные сельскохозяйственные культуры и вызывать значительные потери урожая. До настоящего времени для Российской Федерации и стран, входящих в Евразийский экономический союз, возбудитель буровой гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. являлся единственным бактериальным карантинным вредным организмом пасленовых культур.

На сегодняшний день нет строго установленной приуроченности филогенетических и патогенных свойств к различным филотипам. Для новых предлагаемых видов и подвидов видового комплекса *Ralstonia solanacearum* необходимо установить их географическое распространение и новые списки заражаемых растений-хозяев. Такой таксономический пересмотр представляет достаточно серьезную сложность при управлении информационными системами (например, при обработке ранее известной и новой информации) и в отношении здоровья растений (например, политика, диагностика, управление). В результате пересмотра таксономии видового комплекса возникла необходимость в проведении более детального рассмотрения отдельных видов *R. solanacearum sensu lato* в качестве возможных карантинных вредных организмов для Российской Федерации и ЕАЭС.

Карантинный для стран ЕАЭС вид *Ralstonia solanacearum*, а также 2 вида, не включенные в настоящее время в Перечень ЕАЭС, – *R. pseudosolanacearum* и *R. syzygii*, которые входят в видовой комплекс *Ralstonia solanacearum sensu lato*, являются потенциально опасными для России на основании проведенных для этих видов анализов фитосанитарного риска и предложены в качестве карантинных организмов для включения в Перечень ЕАЭС как видовой комплекс (Шнейдер, 2018; Шнейдер, Дренова, 2019; Шнейдер, Дренова, 2019а).

Значение фитопатогенов, входящих в комплекс *Ralstonia solanacearum sensu lato*, возрастает в связи с большим количеством экономически важных поражаемых культурных растений-хозяев. Эти вредные организмы представляют наибольшую опасность при завозе зараженного семенного и посадочного материала и их возможной акклиматизации на территории Российской Федерации, а также декоративных и дикорастущих растений – возможных переносчиков инфекции. Каждый филотип включает множество филогенетических и патогенных вариантов, различающихся генетически (включая гены ITS, *hrpB*, *mutS* и *egl*).

Рассмотрим изменения в таксономии для каждого вида видового комплекса *Ralstonia solanacearum sensu lato*.

Возбудитель буровой гнили – вид *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. emend. Safni et al. – включен в Перечень вредных организмов ЕОКЗР (список А2) в качестве ограниченно распространенного вредного организма. В связи с этим для него определен новый код – RALSSL, по которому в Глобальную базу данных ЕОКЗР (gd.eppo.int) будет передаваться новая информация по изменениям географического распространения и списку новых растений-хозяев. Вид характеризуется как низкотемпературный, способный развиваться в странах с умеренным климатом.

В вид *R. solanacearum* включены штаммы филотипа II, которые являются штаммами южно-

To date, there is no strictly established confinement of phylogenetic and pathogenic properties to various phylotypes. For new proposed species and subspecies of the species complex *Ralstonia solanacearum*, it is necessary to establish their geographical distribution and new lists of infected host plants. This taxonomic revision presents a significant challenge in the management of information systems (for example, when processing previously known and new information) and in relation to plant health (for example, policy, diagnostics, management). As a result of the revision of the taxonomy of the species complex, it became necessary to conduct a more detailed examination of individual species of *R. solanacearum sensu lato* as possible quarantine pests for the Russian Federation and the EAEU.

Quarantine for the EAEU countries, the species *Ralstonia solanacearum*, as well as 2 species not currently included in the EAEU List, – *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii*, which are part of the species complex *Ralstonia solanacearum sensu lato*, are potentially dangerous for Russia on the basis of pest risk analyses carried out for these pest species and are proposed as quarantine organisms for inclusion in the EAEU List as a species complex (Shneyder, 2018; Shneyder, Drenova, 2019; Shneyder, Drenova, 2019a).

The value of phytopathogens included in the complex *Ralstonia solanacearum sensu lato*, increases due to the large number of economically important affected cultivated host plants. These pests pose the greatest danger during the importation of contaminated seed and planting material and their possible adaptation in the Russian Federation, as well as ornamental and wild plants – possible vectors of infection. Each phylotype includes many phylogenetic and pathogenic variants that differ genetically (including genes ITS, *hrpB*, *mutS* and *egl*).

Let's consider the changes in taxonomy for each species of the species complex *Ralstonia solanacearum sensu lato*.

Brown potato rot – species *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. emend. Safni et al. – is included in the EPPO List of Pests (List A2) as a limitedly present pest. In this regard, a new code has been defined for it – RALSSL, via which new information on changes in geographic distribution and new host list will be submitted to the EPPO Global Database (gd.eppo.int). The species is characterized as low-temperature, capable of developing in countries with a temperate climate.

Strains of phylotype II, which are of South American origin, have been included in the species *R. solanacearum*.

R. pseudosolanacearum Safni, Cleenwerck, de Vos, Fegan, Sly & Kappler included in the EPPO List of Pests (List A2) as a limitedly present pest as a result of revision of the taxonomy of the species complex (Safni et al., 2014). In this regard, a new code has been defined for it – RALSPPS, according to which new information on geographical distribution, new lists of host plants and other updates will be transmitted to the EPPO database.

This species includes strains of phylotype I, which are referred to as strains of Asian origin, and strains of phylotype III, found in the African highlands.

американского происхождения.

R. pseudosolanacearum Safni, Cleenwerck, de Vos, Fegan, Sly & Kappler в результате пересмотра таксономии видового комплекса включен в Перечень вредных организмов ЕОКЗР (список А2) в качестве ограниченно распространенного вредного организма (Safni et al., 2014). В связи с этим для него определен новый код – RALSPS, по которому в базу данных ЕОКЗР будет передаваться новая информация по географическому распространению, новые списки растений-хозяев и прочие обновления.

В данный вид включены штаммы филотипа I, которые упоминаются как штаммы азиатского происхождения, и штаммы филотипа III, выявляемые в африканских нагорьях.

Третий вид видового комплекса – *Ralstonia syzygii* (Roberts et al.) Vaneechoutte et al. – включен в Перечень вредных организмов ЕОКЗР (список А1) как отсутствующий на территории стран – членов ЕОКЗР и в карантинные списки многих других стран в качестве отсутствующего вредного организма (Roberts et al., 1990). *R. syzygii* включает штаммы филотипа IV, которые считаются штаммами индонезийского происхождения.

Вид *R. syzygii* представлен тремя подвидами – *R. syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov. и *R. syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov., распространенными в различных странах с субтропическим и тропическим климатом. В базе данных ЕОКЗР для вида *R. syzygii* и его подвидов были определены коды – *R. syzygii* (RALSSY), *R. syzygii* subsp. *syzygii* (RALSS), *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* (RALSSI) и *R. syzygii* subsp. *celebesensis* (RALSSC). В эту базу также будет передаваться новая информация.

Информация, которая в настоящее время прилагается к отдельным кодам, постепенно будет вноситься в информацию о видовом комплексе (RALSSO).

Сегодня нет официально пересмотренных и уточненных списков по распространению отдельных видов комплекса *R. solanacearum sensu lato* в мире и поражаемым ими растениям.

ОБЗОРНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Географическое распространение видов *R. solanacearum sensu lato*

Если ранее считали, что бактериоз *R. solanacearum* ограничен территориями, расположенными между 45° северной широты и 45° южной широты, то в настоящее время бактерии *R. solanacearum sensu lato* отмечены во многих странах мира с различным климатом (рис. 1).

Вид *Ralstonia solanacearum*

Этот фенотип уже присутствует в регионе ЕОКЗР при небольшом количестве случаев выявления или ограниченном распространении, но имеет потенциал для дальнейшего распространения.

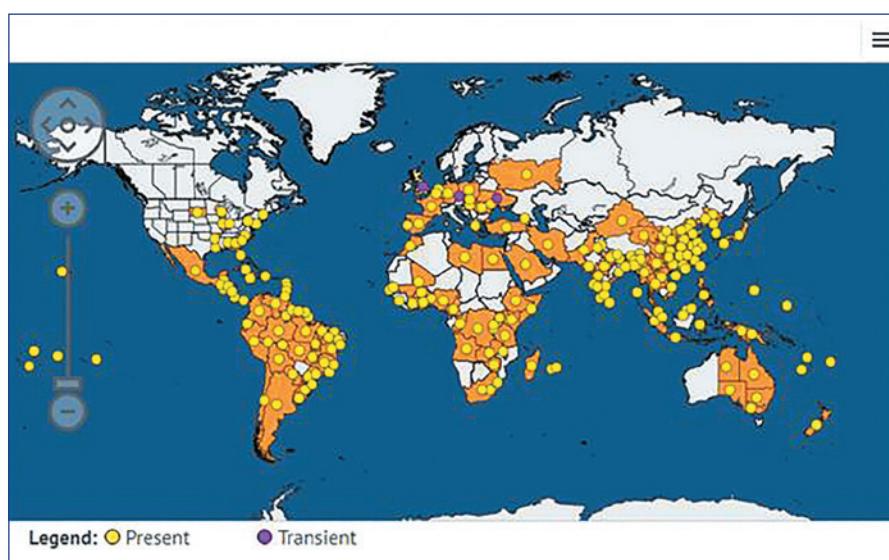


Рис. 1. Распространение *Ralstonia solanacearum sensu lato* в мире (по состоянию на 17.06.2021).
Источник: <https://gd.eppo.int>

Fig. 1. Spreading of *Ralstonia solanacearum sensu lato* in the world (as of 17.06.2021).
Source: <https://gd.eppo.int>

The third species of the species complex – *Ralstonia syzygii* (Roberts et al.) Vaneechoutte et al. – is included in the EPPO List of Pests (List A1) as absent from the territory of EPPO member countries and on the quarantine lists of many other countries as absent pest (Roberts et al., 1990). *R. syzygii* includes strains of phylotype IV, which are considered to be strains of Indonesian origin.

The species *R. syzygii* is represented by three subspecies – *R. syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov. and *R. syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov., spread in various countries with subtropical and tropical climates. In the EPPO database for the species *R. syzygii* and its subspecies codes have been given – *R. syzygii* (RALSSY), *R. syzygii* subsp. *syzygii* (RALSS), *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* (RALSSI) and *R. syzygii* subsp. *celebesensis* (RALSSC). New information will also be transferred to this base.

The information currently attached to the individual codes will gradually be incorporated into the species complex information (RALSSO).

Today, there are no officially revised and updated lists for the spreading of certain species of the complex *R. solanacearum sensu lato* in the world and the plants affected by them.

OVERVIEW

Geographic area of species *R. solanacearum sensu lato*

If earlier it was believed that bacteriosis *R. solanacearum* was limited by areas located between latitude 45° north latitude and 45° south latitude, bacteria *R. solanacearum sensu lato* are currently recorded in many countries with different climates (Fig. 1).

Species *Ralstonia solanacearum*

This phenotype is already present in the EPPO region with few cases or limited spreading, but has potential for further spread.

Вид *Ralstonia pseudosolanacearum*

После разделения видового комплекса *R. solanacearum sensu lato* на отдельные филотипы в мире появилось большое количество публикаций по распространению *R. pseudosolanacearum* – филотипов I и III в разных регионах мира. Болезнь поражает растения-хозяева в более теплом климате. Сообщалось, что видовой комплекс *R. solanacearum sensu lato* генетически разнообразен в большинстве субтропических и тропических районов, где были проведены широкие выборочные исследования растений-хозяев и исследования генетического разнообразия. В связи с этим было установлено наличие филотипов *R. pseudosolanacearum* в различных странах. Например, в Африке филотипы I и III были идентифицированы в Камеруне и Кот-д'Ивуаре (Mahbou Somo Toukam et al., 2009; N'Guessan et al., 2012) и филотип I – в Эфиопии (Lemessa and Zeller, 2007). В Азии филотип I был зарегистрирован в Индии (Sagar et al., 2014), Японии (Horita et al., 2014; Horita et al., 2010) и Китае (Xu et al., 2009). Недавно было получено сообщение об обнаружении *R. pseudosolanacearum* (*R. solanacearum*, филотип I), вызывающего необычную симптоматику и заболевание у *Rosa* spp. при выращивании тепличных роз в Нидерландах (Bergsma-Vlami et al., 2018; Tjou-Tam-Sin et al., 2018). Выявлялись заражения на растениях *Rosa* spp. – как на посадочном материале для размножения, так и срезанных цветах. Во всем мире это было первое сообщение о выделении и диагностике *R. pseudosolanacearum* на *Rosa* spp. В 2017 г. было получено 1-е сообщение о *Ralstonia solanacearum*, филотип I, вызывающем бактериальное увядание на *Rosa* spp. в Южной Корее (Kim, Lim et al., 2019) (Шнейдер, Дренова, 2019).

Филогенетическое разнообразие видового комплекса *R. solanacearum* было в высокой степени однородным на острове Майотта (в Индийском океане), поскольку, по последним таксономическим исследованиям, в настоящее время там был идентифицирован только филотип I. Филотип I является наиболее распространенным филотипом на других юго-западных островах Индийского океана, таких как Коморские острова, Маврикий, Реюньон, Родригес и Сейшельские острова, где он составляет 87% филогенетического разнообразия штамма и в основном выделен из пасленовых культур (Yahiaoui et al., 2016; Yahiaoui et al., 2017). Также этот филотип имеет наибольшее распространение в Бразилии (Salcedo et al., 2017) и некоторых африканских странах, таких как Кот-д'Ивуар (N'Guessan et al., 2012), Демократическая Республика Конго, Уганда, Южно-Африканская Республика (Carstensen et al., 2017), Бенин (Sikirou et al., 2015). Более широкая распространенность штаммов I-31 может быть объяснена их более высокой вирулентностью. Штаммы I-31 обладают способностью заражать широкий спектр растений-хозяев. Филотип I также был зарегистрирован в Мадагаскаре и восточноафриканских странах, граничащих с Индийским океаном, таких как Кения (Wicker et al., 2012). Филотип I поражает широкий спектр сельскохозяйственных культур, которые включают как травянистые, так и древесные растения (Hayward, 1991), распространены по всему миру (Hayward, 1994) и, как сообщается, является высоко рекомбиногенным (Coupert et al., 2008). Филотип I отличается своим широким разнообразием и включает 16 из 57 секвестров, известных в настоящее время.

Species *Ralstonia pseudosolanacearum*

After the division of the species complex *R. solanacearum sensu lato* into separate phylotypes, a large number of publications on the spreading of *R. pseudosolanacearum* – phylotypes I and III in different regions of the world. The disease affects host plants in warmer climates. It was reported that the species complex *R. solanacearum sensu lato* genetically is diverse in most subtropical and tropical regions, where extensive selective host plant studies and genetic diversity studies have been conducted. In this regard, the presence of *R. pseudosolanacearum* phylotypes was established in different countries. For example, in Africa, phylotypes I and III have been identified in Cameroon and Côte d'Ivoire (Mahbou Somo Toukam et al., 2009; N'Guessan et al., 2012) and phylotype I – in Ethiopia (Lemessa and Zeller, 2007). In Asia, phylotype I was registered in India (Sagar et al., 2014), Japan (Horita et al., 2014; Horita et al., 2010) and China (Xu et al., 2009). Recently, *R. pseudosolanacearum* (*R. solanacearum*, phylotype I) was recorded, causing unusual symptoms and disease of *Rosa* spp. when growing greenhouse roses in the Netherlands (Bergsma-Vlami et al., 2018; Tjou-Tam-Sin et al., 2018). Infections on *Rosa* spp. plants were detected – both on plants for planting, and cut flowers. Worldwide, this was the first record on isolation and diagnosis of *R. pseudosolanacearum* on *Rosa* spp. In 2017, *Ralstonia solanacearum*, phylotype I, was first recorded, causing bacterial wilting on *Rosa* spp. in South Korea (Kim, Lim et al., 2019) (Shneyder, Drenova, 2019).

Phylogenetic diversity of the species complex *R. solanacearum* was highly homogeneous on the island of Mayotte (Indian Ocean) because, according to the latest taxonomic studies, only phylotype I has been identified there so far. Phylotype I is the most common phylotype in other southwestern Indian Ocean islands such as the Comoros, Mauritius, Reunion, Rodriguez and the Seychelles, where it accounts for 87% of the phylogenetic diversity of the strain and is mainly isolated from Solanaceae crops (Yahiaoui et al., 2016; Yahiaoui et al., 2017). Also, this phylotype is most common in Brazil (Salcedo et al., 2017) and some African countries such as Côte d'Ivoire (N'Guessan et al., 2012), Democratic Republic of the Congo, Uganda, South Africa (Carstensen et al., 2017), Benin (Sikirou et al., 2015). The wider prevalence of I-31 strains can be explained by their higher virulence. Strains I-31 have the ability to infect a wide variety of host plants. Phylotype I has also been reported in Madagascar and East African countries bordering the Indian Ocean such as Kenya (Wicker et al., 2012). Phylotype I affects a wide range of crops, which include both herbaceous and woody plants (Hayward, 1991), is spread throughout the world (Hayward, 1994) and is reported to be highly recombinogenic (Coupert et al., 2008). Phylotype I is distinguished by its wide variety and includes 16 out of 57 sequesters currently known.

Species *Ralstonia syzygii*

Subspecies *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* strains are described only in Indonesia on the clove tree.

Subspecies *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* strains are present in Indonesia (Cahyaniati et al., 1997), on the island of New Guinea (Davis et al., 2001) and

Вид *Ralstonia syzygii*

Штаммы подвида *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* описаны только в Индонезии на гвоздичном дереве.

Штаммы подвида *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* встречаются в Индонезии (Cahyaniati et al., 1997), на острове Новая Гвинея (Davis et al., 2001) и недавно были обнаружены в Малайзии (Kogeethavani et al., 2014; Teng et al., 2016).

Штаммы подвида *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* вызывают бактериальное увядание ряда растений-хозяев семейства пасленовых и были зарегистрированы в Индонезии, Австралии (Arwiyan et al., 2015), Японии (Horita et al., 2010; Suga et al., 2013), Южной Корее (Jeong et al., 2007), Индии (Gurjar et al., 2015) и Филиппинах (Villa et al., 2005).

В связи с этим проводится совершенствование методов выявления и идентификации видов *Ralstonia solanacearum* *sensu lato*.

Известные растения – хозяева *Ralstonia solanacearum* *sensu lato*

Большинство экономически значимых растений, поражаемых видами *Ralstonia solanacearum* *sensu lato*, относится к семейству пасленовых.

В странах ЕОКЗР основными растениями-хозяевами являются картофель и томаты. Кроме того, бактерии могут заражать свыше 200 видов растений, преимущественно тропических и субтропических культур.

Вид *R. solanacearum* (филотип II) (возбудитель буровой гнили картофеля) поражает ограниченный круг растений-хозяев, который включает картофель (*Solanum tuberosum*) (рис. 2, 3), томаты (*Solanum lycopersicum*) (рис. 4), баклажаны (*Solanum melongena*) (рис. 5), декоративные растения рода Пеларгониум (*Pelargonium*) (рис. 6) (Janse et al., 2004), Табак (*Nicotiana*). Сорняки, относящиеся к семейству пасленовых, – в частности, паслен сладко-горький (*Solanum dulcamara*) и крапива двудомная (*Urtica dioica*) (Wenneker et al., 1999) – являются растениями-резерваторами, способствующими переносу *R. solanacearum* на другие растения-хозяева (Шнейдер, 2018).

Штаммы этого филотипа преобладают в зонах возделывания картофеля, могут длительное время сохраняться в растительных остатках, находиться в клубнях картофеля в латентном состоянии. При монокультуре картофеля этот филотип доминирует.

Данный возбудитель является наиболее опасным патогеном для Российской Федерации. Он может быть завезен с импортным картофелем из стран его распространения и способен акклиматизироваться в умеренном климате.

have been recently found in Malaysia (Kogeethavani et al., 2014; Teng et al., 2016).

Subspecies *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* strains cause bacterial wilting of some host plants of the Solanaceae family and have been recorded in Indonesia, Australia (Arwiyan et al., 2015), Japan (Horita et al., 2010; Suga et al., 2013), South Korea (Jeong et al., 2007), India (Gurjar et al., 2015) and the Philippines (Villa et al., 2005).

In this regard, the methods of detection and identification of *Ralstonia solanacearum* *sensu lato* species are being improved.

Known host plants**of *Ralstonia solanacearum* *sensu lato***

Most economically important plants affected by *Ralstonia solanacearum* *sensu lato* species belong to Solanaceae family.

In EPPO countries, the main host plants are potatoes and tomatoes. In addition, bacteria can infect over 200 plant species, mainly tropical and subtropical crops.

Species *R. solanacearum* (филотип II) (brown potato rot agent) affects a limited range of host plants, which includes potatoes (*Solanum tuberosum*) (Fig. 2, 3), tomatoes (*Solanum lycopersicum*) (Fig. 4),



Рис. 2. Симптомы увядания на растении картофеля (фото: Служба защиты растений, Вагенинген (Нидерланды))



Рис. 3. Типичное сосудистое кольцо коричневого цвета и слизь, сощающаяся из инфицированной ткани на срезе клубня картофеля. Чёрная некротическая ткань возникает из-за вторичной гнили (фото: Служба защиты растений, Вагенинген (Нидерланды))

Вид *R. pseudosolanacearum* (филотипы I и III) также имеет широкий круг растений-хозяев, и список подтвержденных хозяев продолжает расти (Genin and Denny, 2012; Lopes and Rossato, 2018), например, голубика (*Vaccinium corymbosum*), шелковица (*Morus alba*) (Norman et al., 2009). Таким образом, диапазон растений-хозяев еще полностью не известен. Ареалы хозяев видов *Ralstonia* spp. в пределах видового комплекса значительные и часто перекрываются, но не полностью (Cham-poiseau et al., 2009; Wicker et al., 2012). Основные культивируемые растения-хозяева, поражаемые *R. pseudosolanacearum*, относятся также к семейству пасленовых – это картофель (*S. tuberosum*) и томат (*S. lycopersicum*) (<https://www.cabi.org/cpc>), иногда баклажан (*S. melongena*), перец (*Capsicum annuum*), перец кустарниковый, или перец чили (*C. frutescens*), табак (*Nicotiana tabacum*). Другими культивируемыми хозяевами являются арахис культурный (*Arachis hypogaea*), растения рода Банан (*Musa* spp.), имбирь (*Zingiber officinale*), хлопчатник (*Gossypium hirsutum*), а также тыквенные – огурец обыкновенный (*Cucumis sativus*), тыква обыкновенная (*Cucurbita pepo*) (Шнейдер, Дренова, 2019).

Декоративные растения, например Антуриум (*Anthurium* spp.), Пеларгония (*Pelargonium* spp.) (рис. 6), импортируемая в Россию культура Роза (*Rosa* spp.) (рис. 7, 8) (Bergsma-Vlami et al., 2018; Tjou-Tam-Sin et al., 2018), некоторые виды деревьев (например, рода Эвкалипт (*Eucalyptus* spp.), олива европейская (*Olea europaea*) (Poussier et al., 2000; Tebaldi & Arblaster, 2014; Xu et al., 2009) и тиковое дерево

eggplants (*Solanum melongena*) (Fig. 5), декоративные растения из рода Pelargonium (*Pelargonium*) (Fig. 6) (Janse et al., 2004), табак (*Nicotiana*). Weeds belonging to the nightshade family – in particular, bittersweet nightshade (*Solanum dulcamara*) and stinging nettle (*Urtica dioica*) (Wenneker et al., 1999) – are reserve plants that contribute to transferring *R. solanacearum* on other host plants (Shneyder, 2018).

Strains of this phylotype prevail in the zones of potato cultivation, can persist for a long time in plant residues, and be in a latent state in potato tubers. In potato monoculture, this phylotype dominates.

This pathogen is the most dangerous pathogen for the Russian Federation. It can be brought with imported potatoes from the countries of its spreading and is able to adapt in a temperate climate.

R. pseudosolanacearum (филотипы I и III) also has a wide variety of host plants and the list of confirmed hosts continues to grow (Genin and Denny, 2012; Lopes and Rossato, 2018), for example, blueberry (*Vaccinium corymbosum*), mulberry (*Morus alba*) (Norman et al., 2009). Thus, the range of host plants is not yet fully known. Host areas of *Ralstonia* spp. within the species complex are significant and often overlap, but not completely (Cham-poiseau et al., 2009; Wicker et al., 2012). Main cultivated host plants affected by *R. pseudosolanacearum*, also belong to Solanaceae family – these are potatoes (*S. tuberosum*) and tomatoes (*S. lycopersicum*) (<https://www.cabi.org/cpc>), sometimes eggplants (*S. melongena*), pepper (*Capsicum annuum*), paprika, or paprika chili (*C. frutescens*), tobacco (*Nicotiana tabacum*). Other cultivated hosts are cultivated peanuts (*Arachis*



Рис. 4. Увядший томат в теплице
(фото: Жиль Селье)

Fig. 4. Wilted tomato in greenhouse.
Courtesy: Gilles Cellier



Рис. 5. Увядший баклажан
(фото: Жиль Селье)

Fig. 5. Wilted eggplant.
Courtesy: Gilles Cellier



Рис. 6. Герань розовая, пораженная бактериальным увяданием, в теплице (фото: Жиль Селье)

Fig. 6. Geranium rosat affected by bacterial wilt in greenhouse.
Courtesy: Gilles Cellier

(*Tectona grandis*)), также являются растениями – хозяевами *R. pseudosolanacearum* (Norman et al., 1999). Заражаемыми растениями также оказываются импомея батат, или сладкий картофель (*Ipomoea batatas*), кофе арабский (кофе аравийский, или аравийское кофейное дерево) (*Coffea arabica*), нут барадий, или турецкий горох (*Cicer arietinum*). Кроме того, бактериозом могут поражаться бессимптомно различные сорняки, например род Марь (*Chenopodium* spp.), галинзога мелкоцветковая (*Galinsoga parviflora*) и крапива двудомная (*Urtica dioica*).

В отношении **возбудителей вида *Ralstonia syzygii*** (филотип IV), которые в основном были получены из Индонезии, Австралии, Японии, Южной Кореи и Малайзии, недавно произошли таксономические и номенклатурные изменения (Шнейдер, Дренова, 2019а). Этот вид содержит 3 подвида: *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* – патоген, вызывающий болезнь Суматры у гвоздичных деревьев в Индонезии; *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* – возбудитель бактериальной болезни увядания у широкого круга растений-хозяев; *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* – возбудитель «кровянной» болезни бананов на *Musa* spp. В Индонезии эти 3 подвида вызывали опустошительные вспышки болезни восприимчивых растений-хозяев, имеющих высокую экономическую ценность.

Данный вид поражает следующие растения:

- подвид *R. syzygii* subsp. *syzygii* – гвоздичное дерево (*Syzygium aromaticum*) (семейство Myrtaceae);
- подвид *R. syzygii* subsp. *celebesensis* – растения рода Банан (*Musa* spp.), Геликония (*Heliconia* sp.), стрелитция королевская (*Strelitzia reginae*), оба – родственники Musaceae, а также канна индийская (*Canna indica*), дурман обыкновенный (*Datura stramonium*), ваточник кюрасавский (*Asclepias curassavica*), паслен черный (*Solanum nigrum*);
- подвид *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* – в основном культуры, относящиеся к семейству Solanaceae: картофель (*Solanum tuberosum*), томат (*S. lycopersicum*) (Maulana, Sayaka, 2007), баклажан (*S. melongena*), перец стручковый (*Capsicum annuum*) (рис. 9),

hypogaea), растениями из рода Банана (*Musa* spp.), имбирь (*Zingiber officinale*), хлопчатник (*Gossypium hirsutum*), а также Cucurbitaceae – обычный огурец (*Cucumis sativus*), обычный тыква (*Cucurbita pepo*) (Shneyder, Drenova, 2019).

Орнаментальные растения, такие как Антуриум (*Anthurium* spp.), герань (*Pelargonium* spp.) (рис. 6), импортированные в Россию, розы (*Rosa* spp.) (рис. 7, 8) (Bergsma-Vlami et al., 2018; Tjou-Tam-Sin et al., 2018), некоторые деревья (например, род Эвкалипт (*Eucalyptus* spp.)), Европейская оливка (*Olea europaea*) (Poussier et al., 2000; Tebaldi & Arblaster, 2014; Xu et al., 2009) и тик (*Tectona grandis*)), являются также хозяевами *R. pseudosolanacearum* (Norman et al., 1999). Заболевшие растения также являются переносчиками картофелины (*Ipomoea batatas*), арабской кофе (*Coffea arabica*), чечевицы (*Cicer arietinum*). Кроме того, бактериоз может влиять на некоторые сорняки без симптомов, например, *Chenopodium* spp., *Galinsoga parviflora* и *Urtica dioica*.

Касательно **агента вида *Ralstonia syzygii*** (филотип IV), который был преимущественно получен из Индонезии, Австралии, Японии, Южной Кореи и Малайзии, произошли недавние изменения в таксономии и номенклатуре (Shneyder, Drenova, 2019a). Этот вид содержит 3 подвида: *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* – патоген, вызывающий болезнь Суматры у гвоздичных деревьев в Индонезии; *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* – возбудитель бактериальной болезни увядания у широкого круга растений-хозяев; *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* – возбудитель «кровянной» болезни бананов на *Musa* spp. В Индонезии эти 3 подвида вызывали опустошительные вспышки болезни восприимчивых растений-хозяев, имеющих высокую экономическую ценность.

Этот вид поражает следующие растения:

- подвид *R. syzygii* subsp. *syzygii* – гвоздичное дерево (*Syzygium aromaticum*) (семейство Myrtaceae);
- подвид *R. syzygii* subsp. *celebesensis* – *Musa* spp., *Heliconia* sp., *Strelitzia reginae*, оба – родственники Musaceae, а также *Canna indica*, *Datura stramonium*, *Asclepias curassavica*, *Solanum nigrum*;
- подвид *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* – основные культуры из семейства Solanaceae: картофель (*Solanum tuberosum*), томат (*S. lycopersicum*) (Maulana, Sayaka, 2007), баклажан (*S. melongena*), перец стручковый (*Capsicum annuum*) (рис. 9), табак (*Nicotiana tabacum*), арахис (*Arachis hypogaea*) (семейство Fabaceae), имбирь (*Zingiber officinale*) (семейство Zingiberaceae), масличное растение (*Ricinus communis*), гвоздичное дерево (*Syzygium aromaticum*) (семейство Myrtaceae).

Subspecies *R. syzygii* subsp. *syzygii*

Одно из единственных растений, поражаемых этим подвидом, является гвоздичное дерево (*Syzygium aromaticum*) (Myrtaceae семейство) (Lomer et al., 1992), которое не выращивается

табак (*Nicotiana tabacum*), арахис культурный (*Arachis hypogaea*) (семейство Fabaceae), а также имбирь (*Zinger officinale*) (семейство Имбирные – Zingiberaceae), клемевина (*Ricinus communis*), гвоздичное дерево (*Syzygium aromaticum*) (семейство Миртовые – Myrtaceae).

Подвид *R. syzygii* subsp. *syzygii*

Единственное растение-хозяин, которое поражается данным подвидом *Ralstonia syzygii*, – гвоздичное дерево *Syzygium aromaticum* (семейство миртовых) (Lomer et al., 1992), которое не выращивается на территории Российской Федерации. Родиной гвоздичного дерева является Индонезия (Молуккские острова). Постепенно гвоздика распространилась в другие страны тропического пояса Азии, а затем проникла на острова Восточной Африки (Реюньон и Маврикий). Главные производители гвоздики – Индонезия, Танзания, Мадагаскар, Шри-Ланка. В последние годы отмечен значительный рост производства гвоздики в Бразилии. В небольшом количестве ее производят в Малайзии, на Ямайке и в некоторых странах Западной Африки.

Подвид *R. syzygii* subsp. *celebesensis*

Бананы (*Musa spp.*) являются самой важной в мире фруктовой культурой с точки зрения объема производства и торговли (Fegan, Prior, 2006). Несмотря на то, что они являются основным продуктом питания в Африке, Азии и Латинской Америке, только 13% производимых бананов продаются на международном рынке, что указывает на важность фруктов для внутренних рынков и продовольственной безопасности данных регионов. Однако растения банана в качестве посадочного материала не имеют практического значения в Российской Федерации в связи с неподходящими климатическими условиями для его выращивания. В нашей стране насчитывается только несколько сотен растений в ботанических садах и оранжереях.

Плодовая продукция бананов импортируется в Россию в больших количествах, поэтому очень важен контроль и надзор за качеством завозимой продукции бананов, в частности свободных от карантинных организмов.

Бактериальным болезням бананов и абиссинских бананов (энсет) до недавнего времени не уделялось равного внимания по сравнению с другими серьезными угрозами для производства бананов. Тем не менее бактерии оказывают значительное воздействие на бананы во всем мире, и методы управления не всегда хорошо известны или приняты фермерами.

Бактериальные болезни, вызывающие увядание растений бананов и энсет и связанные с *Ralstonia* (болезнь Моко/Бугтока, вызванная *Ralstonia solanacearum*, и банановая «кровяная» болезнь, вызванная *R. syzygii* subsp. *celebesensis*), могут приносить значительный ущерб данной культуре (Gäumann, 1921; Mairawita et al., 2012).

Подвид *R. syzygii* subsp. *indonesiensis*

Штаммы филотипа IV подвида *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* в первую очередь распространены в Индонезии, Индии, Японии и Австралии (Hayward, 1994). Их важность в настоящее время увеличивается в связи с возможностью поражения большого количества экономически ценных растений-хозяев, в частности для Российской Федерации, которые включают следующие виды: картофель (*Solanum tuberosum*), томат (*S. lycopersicum*), баклажан (*S. melongena*),



Ralstonia solanacearum sensu lato (RALSSO) - <https://gd.eppo.int>

Рис. 7. Стебель розы с некротическим увяданием молодых листьев и начальным пожелтением листьев (справа внизу)
(фото: Н. Тжу-Там-Син (Леон);
НОКЗР – Нидерланды,
Национальный справочный
центр)

Fig. 7. Rosa flower stalk with necrotic wilt in younger leaves and starting leaf yellowing (towards bottom right).
Courtesy:
N. Tjou-Tam-Sin (Leon);
NPPO-NL, National Reference Center

the territory of the Russian Federation. The homeland of the clove tree is Indonesia (Maluku Islands). Clove gradually spread to other countries in the tropical zone of Asia, and then the islands of East Africa (Reunion and Mauritius). The main producers of cloves are Indonesia, Tanzania, Madagascar, Sri Lanka. In recent years, there has been a significant increase in the production of cloves in Brazil. It is produced in small quantities in Malaysia, Jamaica and some West African countries.

Subspecies *R. syzygii* subsp. *celebesensis*

Bananas (*Musa spp.*) are the most important fruit crop in the world in terms of production and trade (Fegan, Prior, 2006). Although they are the main food in Africa, Asia and Latin America, only 13% of bananas produced are sold internationally, indicating the importance of fruit for domestic markets and food

gena), растения рода Банан (*Musa spp.*) и ряд декоративных растений.

Картофель *Solanum tuberosum* выращивается в ряде стран – Китае, Индии, Иране, Бангладеш, Турции, Японии, Пакистане, Казахстане, Непале, КНДР, Кыргызстане, Австралии, Азербайджане, Индонезии. В регион Азии и Океании входит мировой картофельный гигант – Китай, на долю которого приходится более 20% не только площади мировых картофельных полей, но и глобального урожая картофеля. Еще несколько стран Азии – Бангладеш, Индия, Иран, Япония и Турция – также входят в число 20 ведущих стран – производителей картофеля во всем мире.

В настоящее время Индонезия является крупнейшим производителем картофеля в Юго-Восточной Азии. Мировые рекорды урожайности картофеля установлены в Новой Зеландии. Там в среднем собирается около 50 тонн картофеля с гектара. Томат *Solanum lycopersicum* – культура, широко распространенная в мире. Родина томатов – Южная Америка, где до сих пор встречаются дикие и полукультурные формы томата. Крупнейшим производителем томатов в мире является Китай. Он производит более 30% всех томатов в мире (56,3 из 177 млн тонн) и опережает Индию, 2-го по величине производителя в мире, почти в 3 раза.

Перец стручковый *Capsicum annuum* выращивается в Америке, в тропических районах которой он встречается в диком виде. Разводится в южных умеренных, в субтропических и тропических широтах всех континентов, в том числе в странах Азии, в Австралии, Новой Зеландии и других южных странах.

Основные районы культурного возделывания табака (*Nicotiana tabacum*) – Северная Америка, Китай, Индия, Малайзия, Предкавказье, Закавказье, Средняя Азия, Приднестровье, Крым.

Имбирь (*Zingiber officinale*) происходит из стран Южной Азии. На данный момент выращивается в Китае, Индии, Индонезии, Австралии, Западной Африке, на Ямайке, Барбадосе.

security in these regions. However, banana plants as planting material have no practical value in the Russian Federation due to the unsuitable climatic conditions for its cultivation. In our country, there are only a few hundred plants in botanical gardens and greenhouses.

Fruit products of bananas are imported to Russia in large quantities; therefore, it is very important to control and monitor the quality of imported banana products, in particular those free from quarantine pests.

Bacterial diseases of bananas and Abyssinian bananas (enset) have not until recently received equal attention compared to other serious threats to banana production. However, the bacteria have a significant impact on bananas around the world, and management practices are not always well known or accepted by farmers.

Bacterial diseases causing wilting of banana and enset plants and associated with *Ralstonia* (Moco/Bugtok disease caused by *Ralstonia solanacearum*, and banana “blood” disease caused by *R. syzygii* subsp. *celebesensis*), can cause significant damage to a given crop (Gäumann, 1921; Mairawita et al., 2012).

Subspecies *R. syzygii* subsp. *indonesiensis*

Strains of phylotype IV subspecies *R. syzygii* subsp. *indonesiensis* are primarily found in Indonesia, India, Japan and Australia (Hayward, 1994). Their importance is currently increasing due to the possibility of affecting a large number of economically valuable host plants, in particular for the Russian Federation, which include the following species: potatoes (*Solanum tuberosum*), tomatoes (*S. lycopersicum*), eggplants (*S. melongena*), bananas (*Musa spp.*) and some ornamental plants.

Potato *Solanum tuberosum* is grown in some countries – China, India, Iran, Bangladesh, Turkey, Japan, Pakistan, Kazakhstan, Nepal, DPRK, Kyrgyzstan, Australia, Azerbaijan, Indonesia. The Asia and Oceania region includes the world potato giant – China, which accounts for more than 20% of not only the area of the world's potato fields, but also the global potato crop. Several more Asian countries – Bangladesh, India, Iran, Japan and Turkey – are also among the top 20 potato producing countries worldwide.

Indonesia is currently the largest potato producer in Southeast Asia. World records for potato yields have been set in New Zealand. There, on average, about 50 tons of potatoes are harvested per hectare. Tomato *Solanum lycopersicum* is a culture widespread in the world. The homeland of tomatoes is South America, where wild and semi-cultivated forms of tomato are still found. China is the largest tomato producer in the world. It produces more than 30% of all tomatoes in the world (56.3 out of 177 million tons) and is ahead of India, the 2nd largest producer in the world, by almost 3 times.



Рис. 8. *Rosa sp.* (чайная роза). Увядание с черным некрозом срезанных ветвей и выделение слизи на срезанном стебле (фото: Н. Тжу-Там-Син (Леон); НОКЗР – Нидерланды, Национальный справочный центр)

Fig. 8. *Rosa sp.* (tea rose). Dieback with black necrosis of pruned branches and discharge of slime on cut wounds in the stem;
Courtesy: N. Tjou-Tam-Sin (Leon);
NPOO-NL, National Reference Center

Таким образом, при современном уровне торговли есть опасность завоза новых видов *Ralstonia solanacearum sensu lato* в Российскую Федерацию.

Три вида *Ralstonia solanacearum sensu lato* были рассмотрены в диагностическом протоколе в соответствии с таксономией филотипа/секвевара (Стандарт ЕОКЗР, ЕПРО ПМ 7/21 (2), 2018). Протокол ясно разделяет штаммы филотипов I и III и другие эпидемиологически различные штаммы филотипа II (вызывающие бурое гниль картофеля или бактериальное увядание банана).

Показатели потенциального ущерба всех трех видов бактерий *Ralstonia solanacearum sensu lato* отвечают критериям карантинных для Российской Федерации организмов. Биоэкологические факторы благоприятствуют акклиматизации вредных организмов во многих регионах России, и при завозе зараженной растительной продукции возбудители бактериозов способны наносить в них значительный экономический ущерб.

При импорте продовольственного картофеля периодически наблюдается выявление возбудителя бурой гнили картофеля в партиях, поступающих из различных стран, что подтверждалось проведением бактериологических исследований (см. таблицу).

По результатам проведенных исследований обнаруженный возбудитель *Ralstonia solanacearum* относился к расе 1, что на сегодняшний день соответствует штаммам филотипа I, упоминающимся как штаммы азиатского происхождения.

Таким образом, периодически отмечается выявление возбудителя *Ralstonia solanacearum* в партиях продовольственного картофеля, завозимого на территорию России. По данным карантинной службы, очаги возбудителя бурой гнили картофеля на территории Российской Федерации отсутствуют.

Основные методы диагностики

Для обнаружения заболеваний при ввозе продукции в Россию и в полевых условиях в течение



Ralstonia solanacearum (RALSSL) - <https://gd.eppo.int>

Рис. 9. Типичные симптомы бактериального увядания перца чили и заболеваемость на полевых культурах в Сонбхадре (Уттар-Прадеш), Индия (фото: д-р Атма Нанд Трипати)

Fig. 9. Typical symptoms of bacterial wilt on chilli and incidence on field crop at Sonabhadra (Uttar Pradesh), India.
Courtesy: Dr Atma Nand Tripathi

Pepper *Capsicum annuum* is grown in America, in the tropical regions of which it is found wild. It is bred in the southern temperate, subtropical and tropical latitudes of all continents, including Asia, Australia, New Zealand and other southern countries.

Main areas of tobacco cultivation (*Nicotiana tabacum*) are North America, China, India, Malaysia, Ciscaucasia, Transcaucasia, Central Asia, Transnistria, Crimea.

Ginger (*Zingiber officinale*) comes from the countries of South Asia. Currently grown in China, India, Indonesia, Australia, West Africa, Jamaica, Barbados.

Thus, at the current level of trade, there is a danger of the introduction of new species *Ralstonia solanacearum sensu lato* into the Russian Federation.

Three species of *Ralstonia solanacearum sensu lato* were considered in the diagnostic protocol in accordance with the phylotype/sequential taxonomy (EPPO Standard, EPPO PM 7/21 (2), 2018). The protocol clearly distinguishes between strains of phylotypes I and III and other epidemiologically different strains of phylotype II (causing brown rot of potatoes or bacterial wilting of banana).

Indicators of potential damage by all three types of bacteria *Ralstonia solanacearum sensu lato* meet the criteria for organisms quarantine for the Russian Federation. Bioecological factors favor the adaptation of pests in many regions of Russia, and when contaminated plant products are imported, bacteriosis pathogens can cause significant economic damage in them.

When importing ware potatoes, the pathogen of potato brown rot is periodically observed in consignments coming from different countries, which was confirmed by bacteriological studies (see Table).

According to the results of the studies, the detected pathogen *Ralstonia solanacearum* belonged to race 1, which today corresponds to strains of phylotype I, referred to as strains of Asian origin.

Thus, the identification of the pathogen *Ralstonia solanacearum* is periodically reported in lots of ware potatoes imported to the territory of Russia. According to the quarantine service, there are no foci of the causative agent of potato brown rot on the territory of the Russian Federation.

Basic diagnostic methods

To detect diseases when importing products to Russia and in the field during the growing season, visual examinations are carried out to detect pathogens of bacterial diseases. However, the symptoms of bacteriosis may be similar to those of other infections. Currently, when carrying out diagnostics of *Ralstonia solanacearum* methodological recommendations and standards are used, developed by specialists of the FGBU "VNIIKR" on the basis

Таблица

**Общее количество случаев выявления
Россельхознадзором бурой гнили картофеля
при лабораторных исследованиях образцов импортного
продовольственного картофеля (2007–2017 гг.)**

№ п/п	Страна- экспортер	Карантинный вид	Кол-во обнаружений
1	Азербайджан	Бурая гниль картофеля <i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al.	1
2	Египет	Бурая гниль картофеля <i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al.	66
3	Иран	Бурая гниль картофеля <i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al.	2
4	Казахстан	Бурая гниль картофеля <i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al.	1
5	Китай	Бурая гниль картофеля <i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al.	33
Итого		103	

Источник: (Яковлева, 2018).

вегетационного периода проводят визуальные обследования для обнаружения возбудителей бактериальных болезней. Однако симптомы проявления бактериозов могут быть сходны с симптомами других инфекций. В настоящее время при проведении диагностики *Ralstonia solanacearum* используют методические рекомендации и стандарты, разработанные специалистами ФГБУ «ВНИИКР» на основе 1-й редакции диагностического протокола ЕОКЗР РМ 7/21 (1). Используемые современные методы, такие как иммунофлуоресцентный метод (ИФ), метод полимеразной цепной реакции (ПЦР, FLASH), биохимические тесты, выделение бактерий из исследуемых образцов в чистую культуру и подтверждение соответствия их *Ralstonia solanacearum*, а также другие подробно представлены в Стандарте организации СТО ВНИИКР

4.009-2011 «Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Методы выявления и идентификации» (Шероколова, Дренова, 2011), подготовленном на основе диагностического протокола ЕОКЗР. В соответствии с этим Стандартом в ФГБУ «ВНИИКР» проводится лабораторная диагностика, соответствующая схеме проведения экспертизы ведущих европейских лабораторий и отвечающая международным требованиям.

После пересмотра 1-й редакции Стандарта ЕОКЗР РМ 7/21 (1), в 2018 г. был подготовлен новый диагностический протокол РМ 7/21 (2) «*Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex)» (Стандарт ЕОКЗР, ЕПPO РМ 7/21 (2), 2018) для проведения

of the 1st edition of the EPPO diagnostic protocol PM 7/21 (1). Modern methods used, such as immunofluorescence method (IF), polymerase chain reaction (PCR, FLASH), biochemical tests, isolation of bacteria from test samples into a pure culture and confirmation of their matching *Ralstonia solanacearum*, as well as others are presented in detail in the Organization Standard STO VNIIKR 4.009-2011 “The causative agent of brown bacterial potato rot *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Detection and identification methods” (Sherokolava, Drenova, 2011), prepared on the basis of the EPPO diagnostic protocol. In accordance with this Standard, the FGBU “VNIIKR” carries out laboratory diagnostics, which corresponds to the examination scheme of leading European laboratories and meets international requirements.

Following the revision of the 1st edition of EPPO Standard PM 7/21 (1), a new diagnostic protocol was prepared in 2018 PM 7/21 (2) “*Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex)” (EPPO Standard, EPPO PM 7/21 (2), 2018) for diagnostics of strains of three species of *Ralstonia solanacearum* sensu lato. Sample handling, laboratory analysis and *Ralstonia* species identification, isolated from samples are described in the Standard prepared in 2018.

The specified protocol clearly distinguishes strains of different phylotypes and is proposed as a document for carrying out a diagnostic procedure in plants with symptoms, as well as asymptomatic and in water samples.

Table

**The total number of cases of detection of brown rot
of potatoes by the Rosselkhoznadzor during laboratory tests
of samples of imported ware potatoes (2007–2017)**

№	Exporting country	Quarantine species	Number of records
1	Azerbaijan	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al.	1
2	Egypt	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al.	66
3	Iran	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al.	2
4	Kazakhstan	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al.	1
5	China	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al.	33
Total			103

Source: (Yakovleva, 2018).

диагностики штаммов трех видов возбудителей *Ralstonia solanacearum sensu lato*. Работа с образцами, их лабораторный анализ и идентификация видов *Ralstonia*, выделяемых из образцов, описаны в Стандарте, подготовленном в 2018 г.

Указанный протокол четко разделяет штаммы различных филотипов и предложен в качестве документа для проведения процедуры диагностики в растениях как с симптомами, так и бессимптомных и в пробах воды.

Для получения результатов анализа проводится предварительная подготовка отобранных образцов различных растений-хозяев с симптомами и без них. Диагностика основана на ряде следующих тестов: экспресс-тесты для предположительной диагностики, выделение возбудителя на питательных средах, проведение иммунофлуоресцентного теста (ИФ), а также молекулярных тестов – теста LAMP, метода классической ПЦР и ПЦР в реальном времени и других, разработанных для обнаружения и идентификации различных филотипов бактерии. Кроме того, описано проведение теста на патогенность выделенного патогена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ФГБУ «ВНИИКР» проводится работа по использованию описанных в Стандарте ЕОКЗР РМ 7/21 (2) методов диагностики и по совершенствованию применяемых в настоящее время методов идентификации видов *Ralstonia solanacearum sensu lato* в карантинной лабораторной экспертизе.

Благодарности. Авторы выражают благодарность руководству ЕОКЗР за любезное разрешение использовать фотоматериалы сайта gd.eppo.int (<https://gd.eppo.int/taxon/RALSSO/photos>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза (ЕПКО ЕАЭС), утвержденный Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 30 ноября 2016 г.
2. Стандарт ЕОКЗР, EPPO PM 7/21 (2) «*Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex)». 2018. – Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, № 48 (1): 32–63.
3. Шероколова Н., Дренова Н. Стандарт организации СТО ВНИИКР 4.009-2011 «Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Методы выявления и идентификации». 2011.
4. Шнейдер Е. Анализ фитосанитарного риска возбудителя бурой гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* для территории Российской Федерации. Заключительный отчет. – М.: ФГБУ «ВНИИКР», 2018, 60 с.
5. Шнейдер Е., Дренова Н. Анализ фитосанитарного риска возбудителя *Ralstonia pseudosolanacearum* для территории Российской Федерации. Заключительный отчет. – М.: ФГБУ «ВНИИКР», 2019, 75 с.
6. Шнейдер Е., Дренова Н. Анализ фитосанитарного риска возбудителя *Ralstonia syzygii* для территории Российской Федерации. Заключительный отчет. – М.: ФГБУ «ВНИИКР», 2019а, 78 с.
7. Яковлева В. Оценка управления фитосанитарными рисками, связанными с импортированием, экспортацией и перемещением

To obtain the results of the analysis, preliminary preparation of selected samples of various host plants with and without symptoms is carried out. Diagnostics is based on some of the following tests: rapid tests for presumptive diagnostics, isolation of the pathogen on nutrient media, conducting an immunofluorescence test (IF), as well as molecular tests – the LAMP test, the method of classical PCR and real-time PCR and others, designed to detect and identification of different phylotypes of bacteria. In addition, a test for the pathogenicity of the isolated pathogen is described.

CONCLUSION

FGBU “VNIIKR” conducts work on using diagnosis methods described in the EPPO Standard PM 7/21 (2) and improving currently used identification methods for the species of *Ralstonia solanacearum sensu lato* in quarantine laboratory examination.

Acknowledgement. The authors would like to thank the EPPO management for their kind permission to use the photographs from the website gd.eppo.int (<https://gd.eppo.int/taxon/RALSSO/photos>).

REFERENCES

1. Common List of Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union approved by the Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of November 30, 2016.
2. EPPO PM 7/21 (2) “*Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex)”. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2018; 48 (1): 32–63.
3. Sherokolava N., Drenova N. Organization standard STO VNIIKR 4.009-2011 “Agent of brown potato rot *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Detection and Identification Methods”. 2011 (in Russian).
4. Shneyder E. Pest risk analysis of the agent of potato brown rot *Ralstonia solanacearum* for the Russian Federation. Final report. M. FGBU “VNIIKR”, 2018; 60 pp. (in Russian).
5. Shneyder E., Drenova N. Pest risk analysis of *Ralstonia pseudosolanacearum* for the Russian Federation. Final report. M. FGBU “VNIIKR”, 2019; 75 pp. (in Russian).
6. Shneyder E., Drenova N. Pest risk analysis of *Ralstonia syzygii* for the Russian Federation. Final report. M. FGBU “VNIIKR”, 2019a, 78 pp. (in Russian)
7. Yakovleva V. Assessment of pest risk management associated with the import, export and movement of ware potatoes (final report). M., 2018 (in Russian).
8. Arwiyanto T., Nurcahyanti S., Indradewa D., Widada J. Grafting local commercial tomato cultivars with H-7996 and Eg-203 to suppress bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in Indonesia. In: Proceedings of the 4th International Symposium on Tomato Diseases. Orlando, FL: International Society for Horticultural Science (ISHS). *Acta Horticulturae*, 2015; 1069: 173–178.
9. Bergsma-Vlami M., J. van de Bilt, N. Tjou-Tam-Sin, M. Westenberg, E. Meekes, H. Teunissen, and J. Van Vaerenbergh. Phylogenetic assignment of *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Ralstonia solanacearum* Phylotype I) isolated from *Rosa* spp. *Plant Dis.*, 2018; Vol. 102, № 11.

продовольственного картофеля (заключительный отчет). М., 2018.

8. Arwiyanto T., Nurcahyanti S., Indradewa D., Widada J., 2015. Grafting local commercial tomato cultivars with H-7996 and Eg-203 to suppress bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) in Indonesia. In: Proceedings of the 4th International Symposium on Tomato Diseases. Orlando, FL: International Society for Horticultural Science (ISHS). – Acta Horticulturae, 1069: 173–178.

9. Bergsma-Vlami M., J. van de Bilt, N. Tjou-Tam-Sin, M. Westenberg, E. Meekes, H. Teunissen, and J. Van Vaerenbergh, 2018. Phylogenetic assignment of *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Ralstonia solanacearum* Phylotype I) isolated from *Rosa* spp. – Plant Dis., Vol. 102, № 11.

10. Buddenhagen I., Sequeira L., Kelman A., 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. – Phytopathology, 52: 726.

11. Buddenhagen I., Kelman A., 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. – Annu. Rev. Phytopathol., 2: 203–230.

12. Cahyaniati C., Mortensen N., Mathur S., 1997. Bacterial Wilt of Banana in Indonesia. Technical Bulletin Jakarta: Directorate Plant Protection of Indonesia.

13. Carstensen G., Venter S., Wingfield M., Coutinho T., 2017. Two *Ralstonia* species associated with bacterial wilt of *Eucalyptus*. – Plant Pathology, Vol. 66 (3): 393–403.

14. Champoiseau P., Jones J., and Allen C., 2009. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties.

15. Coupat B., Chaumeille-Dole F., Fall S., Prior P., Simonet P., Nesme X. et al., 2008. Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. – FEMS Microbiol. Ecol., 66: 14–24.

16. Davis R., Moore N., Fegan M., 2001. Blood disease and Panama disease: two newly introduced and grave threats to banana production on the island of New Guinea. In: Food Security for Papua New Guinea. Proceedings of the Papua New Guinea Food and Nutrition 2000 Conference PNG University of Technology, Lae, 26–30 June 2000. Editors Bourke R.M., Allen M.G., Salisbury J.G. (Lae: ACIAR), 816–821.

17. Fegan M., Prior P., 2006. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. – Australas. Plant Pathol., № 35: 93–101.

18. Gäumann E., 1921. Onderzoeken over de bloedziekte der bananen op Celebes I (Investigations into the blood disease of bananas on Celebes Island). Mededeelingen van het Instituut voor Plantenziekten, No. 50, 47 p. In: Rev. Appl. Mycol., № 1: 225–227.

19. Genin S., Denny T., 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. – Annu. Rev. Phytopathol., № 50: 67–89.

20. Gurjar M., Sagar V., Bag T., Singh B., Sharma S., Jeevalatha A. et al., 2015. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in the Meghalaya state of India. – J. Plant Pathol., № 97: 135–142.

21. Hayward A., 1964. Characteristic of *Pseudomonas solanacearum*. – J. Appl. Bact., Vol. 27, № 2: 265–277.

22. Hayward A., 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. – Annu. Rev. Phytopathol., № 29: 65–87.

10. Buddenhagen I., Sequeira L., Kelman A. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 1962; 52: 726.

11. Buddenhagen I., Kelman A. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1964; 2: 203–230.

12. Cahyaniati C., Mortensen N., Mathur S. Bacterial Wilt of Banana in Indonesia. Technical Bulletin Jakarta: Directorate Plant Protection of Indonesia. 1997.

13. Carstensen G., Venter S., Wingfield M., Coutinho T. Two *Ralstonia* species associated with bacterial wilt of *Eucalyptus*. *Plant Pathology*, 2017; Vol. 66 (3): 393–403.

14. Champoiseau P., Jones J., and Allen C., 2009. *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties.

15. Coupat B., Chaumeille-Dole F., Fall S., Prior P., Simonet P., Nesme X. et al. Natural transformation in the *Ralstonia solanacearum* species complex: number and size of DNA that can be transferred. – *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2008; 66: 14–24.

16. Davis R., Moore N., Fegan M. Blood disease and Panama disease: two newly introduced and grave threats to banana production on the island of New Guinea. In: Food Security for Papua New Guinea. Proceedings of the Papua New Guinea Food and Nutrition 2000 Conference PNG University of Technology, Lae, 26–30 June 2000. Editors Bourke R.M., Allen M.G., Salisbury J.G. (Lae: ACIAR), 2001; 816–821.

17. Fegan M., Prior P. Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. *Australas. Plant Pathol.*, 2006; 35: 93–101.

18. Gäumann E., 1921. Onderzoeken over de bloedziekte der bananen op Celebes I (Investigations into the blood disease of bananas on Celebes Island). Mededeelingen van het Instituut voor Plantenziekten, No. 50, 47 p. In: *Rev. Appl. Mycol.*, № 1: 225–227.

19. Genin S., Denny T. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2012; 50: 67–89.

20. Gurjar M., Sagar V., Bag T., Singh B., Sharma S., Jeevalatha A. et al. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in the Meghalaya state of India. *J. Plant Pathol.*, 2015; 97: 135–142.

21. Hayward A. Characteristic of *Pseudomonas solanacearum*. – *J. Appl. Bact.*, 1964; Vol. 27, № 2: 265–277.

22. Hayward A. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1991; 29: 65–87.

23. Hayward A. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: Hayward A.C., Hartman G.L. (Eds.) *Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, CAB International: 1994; 123–135.

24. Horita M., Suga Y., Ooshiro A., Tsuchiya K. Analysis of genetic and biological characters of Japanese potato strains of *Ralstonia solanacearum*. *J. Gen. Plant Pathol.*, 2010; 76: 196–207.

25. Horita M., Tsuchiya K., Suga Y., Yano K., Waki T., Kurose D. et al. Current classification of *Ralstonia*

23. Hayward A., 1994. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. In: Hayward A.C., Hartman G.L. (Eds.) *Bacterial Wilt: The Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, CAB International: 123–135.
24. Horita M., Suga Y., Ooshiro A., Tsuchiya K., 2010. Analysis of genetic and biological characters of Japanese potato strains of *Ralstonia solanacearum*. – *J. Gen. Plant Pathol.*, № 76: 196–207.
25. Horita M., Tsuchiya K., Suga Y., Yano K., Waki T., Kurose D. et al., 2014. Current classification of *Ralstonia solanacearum* and genetic diversity of the strains in Japan. – *J. Gen. Plant Pathol.*, № 80: 455–465.
26. Janse J., van den Beld H., Elphinstone J., Simpkins S., Tjou-Tam-Sin N., van Vaerenbergh J., 2004. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. *Journal of Plant Pathology*, № 86 (2): 147–145.
27. Jeong Y., Kim J., Kang Y., Lee S., Hwang I., 2007. Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. – *Plant Dis.*, № 91: 1277–1287.
28. Kim Y., Lim S., Kim J., Lee H., Park D., 2019. First Report of *Ralstonia solanacearum* Phylootype I Causing Bacterial Wilt on *Rosa L.* spp. in Korea. – *Plant Disease*, Vol. 103, № 6: 1407.
29. Kogeethavani R., Sulastri N., Mazanah M., Rozeita L., Roff M., 2014. First Report of Blood Disease Bacterium on Banana in Malaysia. Selangor: Malaysian Agricultural Research and Development Institute.
30. Lemessa F., Zeller W., 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. – *Biological Control*, № 42 (3): 336–344.
31. Lomer C., Eden-Green S., Boa E., Supriadi E., 1992. Evidence for a forest origin of Sumatra disease of cloves. – *Trop. Sci.*, № 32: 95–98.
32. Lopes C., Rossato M., 2018. History and Status of Selected Hosts of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex Causing Bacterial Wilt in Brazil. – *Frontiers in Microbiology*, № 9.
33. Mairawita M., Suswati S., Habazar T., Hasyim A., Nasir N., 2012. *Trigona minangkabau* potential as bacterial spreader agent of *Ralstonia solanacearum* phylotype IV cause blood disease on banana plants. In: Proceedings of the 2012 International Conference on Biological and Life Sciences. Singapore: IACSIT Press, 109–116.
34. Maulana M., Sayaka B., 2007. The features of vegetables in Indonesia and the current policy in the framework of agricultural development. – *Anal. Kebijakan Pertanian*, № 5: 267–284.
35. Mahbou Somo Toukam et al., 2009. Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains in Cameroon. – *Plant Disease*, № 93 (11): 1123–1130.
36. N'Guessan C. et al., 2012. So near and yet so far: The Specific Case of *Ralstonia solanacearum* Populations from Cote d'Ivoire in Africa. – *Phytopathology*, № 102 (8): 733–740.
37. Norman D., Yuen J., 1999. First report of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* infecting pot anthurium production in Florida. – *Plant Dis.*, № 83: 300.
38. Norman D., Zapata M., Gabriel D., Duan Y., Yuen J., Mangravita-Novo A., Donahoo R., 2009. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America. – *Phytopathology*, № 99: 1070–1077.
39. Poussier S., Trigalet-Demery D., Vandewalle P., Goffinet B., Luisetti J., Trigalet A., 2000. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP
- solanacearum* and genetic diversity of the strains in Japan. – *J. Gen. Plant Pathol.*, 2014; 80: 455–465.
26. Janse J., van den Beld H., Elphinstone J., Simpkins S., Tjou-Tam-Sin N., van Vaerenbergh J. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. *Journal of Plant Pathology*, 2004; 86 (2): 147–145.
27. Jeong Y., Kim J., Kang Y., Lee S., Hwang I. Genetic diversity and distribution of Korean isolates of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Dis.*, 2007; 91: 1277–1287.
28. Kim Y., Lim S., Kim J., Lee H., Park D. First Report of *Ralstonia solanacearum* Phylootype I Causing Bacterial Wilt on *Rosa L.* spp. in Korea. *Plant Disease*, 2019; Vol. 103, № 6: 1407.
29. Kogeethavani R., Sulastri N., Mazanah M., Rozeita L., Roff M. First Report of Blood Disease Bacterium on Banana in Malaysia. Selangor: Malaysian Agricultural Research and Development Institute. 2014.
30. Lemessa F., Zeller W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control*, 2007; 42 (3): 336–344.
31. Lomer C., Eden-Green S., Boa E., Supriadi E. Evidence for a forest origin of Sumatra disease of cloves. *Trop. Sci.*, 1992; 32: 95–98.
32. Lopes C., Rossato M. History and Status of Selected Hosts of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex Causing Bacterial Wilt in Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 2018; 9.
33. Mairawita M., Suswati S., Habazar T., Hasyim A., Nasir N. *Trigona minangkabau* potential as bacterial spreader agent of *Ralstonia solanacearum* phylotype IV cause blood disease on banana plants. In: Proceedings of the 2012 International Conference on Biological and Life Sciences. Singapore: IACSIT Press, 2012; 109–116.
34. Maulana M., Sayaka B. The features of vegetables in Indonesia and the current policy in the framework of agricultural development. *Anal. Kebijakan Pertanian*, 2007; 5: 267–284.
35. Mahbou Somo Toukam et al. Broad Diversity of *Ralstonia solanacearum* Strains in Cameroon. *Plant Disease*, 2009; № 93 (11): 1123–1130.
36. N'Guessan C. et al. So near and yet so far: The Specific Case of *Ralstonia solanacearum* Populations from Cote d'Ivoire in Africa. *Phytopathology*, 2012; 102 (8): 733–740.
37. Norman D., Yuen J. First report of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* infecting pot anthurium production in Florida. *Plant Dis.*, 1999; 83: 300.
38. Norman D., Zapata M., Gabriel D., Duan Y., Yuen J., Mangravita-Novo A., Donahoo R. Genetic diversity and host range variation of *Ralstonia solanacearum* strains entering North America. *Phytopathology*, 2009; 99: 1070–1077.
39. Poussier S., Trigalet-Demery D., Vandewalle P., Goffinet B., Luisetti J., Trigalet A. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* as assessed by PCR-RFLP of the *hrp* gene region, AFLP, and 16S rRNA sequence analysis and identification of an African subdivision. *Microbiology*, 2000; 146: 1679–1692.
40. Prior P., Fegan M. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*.

of the *hrp* gene region, AFLP, and 16S rRNA sequence analysis and identification of an African subdivision. – *Microbiology*, 146: 1679–1692.

40. Prior P., Fegan M., 2005. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*. In: Proceedings of the 1st International Symposium on Tomato Diseases (Acta Horticulturae); editors Momol M.T., Ji P., Jones J.B. Orlando, FL: International Society for Horticultural Science, 127–136.

41. Roberts S., Eden-Green S., Jones P., Ambler D., 1990. *Pseudomonas syzygii* sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. – *Syst. Appl. Microbiol.*, № 13: 34–43.

42. Safni I. et al., 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, № 64: 3087–3103.

43. Sagar I. et al., 2014. Phylotype analysis of *Ralstonia solanacearum* strains causing potato bacterial wilt in Karnataka in India. – *African journal of microbiology research*, № 8 (12): 1277–1281.

44. Salcedo S., Santiago T., Colman A., Barreto R., 2017. First report of bacterial wilt of chickpea caused by *Ralstonia pseudosolanacearum* in Brazil. – *Plant Disease*, Vol. 101, № 4: 629.

45. Sikirou M., Saito K., Achigan-Dako E., Dramé K., Ahanchédé A., Venuprasad R., 2015. Genetic improvement of iron toxicity tolerance in rice – progress, challenges and prospects in West Africa. – *Plant Prod. Sci.*, № 18: 423–434.

46. Suga Y., Horita M., Umekita M., Furuya N., Tsuchiya K., 2013. Pathogenic characters of Japanese potato strains of *Ralstonia solanacearum*. – *J. Gen. Plant Pathol.*, 79: 110–114.

47. Tebaldi C., Arblaster J., 2014. Pattern scaling: Its strengths and limitations, and an update on the latest model simulations. – *Climatic Change*, 122 (3): 459–471. <https://doi.org/10.1007/s10584-013-1032-9>.

48. Teng S., Aziz N., Mustafa M., Laboh R., Ismail I., Sulaiman S. et al., 2016. The occurrence of blood disease of banana in Selangor, Malaysia. – *Int. J. Agric. Biol.*, № 18: 92–97.

49. Tjou-Tam-Sin N., van de Bilt J., Westenberg M., Gorkink-Smits P., Landman N. and Bergsma-Vlami M., 2018. Study of the virulence of *Ralstonia pseudosolanacearum* from greenhouse roses (*Rosa* spp.). – Koninklijke Nederlandse Plantenziektenkundige Vereniging, Wageningen, Netherlands. *Gewasbescherming*, Vol. 49, № 2: 57–63.

50. Villa J., Tsuchiya K., Horita M., Natural M., Opina N., Hyakumachi M., 2005. Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and *hrpB* gene sequences. – *J. Gen. Plant Pathol.*, № 71: 39–46.

51. Wenneker M. et al., 1999. *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* Race 3 (Biovar 2) in Surface Water and Natural Weed Hosts: First Report on Stinging Nettle (*Urtica dioica*). – *European Journal of Plant Pathology*, 105 (3): 307–315.

In: *Proceedings of the 1st International Symposium on Tomato Diseases (Acta Horticulturae)*; editors Momol M.T., Ji P., Jones J.B. Orlando, FL: International Society for Horticultural Science, 2005; 127–136.

41. Roberts S., Eden-Green S., Jones P., Ambler D. *Pseudomonas syzygii* sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. – *Syst. Appl. Microbiol.*, 1990; 13: 34–43.

42. Safni I. et al. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014; 64: 3087–3103.

43. Sagar I. et al. Phylotype analysis of *Ralstonia solanacearum* strains causing potato bacterial wilt in Karnataka in India. *African journal of microbiology research*, 2014; 8 (12): 1277–1281.

44. Salcedo S., Santiago T., Colman A., Barreto R. First report of bacterial wilt of chickpea caused by *Ralstonia pseudosolanacearum* in Brazil. *Plant Disease*, 2017; Vol. 101, № 4: 629.

45. Sikirou M., Saito K., Achigan-Dako E., Dramé K., Ahanchédé A., Venuprasad R. Genetic improvement of iron toxicity tolerance in rice – progress, challenges and prospects in West Africa. *Plant Prod. Sci.*, 2015; 18: 423–434.

46. Suga Y., Horita M., Umekita M., Furuya N., Tsuchiya K. Pathogenic characters of Japanese potato strains of *Ralstonia solanacearum*. *J. Gen. Plant Pathol.*, 2013; 79: 110–114.

47. Tebaldi C., Arblaster J. Pattern scaling: Its strengths and limitations, and an update on the latest model simulations. *Climatic Change*, 2014; 122 (3): 459–471. <https://doi.org/10.1007/s10584-013-1032-9>.

48. Teng S., Aziz N., Mustafa M., Laboh R., Ismail I., Sulaiman S. et al. The occurrence of blood disease of banana in Selangor, Malaysia. *Int. J. Agric. Biol.*, 2016; 18: 92–97.

49. Tjou-Tam-Sin N., van de Bilt J., Westenberg M., Gorkink-Smits P., Landman N. and Bergsma-Vlami M. Study of the virulence of *Ralstonia pseudosolanacearum* from greenhouse roses (*Rosa* spp.). Koninklijke Nederlandse Plantenziektenkundige Vereniging, Wageningen, Netherlands. *Gewasbescherming*, 2018; Vol. 49, № 2: 57–63.

50. Villa J., Tsuchiya K., Horita M., Natural M., Opina N., Hyakumachi M. Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, endoglucanase, and *hrpB* gene sequences. *J. Gen. Plant Pathol.*, 2005; 71: 39–46.

51. Wenneker M. et al. *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* Race 3 (Biovar 2) in Surface Water and Natural Weed Hosts: First Report on Stinging Nettle (*Urtica dioica*). *European Journal of Plant Pathology*, 1999; 105 (3): 307–315.

52. Wicker E., Lefeuvre P., de Cambiaire J., Lemaire C., Poussier S., and Prior P. 2012. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. – *ISME J.*, № 6: 961–974.
53. Xu et al., 2009. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. – *Cell*, № 137 (1): 133–145.
54. Yahiaoui N., Chéron J., Jeetah R., Benimadhu S., Félicité J., Cellier G., Prior P., Guérin F. Poussier S., 2016. First report of *Ralstonia pseudosolanacearum* phylotype I causing bacterial wilt on Rodrigues Island, Indian Ocean. – *Plant Dis.*, № 100: 2522.
55. Yahiaoui N., Chéron J., Ravelomanantsoa S., Hamza A., Petrousse B., Jeetah R., Jaufeerally-Fakim Y., Félicité J., Fillâtre J., Hostachy B., Guérin F., Cellier G., Prior P., Poussier S., 2017. Genetic diversity of the *Ralstonia solanacearum* species complex in the southwest Indian Ocean islands. – *Front. Plant Sci.*, № 8: 2139.
56. CABI. – URL: <https://www.cabi.org/cpc> (дата обращения: 17.06.2021).
57. EPPO Global Database. – URL: <https://gd.eppo.int> (дата обращения: 17.06.2021).
52. Wicker E., Lefeuvre P., de Cambiaire J., Lemaire C., Poussier S., and Prior P. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA. – *ISME J.*, 2012; 6: 961–974.
53. Xu et al. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell*, 2009; 137 (1): 133–145.
54. Yahiaoui N., Chéron J., Jeetah R., Benimadhu S., Félicité J., Cellier G., Prior P., Guérin F. Poussier S. First report of *Ralstonia pseudosolanacearum* phylotype I causing bacterial wilt on Rodrigues Island, Indian Ocean. *Plant Dis.*, 2016; 100: 2522.
55. Yahiaoui N., Chéron J., Ravelomanantsoa S., Hamza A., Petrousse B., Jeetah R., Jaufeerally-Fakim Y., Félicité J., Fillâtre J., Hostachy B., Guérin F., Cellier G., Prior P., Poussier S. Genetic diversity of the *Ralstonia solanacearum* species complex in the southwest Indian Ocean islands. *Front. Plant Sci.*, 2017; 8: 2139.
56. CABI. URL: <https://www.cabi.org/cpc> (last accessed: 17.06.2021).
57. EPPO Global Database. URL: <https://gd.eppo.int> (last accessed: 17.06.2021).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Шнейдер Елена Юрьевна, старший научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия;
e-mail: seunch@mail.ru.

Дренова Наталья Васильевна, старший научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0003-4020-2910, e-mail: drenova@mail.ru.

Каримова Елена Владимировна, кандидат биологических наук, начальник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Elena Shneyder, Senior Researcher, Scientific and Methodological Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: seunch@mail.ru.

Nataliya Drenova, Senior Researcher, Scientific and Methodological Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0003-4020-2910, e-mail: drenova@mail.ru.

Elena Karimova, PhD in Biology, Head of Scientific and Methodological Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru.

О некоторых пикнидиальных грибах на вегетирующем картофеле в Нечерноземье средней полосы России

М.Б. КОПИНА¹, Д.А. УВАРОВА², Д.И. ШУХИН³,
Л.М. ГОРЛОВА⁴, Н.А. ЧАЛАЯ⁵

^{1, 2, 3} ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), Московская обл., г. Раменское, р. п. Быково, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» (ФГБОУ ВО «СПбГУ»), г. Санкт-Петербург, Россия

⁵ ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР)», г. Санкт-Петербург, Россия

¹ ORCID 0000-0002-1613-1764,
e-mail: kopina.mariya@vniikr.ru

² e-mail: darya.uvarova.93@mail.ru

³ e-mail: dmitriq.shukhin@gmail.com

⁴ e-mail: lubowgorlova@gmail.com

⁵ e-mail: n.chalaya@vir.nw.ru

АННОТАЦИЯ

В статье рассматриваются фомоидные грибные возбудители, ассоциированные с вегетирующим картофелем в Московской и Ленинградской областях и выявленные в период 2019–2020 гг. Представлены биологические особенности пикнидиальных грибов, особенности проявления симптомов, описаны диагностически значимые культурально-морфологические признаки. В результате проведенных исследований на пораженных листьях картофеля из пикнидиальных грибов были идентифицированы представители родов *Didymella*, *Neoascochyta*, *Phoma*, *Boeremia*. В период вегетации доминирующее положение из непикнидиальных грибов в 80% исследуемых образцов, отобранных в Московской области, занимали виды рода *Alternaria*. Гриб *Boeremia foveata* (Foister) Aveskamp, Gruyter & Verkley был выделен в единичном случае при обследовании посадок картофеля в Пушкинском районе Санкт-Петербурга. В исследованных растениях также встречались виды, нехарактерные для картофеля: однократно из пораженных листьев были выделены виды *Neoascochyta exitialis* (Morini) Q. Chen & L. Cai и *Didymella pinodella* (L.K. Jones) Q. Chen & L. Cai. В результате проведенных исследований выделено и идентифицировано 10 видов фомоидных патогенных грибов. Полученные изоляты внесены в микологическую коллекцию ФГБУ «ВНИИКР» для изучения морфологических особенностей комплекса микромицетов картофеля, присутствие которых возможно совместно с карантинными вредными организмами.

On some pycnidial fungi on growing potatoes in the Nonchernozem region of Central Russia

М.Б. КОПИНА¹, Д.А. УВАРОВА², Д.И. ШУХИН³,
Л.М. ГОРЛОВА⁴, Н.А. ЧАЛАЯ⁵

^{1, 2, 3} FGBU “All-Russian Plant Quarantine Center” (FGBU “VNIIKR”), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia

⁴ FGBOU VO “St. Petersburg State University” (FGBOU VO “SPbGU”), St. Petersburg, Russia

⁵ Federal Research Center “N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR)”, St. Petersburg, Russia

¹ ORCID 0000-0002-1613-1764,
e-mail: kopina.mariya@vniikr.ru

² e-mail: darya.uvarova.93@mail.ru

³ e-mail: dmitriq.shukhin@gmail.com

⁴ e-mail: lubowgorlova@gmail.com

⁵ e-mail: n.chalaya@vir.nw.ru

ABSTRACT

The article studies phomoid fungal pathogens associated with growing potatoes in Moscow Oblast and Leningrad Oblast identified in the period 2019–2020. Biological characteristics of pycnidial fungi and peculiarities of infestation symptom are presented, diagnostically significant cultural and morphological characters are described. As a result of the research, representatives of the genera *Didymella*, *Neoascochyta*, *Phoma*, *Boeremia* were identified from pycnidial fungi on diseased potato leaves. During the growing season, the dominant position among non-pycnidial fungi in 80% of the studied samples taken in Moscow Oblast was formed by species of the genus *Alternaria*. The fungus *Boeremia foveata* (Foister) Aveskamp, Gruyter & Verkley was isolated in a single case during a survey of potato plantings in the Pushkin district of St. Petersburg. The studied plants also contained species uncharacteristic for potatoes: from the affected leaves, the species *Neoascochyta exitialis* (Morini) Q. Chen & L. Cai and *Didymella pinodella* (L.K. Jones) Q. Chen & L. Cai were isolated once. As a result of the research, 10 species of phomoid pathogenic fungi were isolated and identified. The obtained isolates were deposited in the mycological collection of the FGBU “VNIIKR” to study the morphological features of the complex of potato micromycetes, the presence of which is possible together with quarantine pests.

Ключевые слова. Фомоз, карантинный вредный организм, грибные возбудители, пятнистость листьев, фитопатоген.

K

ВВЕДЕНИЕ

картофель – важнейшая сельскохозяйственная культура, которая является источником питания для миллионов людей. Согласно данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО), мировое производство картофеля составляет более 400 млн тонн клубней в год. Крупнейшими производителями являются Китай, Индия, Россия, Украина, США. Россия по количеству произведенного картофеля занимает 3-е место в мировом рейтинге, с валовым сбором более 22 млн тонн в год (FAO, 2021). Реализация полного потенциала урожайности картофеля возможна в случае контроля за вредными организмами, связанными с данной культурой. Растения картофеля подвержены поражению микромицетами на всех этапах роста и развития: от посадки до появления всходов, в период вегетации, во время хранения. Основные грибные и грибоподобные возбудители заболевания из родов *Fusarium*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Phoma*, *Colletotrichum*, *Helminthosporium* являются причиной снижения урожайности и приводят к значительным потерям в производстве картофеля.

Семейство Didymellaceae в порядке Pleosporales с общим количеством более 5500 описанных таксонов – одно из наиболее многочисленных в царстве Грибы (Chen et al., 2015; Mycobank, 2021). Большинство представителей данного семейства являются фитопатогенами для растений, в основном вызывая поражения листьев и стеблей; некоторые имеют статус карантинных вредных организмов (Aveskamp et al., 2010; de Gruyter et al., 2012; Chen et al., 2017). Таксономия Didymellaceae недавно была пересмотрена на основе данных о многолокусных последовательностях ДНК и в настоящее время включает 17 клад, которые рассматриваются как отдельные роды (Indexfungorum, 2021; Chen et al., 2017). Из семейства Didymellaceae, в которое входит большинство фомоидных грибов, на картофеле отмечены виды *Boeremia*, *Phoma*, *Stagonosporopsis*, в том числе карантинный объект из перечня ЕАЭС – возбудитель черного ожога, или фомозной пятнистости листьев картофеля, *Stagonosporopsis andigena* (Turkenst.) Aveskamp, Gruyter & Verkley. Виды *Phoma eupyrena* Sacc., *B. foveata* (Foister) Aveskamp, Gruyter & Verkley и *B. exigua* var. *exigua* (Desmazieres) Aveskamp, Gruyter & Verkley являются грибными фитопатогенами картофеля, вызывают сухую гниль клубней, что приводит к значительным потерям урожая в период хранения.

Цель проводимых исследований заключалась в изучении видового разнообразия пикнидиальных грибов на вегетирующем картофеле, определении симптомов проявления и культурально-морфологических признаков.

Key words. Phomosis, quarantine pest, fungal pathogens, leaf spot, phytopathogen.

INTRODUCTION

Potatoes are an essential agricultural crop feeding millions of people. According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), world potato production is over 400 million tons of tubers per year. The largest manufacturers are China, India, Russia, Ukraine, and the USA. Russia ranks third in the world in terms of the number of potatoes produced, with a gross harvest of more than 22 million tons per year (FAO, 2021). Realizing the full potential of potato yields is possible by controlling pests associated with the crop. Potato plants are susceptible to damage by micromycetes at all stages of growth and development: from planting to emergence, during the growing season and during storage. The main fungal and fungus-like causative agents of the disease from the genera *Fusarium*, *Phytophthora*, *Alternaria*, *Phoma*, *Colletotrichum*, *Helminthosporium* cause a decrease in yields and lead to significant losses in potato production.

The family Didymellaceae in the order Pleosporales with a total of more than 5500 taxa described is one of the most numerous in the kingdom of Fungi (Chen et al., 2015; Mycobank, 2021). Most representatives of this family are phytopathogens, mainly causing damage to leaves and stems; some have quarantine pest status (Aveskamp et al., 2010; Gruyter de et al., 2012; Chen et al., 2017). The taxonomy of Didymellaceae was recently revised based on data on multilocus DNA sequences and currently includes 17 clades that are considered separate genera (Indexfungorum, 2021; Chen et al., 2017). From the Didymellaceae family, which includes most of the phomoid fungi, the species *Boeremia*, *Phoma*, *Stagonosporopsis* are indicated, including a quarantine pest from the EAEU list – *Stagonosporopsis andigena* (Turkenst.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, the agent of black blight of potato, or phoma leaf spot of potato. The species *Phoma eupyrena* Sacc., *Boeremia foveata* (Foister) Aveskamp, Gruyter & Verkley and *B. exigua* var. *exigua* (Desmazieres) Aveskamp, Gruyter & Verkley are fungal phytopathogens of potatoes, causing dry rot of tubers, which leads to significant crop losses during storage.

The purpose of the research was to study the species diversity of pycnidial fungi on growing potatoes, to determine the symptoms of infestation and cultural and morphological characteristics.

MATERIALS AND METHODS

The plant material was taken when examining collection plantings of potatoes in the Lyubertsy urban okrug, Moscow Oblast (A.G. Lorkh Federal Russian Potato Research Center), collections of potato genetic resources in the Pushkin district of St. Petersburg (NPB “Pushkin

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал отбирали при обследовании коллекционных посадок картофеля в городском округе Люберцы Московской области (Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха), коллекции генетических ресурсов картофеля в Пушкинском районе Санкт-Петербурга (НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР»), а также в личных подсобных хозяйствах Московской области. В коллекции генетических ресурсов картофеля ВИР осмотрено 140 растений *Solanum andigenum* и 150 растений диких видов картофеля (дикие виды сохраняются в виде клонов в оранжерее). Выделено 31 растение *Solanum andigenum* (11%) с визуальными симптомами поражения грибными болезнями. Всего было отобрано и проанализировано 62 растительных образца.

Выделение фомоидных грибов из зараженного растительного материала проводили закладкой во влажную камеру и на 1,5%-й картофельно-глюкозный агар (КГА), с добавлением 4%-й лимонной кислоты. Чашки Петри инкубировали в темноте при 25 °C. Определение пикнидиальных микромицетов проводили методом микроскопирования и морфометрии на микроскопе Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия). Получение изображений, их обработку и анализ проводили с помощью программного обеспечения Zeiss Efficient Navigation (ZEN), версия Lite. Морфологические признаки грибов сравнивали со стандартными описаниями, представленными в определительной литературе (Пидопличко, 1977; Семенов и др., 1980; Boerema et al., 2004; de Gruyter, 2012).

Выделение ДНК проводили из отдельных пикнид или мицелия моноспоровой культуры возбудителя с использованием набора «ФитоСорб» (ООО «Синтол», Россия). Количество и качество полученной ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 260 нм. Праймеры, использованные в исследованиях, представлены в таблице 1. Амплификацию проводили на приборе SimpliAmp (Applied Biosystems, США).

Реакционная смесь объемом 25 мкл для классической полимеразной цепной реакции (ПЦР) содержала: 5 мкл 5x ПЦР-буфера MasDDMix-2025 (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия), 1 мМ каждого праймера, 1–10 нг ДНК и до 25 мкл воды для ПЦР.

and Pavlovsk laboratories of the VIR”), as well as in personal farm households in Moscow Oblast. 140 *Solanum andigenum* plants were examined in the VIR collection of potato genetic resources and 150 wild potato plants (wild species are preserved as clones in the greenhouse). 31 *Solanum andigenum* plants (11%) with visual symptoms of fungal diseases were detected. A total of 62 plant samples were taken and analyzed.

Isolation of phomoid fungi from infected plant material was carried out by placing in a wet chamber and on 1.5% potato dextrose agar (PDA), with the addition of 4% citric acid. Petri dishes were incubated in the dark at 25 °C. Determination of pycnidial micromycetes was carried out by microscopy and morphometry using an Axio Scope A1 microscope (Carl Zeiss, Germany). Photographing, processing, and analysis were performed using Zeiss Efficient Navigation (ZEN) software, version Lite. The morphological characteristics of fungi were compared with standard descriptions presented in the identification works (Pidoplichko, 1977; Semenov et al., 1980; Boerema et al., 2004; de Gruyter, 2012).

DNA isolation was carried out from individual pycnidia or mycelium of a monospore culture of the pathogen using the FitoSorb kit (Syntol, Russia). The quantity and quality of the obtained DNA was measured on a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) at a wavelength of 260 nm. The primers used in the studies are presented in Table 1. Amplification was performed on a SimpliAmp device (Applied Biosystems, USA).

The reaction mixture with a volume of 25 μL for the classical polymerase chain reaction (PCR) contained: 5 μL of 5x PCR buffer MasDDMix-2025 (Dialat Ltd., Russia), 1 μM of each primer, 1–10 ng of DNA, and up to 25 μL of water for PCR.

Classical PCR with universal primers was performed according to the recommended amplification scheme. Separation of PCR products was carried out by electrophoresis in 1% agarose gel stained with ethidium bromide, with visualization of the results on a ChemiDoc XRS+ gel documenting system (Bio-Rad, USA).

The sequencing of the nucleotide sequence of the PCR products was carried out by the Sanger method with genetic analyzers Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific, USA) and Nanofor 05 (Syntol, Russia). Comparison of the obtained sequences with the sequences annotated in GenBank was performed using the BLAST.

Таблица 1

Универсальные праймеры, использованные при идентификации фомоидных грибов

Праймер	Мишень	Последовательность	Длина продукта, п. о.	Источник
TUB2Fd	ген β-tubulin	GTBCACCTYCARACCGGYCARTG	400–600	Groenewald et al., 2013
TUB4Rd		CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC		
ITS1	Участок рибосомной ДНК	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	550–700	White et al., 1990
ITS4		TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		

Table 1
Universal primers used in the identification of phomoid fungi

Primer	Target	Sequence	Product length, bp	Source
TUB2Fd		GTBCACCTYCARACCGGYCARTG		
TUB4Rd	β-tubulin gene	CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC	400–600	Groenewald et al., 2013
ITS1	Ribosomal DNA region	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	550–700	White et al., 1990
ITS4		TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		

Постановку классической ПЦР с универсальными праймерами проводили по рекомендованной схеме амплификации. Разделение ПЦР-продуктов осуществляли методом электрофореза в 1%-м агарозном геле с окраской бромистым этидием, с визуализацией результатов на гель-документирующей системе ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США).

Расшифровку нуклеотидной последовательности ПЦР-продуктов проводили методом секвенирования по Сэнгеру. Результаты электрофореза считывались автоматически секвенатором Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific, США) и секвенатором «Нанофор 05» (ООО «Синтол», Россия). Сравнение полученных последовательностей с последовательностями, аннотированными в GenBank, проводили с использованием приложения BLAST.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования позволили определить комплекс фомоидных микромицетов на картофеле как сопутствующих патогенов при проведении фитосанитарных обследований насаждений. Таксономический список идентифицированных микромицетов включает 35 видов из 9 классов, 7 порядков, 14 семейств.

В проведенных нами обследованиях основное внимание было уделено определению взаимосвязи пикнидиальных грибов с симптомами, которые были отмечены на растении. В целом фомоидные патогены вызывали листовые пятнистости разного диаметра, некрозы варьировали от светло-серых до бурых, окаймление некрозов также было изменчиво. Как правило, на пораженных листьях микофлора была представлена комплексом видов; учитывая последнее, было предпочтительно определить симптомы, наиболее характерные для преобладающего вида пикнидиальных грибов. Из исследуемых образцов нами были определены следующие таксоны.

1. *Boeremia foveata*

Данный вид широко распространен в большинстве европейских стран, регулируется как карантинный организм в некоторых странах Африки, Азии, Северной и Южной Америки. На территории России значительное распространение имеет возбудитель фомозной гнили клубней *Boeremia exigua* var. *exigua*, о выявлении сходной формы var. *foveata* сообщения немногочисленны. Так, обследование картофелеводческих хозяйств Западной и Восточной Сибири (Новосибирской и Кемеровской областей) показало присутствие вида *Boeremia foveata* в 20% случаев (Заверткина, 2007; Пилипова, Шалдяева, 2019).

RESULTS AND DISCUSSION

The studies carried out made it possible to determine the complex of phomoid micromycetes on potatoes as concomitant pathogens during phytosanitary surveys of plantations. The taxonomic list of identified micromyces includes 35 species from 9 classes, 7 orders, 14 families.

In the performed surveys, the main attention was paid to determining the relationship of pycnidial fungi with the symptoms that were noted on the plant. In general, phomoid pathogens caused leaf spots of different diameters, necrosis varied from light gray to brown, and the bordering of necrosis was also variable. As a rule, mycoflora was represented by a complex of species on the affected leaves; in view of the latter, it was preferable to identify the symptoms most characteristic of the predominant species of pycnidial fungi. We identified the following taxa from the studied samples.

1. *Boeremia foveata*

This species is widespread in most European countries, regulated as a quarantine organism in some countries in Africa, Asia, North and South America. On the territory of Russia, the agent of dry rot of potato *Boeremia exigua* var. *exigua* has a significant distribution, the similar *Boeremia exigua* var. *foveata* has been recorded in few cases. Thus, a survey of potato farms in Western and Eastern Siberia (Novosibirsk Oblast and



Рис. 1. Симптомы проявления *Boeremia foveata* на листьях картофеля (фото авторов)

Fig. 1. Symptoms of *Boeremia foveata* on potato leaves (photo by the authors)

Место отбора: Пушкинский район, Санкт-Петербург.

Описание преобладающих симптомов на листьях.

Характерные для листовой формы возбудителя светлые, серые мелкие пятна округлой или вытянутой формы с темной каймой. Во влажной камере на поверхности листьев хаотично располагались темноокрашенные пикники (рис. 1).

На питательной среде колонии сначала светлые, со временем становятся темноокрашенными. Мицелий воздушный, от серого к темно-серому (рис. 2). Скорость роста умеренная. Многочисленные пикники погруженные или полупогруженные. Пикники размером от 70–100 до 120–150 мкм. Одноклеточные конидии в пикницах имели размеры 4–6,5 мкм длиной и 1,3–2 мкм шириной.

2. *Phoma herbarum*

Место отбора: Пушкинский район, Санкт-Петербург.

Описание преобладающих симптомов на листьях.

Мелкие некротические пятна разного диаметра округлой или неправильной формы, со временем приобретают серо-бурую окраску. Пятна ограничены темным ободком. На стеблях – линейные вытянутые темно-бурые или черные пятна. Во влажной камере образуются черные пикники. Нами отмечено, что во влажной камере на стебле пораженного растения картофеля количество пикnidов более обильное по сравнению с листьями (рис. 3).

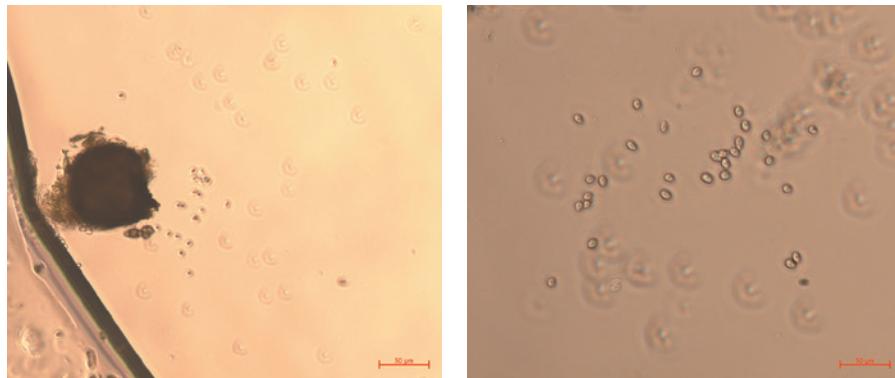


Рис. 2. Культурально-морфологические признаки *Boeremia foveata* (фото авторов)

Fig. 2. Cultural and morphological characteristics of *Boeremia foveata* (photos by the authors)

Kemerovo Oblast) showed the presence of the species *Boeremia foveata* in 20% of cases (Zavertkina, 2007; Pilipova, Shaldayeva, 2019).

Place of sampling: Pushkinsky district, St. Petersburg.

Description of the prevailing symptoms on the leaves. Light, gray small spots of a round or elongated shape with a dark border, characteristic of the leaf form of the pathogen. In a humid chamber, dark-colored pycnidia were randomly located on the leaf surface (Fig. 1).

On a nutrient medium, colonies are at first light, with time they become dark-colored. Aerial mycelium, from gray to dark gray (Fig. 2). The growth rate is moderate. Numerous pycnidia submerged or semi-submerged. The pycnidia range in size from 70–100 to 120–150 μm . Unicellular conidia in pycnidia were 4–6.5 μm long and 1.3–2 μm wide.

2. *Phoma herbarum*

Place of sampling: Pushkinsky district, St. Petersburg.

Description of the prevailing symptoms on the leaves. Small necrotic spots of various diameters, round or irregular, acquire a gray-brown color over time. The spots are limited by a



Рис. 3. Симптомы проявления *Phoma herbarum* на листьях картофеля (фото авторов)

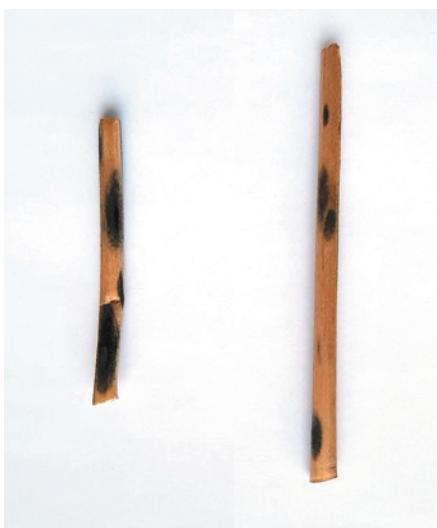


Fig. 3. Symptoms of *Phoma herbarum* on potato leaves (photos by the authors)

В наших исследованиях вид *P. herbarum* был обнаружен в образцах, отобранных в коллекции генетических ресурсов картофеля НПБ «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР». Частота выделения данного патогена из пораженных растений составила в среднем 25%.

На КГА колонии возбудителя росли в течение 3–7 дней, демонстрируя серо-коричневую порошкообразную поверхность (рис. 4) и темно-серый, переходящий в черный, реверс. В течение 10–20 дней в колониях образовались многочисленные сферические темные пикниды на поверхности среды. Пикниды были разного размера, 200–700 мкм в диаметре. В пикницах находились одиночные пикноспоры от округлой до слегка удлиненной овальной формы, без перегородок, размером 4–6 мкм х 1,5–3,5 мкм.

3. *Boeremia exigua* var. *exigua*

Место отбора: коллекционные посадки картофеля в городском округе Люберцы Московской области (ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха»).

Описание преобладающих симптомов на листьях. Для данного возбудителя характерна ярко выраженная органотропная специализация, вид в большинстве случаев выделялся из черешков пораженных листьев и стеблей. Пятна вытянутые, темные, коричневые или бурые, без четких границ, расплывчатые. Со временем покрываются пикницами сначала светлого, позже темного или черного цвета (рис. 5).

4. *Neoascochyta exitialis*

Место отбора: Пушкинский район, Санкт-Петербург.

Описание преобладающих симптомов на листьях. Пятна светлые, мелкие, многочисленные, с четкой границей светло-бурового цвета. Во влажной камере на некротизированной ткани образуются одиночные темно-бурые или черные пикницы (рис. 6).

В одном случае из пораженных растений был выделен вид *Neoascochyta exitialis*. Нами определен как нехарактерный патоген картофеля. В определительной литературе отмечен на луке; из зерновых – на овсе, пшенице, ржи; на картофеле описание отсутствует (Noordeloos et. al., 1993).

Колонии на КГА: умеренная скорость роста, диаметр – 20–25 мм через 7 дней, мицелий хлопьевидный, светло-серый, по краю серо-оливковый; реверс белый в наружном кольце, оливковый в центре. Конидии – от широких веретеновидных до цилиндрических, слегка изогнутые, гладкие и тонкостенные, гиалиновые, односептные, размером 15,5–25 × 4–7 мкм (рис. 7).

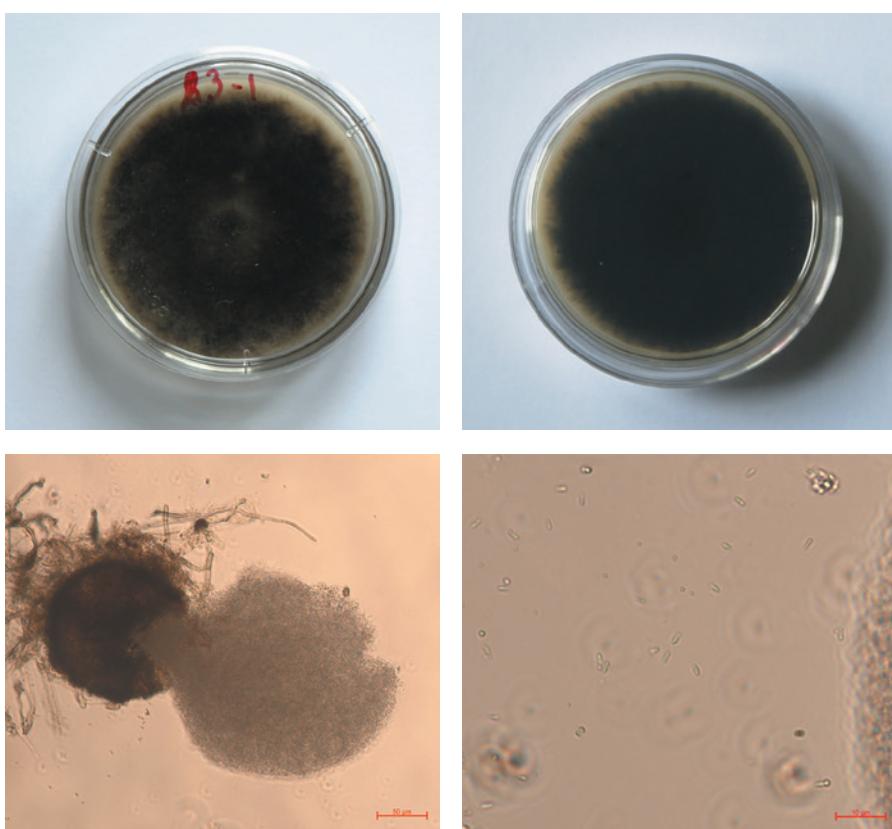


Рис. 4. Культурально-морфологические признаки *Phoma herbarum* (фото авторов)

Fig. 4. Cultural and morphological characteristics of *Phoma herbarum* (photos by the authors)

dark rim. On the stems there are linear, elongated dark brown or black spots. Black pycnids form in the humid chamber. We noted that in a humid chamber on the stem of an affected potato plant, the amount of pycnids is more abundant compared to leaves (Fig. 3).

In this research, the species *P. herbarum* was detected in samples taken in the collection of potato



Рис. 5. Листья картофеля в микофлоре с преобладанием *Boeremia exigua* var. *exigua* (фото авторов)

Fig. 5. Potato leaves in mycoflora with a predominance of *Boeremia exigua* var. *exigua* (photo by the authors)



Рис. 6. Листья картофеля в микофлоре с преобладанием *Neoascochyta exitialis* (фото авторов)

Fig. 6. Potato leaves in mycoflora with a predominance of *Neoascochyta exitialis* (photo by the authors)

5. *Didymella pinodella* (= *Phoma pinodella*)

Место отбора: Пушкинский район, Санкт-Петербург.

Был выделен в одном случае из образцов листьев картофеля, отобранных на этой территории. Литературные данные о выявлении ранее на пасленовых на территории России отсутствуют.

Колонии слегка войлочные, серовато-коричневые, позднее становятся черными, иногда делятся на сектора с обильными пикнидами и светло-желтым конидиальным экссудатом. Пикники – от округлых до различной формы, диаметром 200–300 мкм. Конидии гиалиновые, в основном без перегородок, иногда с одной перегородкой, 4,5–8 (–10) x 2–3 мкм; в старых культурах иногда становятся желто-коричневыми (рис. 8). Хламидоспоры темно-коричневые, от сферических до неправильных, от гладких до шероховатых, терминальные или интеркалярные, образуются поодиночке или цепочками. Вид отнесен на *Pisum sativum*, *Trifolium pratense* и других представителях семейства Leguminosae.

Для определения видовой принадлежности полученных изолятов проводили выделение ДНК из мицелия и определяли нуклеотидную последовательность следующих участков генов: межгенного

генетического ресурса НПБ “Pushkin and Pavlovsk laboratories of the VIR”. Частота изоляции этого патогена из пораженных растений составила 25%.

На PDA, колонии патогена росли за 3–7 дней, покрываясь серо-коричневой пылью поверхности (рис. 4) и темно-серой, становясь черными, обратной стороны. Внутри 10–20 дней, на поверхности среды в колониях образовались множество различных по размеру сферических темных пынниц. Диаметр пынниц варьировался от 200 до 700 мкм. Пынницы содержали одиночные пыннospores, круглые или слегка удлиненные яйцевидные формы, без隔壁, измеряющие 4–6 мкм x 1,5–3,5 мкм.

3. *Boeremia exigua* var. *exigua*

Place of sampling: collection plantings of potatoes in the urban district of Lyubertsy, Moscow Oblast (A.G. Lorkh Federal Russian Potato Research Center).

Description of the prevailing symptoms on the leaves. This pathogen is characterized by a pronounced organotrophic specialization; in most cases, the species was isolated from the petioles of the affected leaves and stems. The spots are elongated, dark, brown or black, without clear boundaries, indistinct. Over time, they become covered with pycnids, first light, later dark or black (Fig. 5).

4. *Neoascochyta exitialis*

Place of sampling: Pushkinsky district, St. Petersburg.

Description of the prevailing symptoms on the leaves. The spots are light, small, numerous, with a clear border of light brown color. In humid chamber

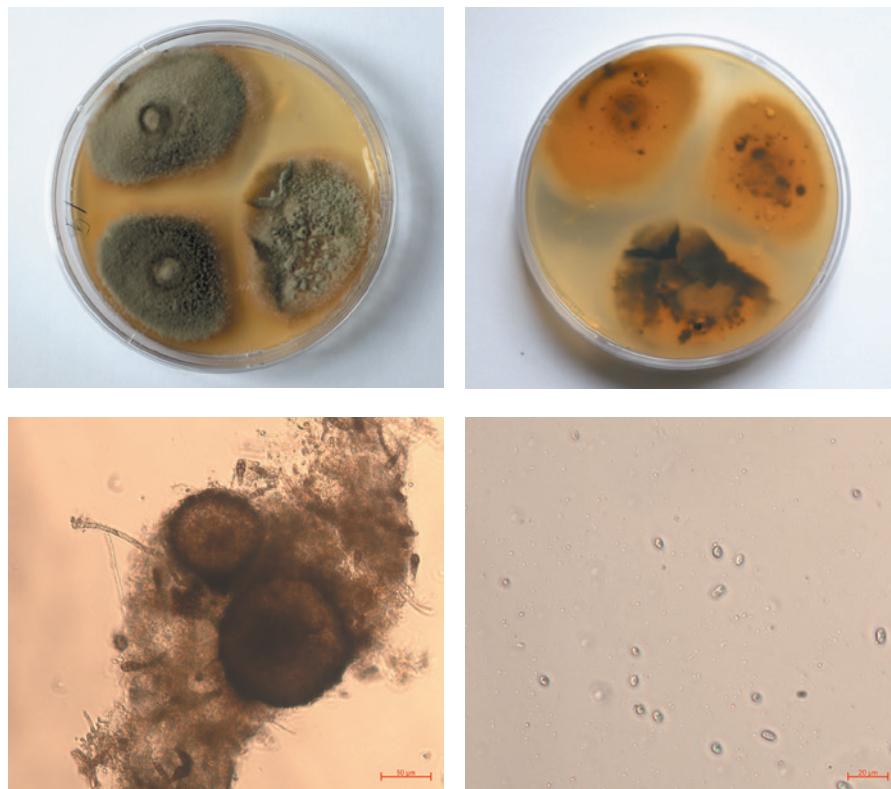


Рис. 7. Культурально-морфологические признаки *Neoascochyta exitialis* (фото авторов)

Fig. 7. Cultural and morphological characteristics of *Neoascochyta exitialis* (photos by the authors)



Рис. 8. Культуральные признаки *Didymella pinodella* (фото авторов)

Fig. 8. Cultural characteristics of *Didymella pinodella* (photos by the authors)

спайсера (ITS) рДНК и β -тубулина (β -tub) грибной ДНК. Последовательности изучены у 20 штаммов, полученных из листьев картофеля.

Из проанализированных образцов для двух не оказалось гомологичных последовательностей в GenBank. Все оставшиеся последовательности были идентифицированы, проверены по гомологии с последовательностями из GenBank. Процент совпадений варьировал в пределах 96,26–100%. Результаты представлены в таблице 2.

Также нами были изучены симптомы проявления при искусственной инокуляции растений картофеля (листья и черешки) в лабораторных условиях изолятом *Stagonosporopsis andigena* (изолят CBS 101.80). На 5-й день после заражения на листьях образовались мелкие (чаще 2,0–2,5 мм, иногда до 10 мм в диаметре) коричневые концентрические, невдавленные пятна (рис. 9). На более поздней стадии развития многочисленные мелкие

single dark brown or black pycnids are formed on necrotic tissue (Fig. 6).

In one case, the species *Neoascochyta exitialis* was isolated from the affected plants. We have defined it as an uncharacteristic potato pathogen. In the key guides it is noted on onion; among cereals – on oats, wheat, rye; no description on potatoes (Noordeloos et al., 1993).

Colonies on PDA: moderate growth rate, diameter – 20–25 mm after 7 days, mycelium is flocculent, light gray, gray-olive along the edge; the reverse is white in the outer ring,

olive in the center. Conidia – from wide fusiform to cylindrical, slightly curved, smooth and thin-walled, hyaline, one-septal, 15.5–25 \times 4–7 μm in size (Fig. 7).

5. *Didymella pinodella* (= *Phoma pinodella*)

Place of sampling: Pushkinsky district, St. Petersburg.

It was isolated in one case from samples of potato leaves taken in this area. No literary data on earlier detection on Solanaceae in Russia.

Colonies are slightly tomentose, grayish-brown, later turn black, sometimes divided into sectors with abundant pycnids and light-yellow conidial exudate. Pycnids – from rounded to various shapes, 200–300 μm in diameter. Hyaline conidia, mostly without septa, sometimes with one septum, 4.5–8 (–10) \times 2–3 μm ; in old cultures they sometimes turn yellow-brown (Fig. 8). Chlamydospores are dark brown, spherical to irregular, smooth to rough, terminal or intercalary, singly or in chains. The species was recorded on *Pisum sativum*,

Таблица 2

Анализ нуклеотидных последовательностей образцов фомоидных грибов из пораженных листьев картофеля

Образец	Вид, с которым отмечена гомология в GenBank	Номер последовательности (ITS)	ITS		β -тубулин	
			Покрытие, %	Идентичность, %	Покрытие, %	Идентичность, %
Сорт Ночка	<i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	MK514090.1	100	100	100	99,71
Сорт Сокур	<i>Boeremia exigua</i> var. <i>pseudolilacis</i>	MK333929.1	100	100	100	98,94
<i>Solanum andigenum</i> (A 4417)	<i>Didymella pinodella</i>	MN853862.1	100	100	100	99,64
<i>Solanum andigenum</i> (244)	<i>Phoma herbarum</i>	LC5114997.1	100	99,73	100	100
<i>Solanum andigenum</i> (51)	<i>Neoascochyta exitialis</i>	VN446179.1	100	96,26		
<i>Solanum andigenum</i> (A4439)	<i>Boeremia foveata</i>	JQ804843.1	100	100	100	98,75

Table 2
Analysis of nucleotide sequences of samples of phomoid fungi from infected potato leaves

Sample	GenBank homology species	Sequence number (ITS)	ITS		β -tubulin	
			Coverage, %	Identity, %	Coverage, %	Identity, %
Nochka variety	<i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	MK514090.1	100	100	100	99.71
Sokur variety	<i>Boeremia exigua</i> var. <i>pseudolilacis</i>	MK333929.1	100	100	100	98.94
<i>Solanum andigenum</i> (A 4417)	<i>Didymella pinodella</i>	MN853862.1	100	100	100	99.64
<i>Solanum andigenum</i> (244)	<i>Phoma herbarum</i>	LC5114997.1	100	99.73	100	100
<i>Solanum andigenum</i> (51)	<i>Neoascochyta exitialis</i>	VN446179.1	100	96.26		
<i>Solanum andigenum</i> (A4439)	<i>Boeremia foveata</i>	JQ804843.1	100	100	100	98.75

повреждения сливались, ограничиваясь жилками. Листья полностью чернели, первоначально оставаясь прикрепленными к стеблю, позже они опадали. Возбудитель *S. andigena* вызывает пятнистость листьев, проявление которой сходно с альтернариозом картофеля, вызываемым видами *Alternaria solani*, *A. alternata*, фитофторозом картофеля *Phytophthora infestans*, септориозом *Septoria lycopersici* var. *malagutii*, фомозом картофеля *Boeremia exigua* var. *exigua*, *Phoma* spp. (Вредные организмы, имеющие карантинное значение для Европы, 1996; EPPO, 2021; Pest categorisation of *Stagonosporopsis andigena*, 2018).



Рис. 9. Симптомы проявления на картофеле при искусственной инокуляции *Stagonosporopsis andigena* (фото авторов)

Trifolium pratense and other Leguminosae family representatives.

To determine the species of the obtained isolates, DNA was isolated from the mycelium and the nucleotide sequences of the following gene regions was determined: intergenic spacer (ITS) of rDNA and β -tubulin (β -tub) of fungal DNA. Sequences studied in 20 strains obtained from potato leaves.

Of the samples analyzed, two did not show homologous sequences in GenBank. All the rest sequences were identified, checked for homology with sequences from GenBank. The percentage of coincidences ranged from 96.26 to 100%. The results are presented in table 2.

We also studied the symptoms during artificial inoculation of potato plants (leaves and petioles) in laboratory conditions with the isolate of *Stagonosporopsis andigena* (isolate CBS 101.80). On the 5th day after infection, small (usually 2.0–2.5 mm, sometimes up to 10 mm in diameter) brown concentric, not depressed spots were formed on the leaves (Fig. 9). At a later stage of development, numerous small lesions coalesced, limited to veins. Leaves completely blackened, initially remaining attached to the stem, later they fell off. The agent *S. andigena* causes leaf spots, the manifestation of which is similar to early blight of potato caused by the species *Alternaria solani*, *A. alternata*, late blight of potatoes *Phytophthora infestans*, septoria leaf spot of potato *Septoria lycopersici* var. *malagutii*, dry rot of potato *Boeremia exigua* var. *exigua*, *Phoma* spp. (Pests of quarantine importance for Europe, 1996; EPPO, 2021; Pest categorisation of *Stagonosporopsis andigena*, 2018).

When isolated in a pure culture on PDA, the colony along the edges is white, folded, the edge is uneven. The underside is black with a light pink edge. There is also a pink pigment in the center. Over time, the medium turns yellow due to the formation of crystals, which quickly dissolve in the medium. The mycelium is loose. Pycnidia 125–200 μm in diameter, immersed in

Fig. 9. Symptoms on potatoes with artificial inoculation *Stagonosporopsis andigena* (photo by the authors)

При выделении в чистую культуру на КГА колония по краям белая, складчатая, край неровный. Нижняя сторона черная со светло-розовым краем. В центре также присутствует розовый пигмент. Со временем среда окрашивается в желтый цвет из-за формирования кристаллов, которые быстро растворяются в среде. Мицелий рыхлый. Пикники 125–200 мкм в диаметре, погружены в субстрат, сначала светлые, затем темнеют. Скорость роста колонии составляет 2,9 мм/сут.

На овсяном агаре (OA) колония серая, светлеет от центра к краям, со складками, край колонии белый, ровный. Вокруг колонии заметен розовый пигмент. Нижняя сторона колонии серая с розовым краем. Мицелий рыхлый, прижатый. Кристаллы образуются редко, плохо заметны. Пикники 125–200 мкм в диаметре, погружены в субстрат, под мицелием почти незаметны. Иногда по краям образуются заметные пикники. Скорость роста колонии – 4,81 мм/сут.

На МЕА (Malt Extract Agar) колония белая, в центре светло-серая, складчатая, край колонии неровный. Нижняя сторона колонии черная с розовым краем. В центре присутствует розовый пигмент.

the substrate, first light, then darkening. Colony growth rate is 2.9 mm/day.

On oat agar (OA), the colony is gray, brightens from the center to the edges, with folds, the edge of the colony is white, even. Pink pigment is visible around the colony. The underside of the colony is gray with a pink edge. The mycelium is loose, compressed. Crystals are rarely formed, poorly visible. Pycnids 125–200 μm in diameter, immersed in the substrate, almost invisible under the mycelium. Sometimes noticeable pycnids form around the edges. Colony growth rate – 4.81 mm/day.

On MEA (Malt Extract Agar), the colony is white, light gray in the center, folded, the edge of the colony is uneven. The underside of the colony is black with a pink edge. There is a pink pigment in the center. The mycelium is felt, compressed. Pycnids are immersed in the substrate, solitary or densely grouped, 125–200 μm in diameter. Colony growth rate – 2.6 mm/day (Fig. 10, 11).

Conidia are colorless, of various shapes: oval, almost spherical, sometimes broadly cylindrical, sometimes narrower in the middle, also may be with oil droplets. Conidia can be divided into two groups: small – 6.41–7.58 x 3.20–4.33 μm (average



Рис. 10. Колонии *Stagonosporopsis andigena* на МЕА, КГА, ОА, аверс (фото авторов)

Fig. 10. Colonies of *Stagonosporopsis andigena* on MEA, PDA, OA, respectively; obverse (photo by the authors)

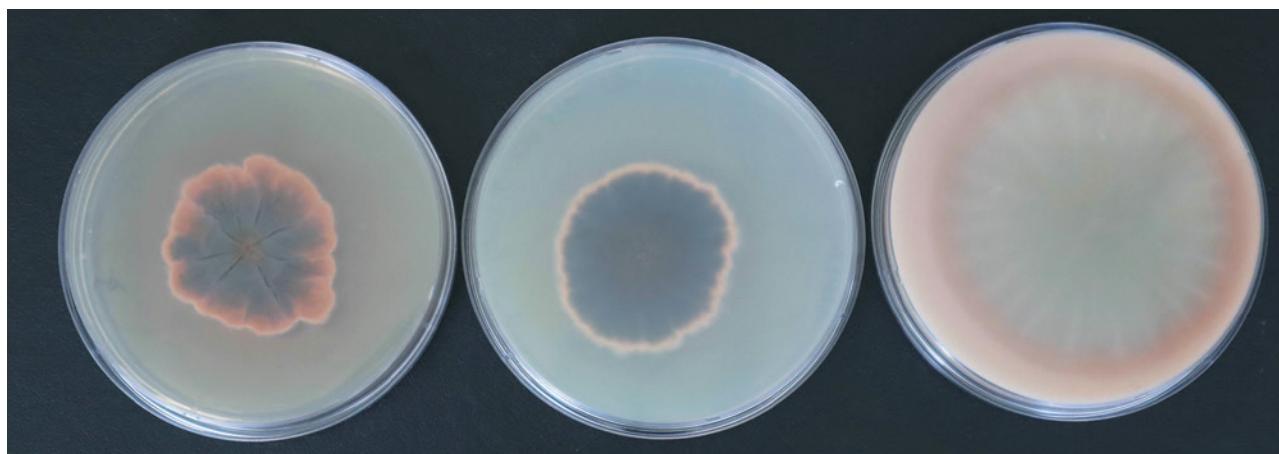
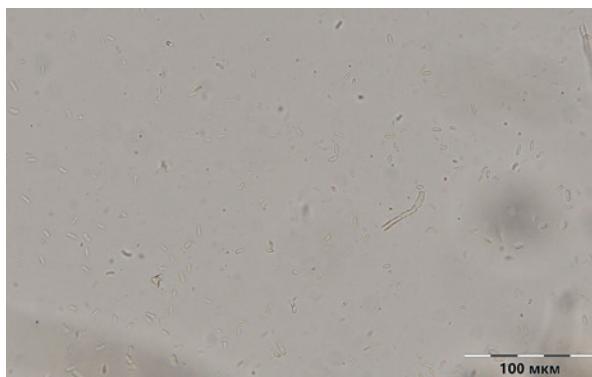


Рис. 11. Колонии *Stagonosporopsis andigena* на МЕА, КГА, ОА, реверс (фото авторов)

Fig. 11. Colonies of *Stagonosporopsis andigena* on MEA, PDA, OA, respectively; reverse (photo by the authors)



**Рис. 12. Пикноспоры
*Stagonosporopsis andigena***
(фото авторов)

**Fig. 12. Pycnospores
of *Stagonosporopsis andigena***
(photo by the authors)

Мицелий войлочный, прижатый. Пикниды погружены в субстрат, одиночные или плотно сгруппированные, 125–200 мкм в диаметре. Скорость роста колонии – 2,6 мм/сут (рис. 10, 11).

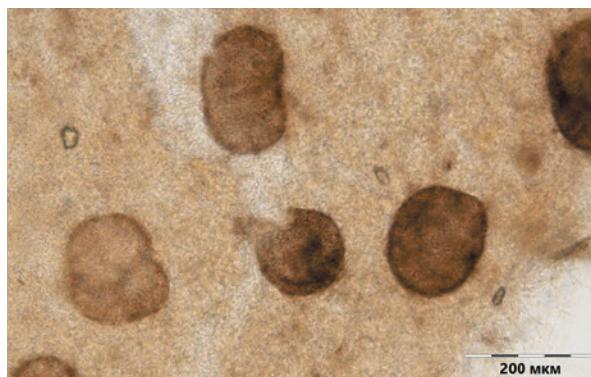
Конидии бесцветные, различной формы: овальные, почти шаровидные, иногда широко цилиндрические, иногда более узкие в середине, а также могут быть с каплями масла. Конидии можно разделить на две группы: мелкие – 6,41–7,58 x 3,20–4,33 мкм (в среднем 7,12 x 3,57 мкм) и более крупные – 7,99–11,78 x 3,06–4,96 мкм (в среднем 9,03 x 3,75 мкм) (рис. 12, 13).

Наряду с фомоидными грибами на всех отобранных образцах с симптомами листовой пятнистости в большинстве случаев присутствовал комплекс патогенов. Доминирующее положение в 80% исследуемых образцов, отобранных в Московской области, занимали виды рода *Alternaria*. Представитель крупноспоровых видов *A. solani* был выявлен в одном случае на картофеле сорта Ночка. Мелкоспоровые виды, объединенные в секцию *A. alternata*, были выделены практически во всех исследуемых образцах, исключение составили сорта Калибр, Сиверский, Дебют, Корчма, Кумач. Поражение картофеля *A. solani* вызывает появление крупных угловато-округлых бурых пятен с четко выраженной концентрической зональностью или мелких коричневых пятен неправильной формы со слабой зональностью по краю листа. При сильной степени поражения листья полностью засыхали (Гомжина, Ганнибал, 2017).

В единичных случаях нами было отмечено поражение видом *Colletotrichum coccodes* (Wallroth) S.J. Hughes. На зараженных растениях отмечались мокрые пятна, которые со временем изменяли цвет от темно-бурового до черного. Пораженные растения иногда проявляли устойчивые симптомы увядания, листья нижнего и среднего ярусов имели хлоротичную окраску (Farley, 1976).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что симптоматика поражения вегетирующего картофеля пикнидиальными грибами в целом имеет схожий характер проявления. Установлено, что сопутствующие патогены могут маскировать выраженные симптомы целевого возбудителя и в зависимости от преобладающего вида признаки поражения могут варьировать.



**Рис. 13. Пикниды
*Stagonosporopsis andigena***
(фото авторов)

**Fig. 13. Pycnids
of *Stagonosporopsis andigena***
(photo by the authors)

7.12 x 3.57 μm) and larger – 7.99–11.78 x 3.06–4.96 μm (average 9.03 x 3.75 μm) (Fig. 12, 13).

Along with phomoid fungi, all the samples with leaf spot symptoms in most cases contained a complex of pathogens. Species of the genus *Alternaria* prevailed in 80% of the samples taken in Moscow Oblast. Representative of large spore species, *A. solani*, was detected in one case on Nocka potato variety. Small-spore species combined into a section *A. alternata*, were isolated in almost all the studied samples, with the exception of the varieties Kalibr, Siversky, Debut, Korchma, Kumach. The infestation of potato by *A. solani* causes the large angular-rounded brown spots with clearly expressed concentric zoning or small brown spots of irregular shape with weak zoning along the edge of the leaf. With a strong degree of damage, the leaves completely dried up (Gomzhina, Gannibal, 2017).

In a few cases, the infestation by the species *Colletotrichum coccodes* (Wallroth) S.J. Hughes was recorded. Infected plants showed wet spots that changed color from dark brown to black over time. Affected plants sometimes showed persistent symptoms of wilting; the leaves of the lower and middle layers were chlorotic (Farley, 1976).

CONCLUSION

The conducted research has shown that the symptomatology of growing potato infestation by pycnidial fungi generally has a similar manifestation pattern. It has been established that concomitant pathogens can conceal the pronounced symptoms of the target pathogen and, depending on the predominant species, the signs of damage can vary.

Of the non-pycnidial fungi, a complex of species of representatives *Alternaria*, *Cladosporium*, *Stemphylium* was mostly identified. The obtained results of studying the species composition of phomoid fungi show a wide range of micromycetes associated with leaf spots of potato (*Didymella pinodella* (= *Phoma pinodella*), *Phoma* sp., *Phoma herbarum*, *Boeremia* sp., *Boeremia foveata*, *Boeremia exigua* var. *exigua*, *Neoascochyta exitialis*). The latter must be taken into account when developing methods for the species identification of quarantine objects on potatoes and assessing the selectivity and specificity of the proposed techniques.

Из непикнидальных грибов наиболее часто в исследуемых образцах идентифицировали комплекс видов представителей *Alternaria*, *Cladosporium*, *Stemphylium*. Полученные результаты изучения видового состава фомоидных грибов показывают широкий спектр микромицетов, связанных с листовыми пятнистостями листьев картофеля (*Didymella pinodella* (= *Phoma pinodella*), *Phoma* sp., *Phoma herbarum*, *Boeremia* sp., *Boeremia foveata*, *Boeremia exigua* var. *exigua*, *Neoascochyta exitialis*). Последнее необходимо учитывать при разработке методов видовой идентификации карантинных объектов на картофеле и оценке селективности и специфичности предлагаемых методов.

В результате проведенных исследований были определены неспецифичные для картофеля патогены *Didymella pinodella* (= *Phoma pinodella*), *Neoascochyta exitialis*. Впервые проведено изучение и описание культуральных признаков возбудителя черного ожога картофеля на разных питательных средах.

На пораженных листьях картофеля также были идентифицированы виды *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Alternaria tenuissima*, *Cladosporium herbarum*, *Didymella pinodella* (= *Phoma pinodella*), *Colletotrichum coccodes*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum*, *Microsphaeropsis* sp., *Neoascochyta exitialis*, *Epicoccum nigrum*, *Phoma* sp., *Phoma herbarum*, *Boeremia* sp., *Boeremia foveata*, *Boeremia exigua* var. *exigua*, *Phytophthora infestans*. Все выделенные изолятами были депонированы в микологическую коллекцию ФГБУ «ВНИИКР».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вредные организмы, имеющие карантинное значение для Европы. – М.: Колос, 1996, 912 с.
 2. Гомжина М., Ганнибал Ф., 2017. Современная систематика грибов рода *Phoma sensu lato*. – Мицология и фитопатология, № 51 (5): 268–275.
 3. Заверткина И. Биологические особенности сибирской популяции *Phoma exigua* var. *foveata* и совершенствование системы защиты картофеля от фомоза: автореф. дис. ...канд. биол. наук. – Кинель, 2007, 19 с.
 4. Пидопличко Н. Грибы – паразиты культурных растений. Грибы несовершенные. Определитель. Т 2. – Киев: Наукова думка, 1977, 290 с.
 5. Пилипова Ю., Шалдяева Е., 2019. Мониторинг вредных организмов как основа фитосанитарной оптимизации агрокосистем картофеля. – Инновации и продовольственная безопасность, № 1: 42–50.
 6. Семенов А.Я., Абрамова Л., Хохряков М. Определитель паразитных грибов на плодах и семенах культурных растений – Л.: Колос, 1980, 302 с.
 7. Aveskamp M., Gruyter H., Woudenberg J., Verkley G., Crous P., 2010. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, 2010; 65: 1–64.
 8. Boerema G., de Gruyter J., Noordeloos M., Hamers M. *Phoma* identification manual: differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. – CABI Publishing, 2004, 470 p.
 9. Chen Q., Hou L., Duan W., Crous P., Cai L., 2017. Didymellaceae revisited. – *Studies in Mycology*, Vol. 87: 105–159.
 10. Chen Q., Zhang K., Zhang G., 2015. A polyphasic approach to characterise two novel species of *Phoma* (Didymellaceae) from China. – *Phytotaxa*, № 197: 267–281.
- As a result of the studies carried out, pathogens non-specific for potatoes were identified: *Didymella pinodella* (= *Phoma pinodella*), *Neoascochyta exitialis*. For the first time, the study and description of the cultural characteristics of the causative agent of black blight of potato on different nutrient media was carried out.
- On affected potato leaves, there were also identified the species *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Alternaria tenuissima*, *Cladosporium herbarum*, *Didymella pinodella* (= *Phoma pinodella*), *Colletotrichum coccodes*, *Aureobasidium pullulans*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium oxysporum*, *Microsphaeropsis* sp., *Neoascochyta exitialis*, *Epicoccum nigrum*, *Phoma* sp., *Phoma herbarum*, *Boeremia* sp., *Boeremia foveata*, *Boeremia exigua* var. *exigua*, *Phytophthora infestans*. All extracted isolates were deposited in the mycological collection of the FGBU “VNIIKR”.

REFERENCES

1. Pests of quarantine importance for Europe [Vrednyye organizmy, imeyushchiye karantinnoye znacheniye dlya Evropy]. M.: Kolos, 1996, 912 pp. (in Russian).
2. Gomzhina M., Hannibal F. Modern systematics of the genus *Phoma sensu lato* [Sovremennaya sistematika gribov roda *Phoma sensu lato*]. *Mycology and phytopathology*, 2017; 51 (5): 268–275 (in Russian).
3. Zavertkina I. Biological features of the Siberian population *Phoma exigua* var. *foveata* and improvement of the system of protection of potatoes against phomosis [Biologicheskiye osobennosti sibirskoy populjatsii *Phoma exigua* var. *foveata* i sovershenstvovaniye sistemy zashchity kartofelya ot fomoza]: extended abstract of Cand. Biol. Sci. Dissertation. Kinel, 2007: 19 (in Russian).
4. Pidoplichko N. Fungi – parasites of cultivated plants [Gribi – parazity kulturnykh rasteniy]. Imperfect Fungi. Identification Key. V 2. Kiev, Naukova dumka, 1977; 290 pp. (in Russian).
5. Pilipova Y., Shaldayeva E. Monitoring of harmful organisms as the basis of phytosanitary optimization of agroecosystems potatoes [Monitoring vrednykh organizmov kak osnova fitosanitarnoy optimizatsii agroekosistem kartofelya]. *Innovation and food security*, 2019; 1: 42–50 (in Russian).
6. Semenov A.Ya., Abramova L., Khokhryakov M. Identification keys to parasitic fungi on fruits and seeds of cultivated plants [Opredelitel parazitnykh gribov na plodakh i semenakh kulturnykh rasteniy] L. Kolos, 1980; 302 pp. (in Russian).
7. Aveskamp M., Gruyter H., Woudenberg J., Verkley G., Crous P. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, 2010; 65: 1–64.
8. Boerema G., de Gruyter J., Noordeloos M., Hamers M. *Phoma* identification manual: differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. CABI Publishing, 2004, 470 p.
9. Chen Q., Hou L., Duan W., Crous P., Cai L. Didymellaceae revisited. – *Studies in Mycology*, 2017; 87: 105–159.
10. Chen Q., Zhang K., Zhang G. A polyphasic approach to characterise two novel species of *Phoma* (Didymellaceae) from China. *Phytotaxa*, 2015; 197: 267–281.

11. De Gruyter J., 2012. Revised taxonomy of *Phoma* and allied genera. <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/429756>.
12. De Gruyter J., van Gent-Pelzer M., Woudenberg J., van Rijswick P., Meekes E., Crous P., Bonants P., 2012. The development of a validated real-time (TaqMan) PCR for detection of *Stagonosporopsis andigena* and *S. crystalliniformis* in infected leaves of potato and tomato. – European Journal of Plant Pathology, № 134: 301–313.
13. Farley J.D., 1976. Survival of *Colletotrichum coccodes* in soil. – Phytopathology, Vol. 66: 640–641.
14. Noordeloos M., de Gruyter J., van Eijk G., Roeijmans H., 1993. Production of dendritic crystals in pure cultures of *Phoma* and *Ascochyta* and its value as a taxonomic character relative to morphology, pathology and cultural characteristics. – Mycol. Res, № 97: 1343–1350.
15. Pest categorisation of *Stagonosporopsis andigena*. 2018. – EFSA Journal, 16 (10): 5441.
16. Food and Agriculture Organization (FAO). – URL: <http://www.fao.org/home/ru/> (дата обращения: 01.07.2021).
17. CABI Plantwise, 2021. – URL: <https://www.plantwise.org> (дата обращения: 15.06.2021).
18. EPPO, 2021. EPPO Global Database. – URL: <https://gd.eppo.int> (дата обращения: 01.05.2021).
19. Indexfungorum, 2021. – URL: <https://www.indexfungorum.org> (дата обращения: 01.06.2021).
20. Groenewald J., Nakashima C., Nishikawa J., Shin H., Park J., Jama A., 2013. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. – Studies in Mycology, 75: 115–170.
21. Mycobank, 2021. MYCOBANK Database. – URL: <https://www.mycobank.org> (дата обращения: 15.06.2021).
22. White T., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. – In book: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. – Academic Press, San Diego (US): 315–322.
11. De Gruyter J. Revised taxonomy of *Phoma* and allied genera. 2012. <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/429756>.
12. De Gruyter J., van Gent-Pelzer M., Woudenberg J., van Rijswick P., Meekes E., Crous P., Bonants P. The development of a validated real-time (TaqMan) PCR for detection of *Stagonosporopsis andigena* and *S. crystalliniformis* in infected leaves of potato and tomato. European Journal of Plant Pathology, 2012; 134: 301–313.
13. Farley J.D. Survival of *Colletotrichum coccodes* in soil. Phytopathology, 1976; 66: 640–641.
14. Noordeloos M., de Gruyter J., van Eijk G., Roeijmans H. Production of dendritic crystals in pure cultures of *Phoma* and *Ascochyta* and its value as a taxonomic character relative to morphology, pathology and cultural characteristics. Mycol. Res, 1993; 97: 1343–1350.
15. Pest categorisation of *Stagonosporopsis andigena*. EFSA Journal, 2018; 16 (10): 5441.
16. Food and Agriculture Organization (FAO). URL: <http://www.fao.org/home/ru/> (last accessed: 01.07.2021).
17. CABI Plantwise, 2021. URL: <https://www.plantwise.org> (last accessed: 15.06.2021).
18. EPPO, 2021. EPPO Global Database. URL: <https://gd.eppo.int> (last accessed: 01.05.2021).
19. Indexfungorum, 2021. URL: <https://www.indexfungorum.org> (last accessed: 01.06.2021).
20. Groenewald J., Nakashima C., Nishikawa J., Shin H., Park J., Jama A. Species concepts in *Cercospora*: spotting the weeds among the roses. Studies in Mycology, 2013; 75: 115–170.
21. Mycobank, 2021. MYCOBANK Database. URL: <https://www.mycobank.org> (last accessed: 15.06.2021).
22. White T., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In book: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego (US). 1990; 315–322.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Копина Мария Борисовна, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник – начальник научно-методического отдела микологии и гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0002-1613-1764, e-mail: kopina.mariya@vniikr.ru.

Уварова Дарья Анатольевна, младший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; e-mail: darya.uvarova.93@mail.ru.

Шухин Дмитрий Игоревич, младший научный сотрудник научно-методического отдела микологии и гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; e-mail: dmitriq.shukhin@gmail.com.

Горлова Любовь Михайловна, студент-магистрант биологического факультета ФГБОУ ВО «СПбГУ», г. Санкт-Петербург, Россия; e-mail: lubowgorlova@gmail.com.

Чалая Надежда Александровна, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник отдела генетических ресурсов картофеля ФИЦ «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова», г. Санкт-Петербург, Россия; e-mail: n.chalaya@vir.nw.ru.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Maria Kopina, PhD in agricultural sciences, senior researcher, head of the Scientific and Methodological Department for Mycology and Helminthology, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0002-1613-1764, e-mail: kopina.mariya@vniikr.ru.

Daria Uvarova, junior researcher, Research Department for Molecular Genetic Methods of Diagnosis, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: darya.uvarova.93@mail.ru.

Dmitry Shukhin, junior researcher, Scientific and Methodological Department for Mycology and Helminthology, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: dmitriq.shukhin@gmail.com.

Lyubov Gorlova, MS student, Biology Department, FGBOU VO “SPbGU”, Saint Petersburg, Russia; e-mail: lubowgorlova@gmail.com.

Nadezhda Chalaya, PhD in agricultural sciences, senior researcher, Department of Potato Genetic Resources, Federal Research Center “N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR)”, Russia, St. Petersburg, Russia; e-mail: n.chalaya@vir.nw.ru.

УДК 579.64, 632.3

UDC 579.64, 632.3

Применение теста на патогенность в диагностике возбудителя бактериального ожога гороха

И.М. ИГНАТЬЕВА¹, О.Ю. СЛОВАРЕВА²,
И.Г. БАШКИРОВА³

^{1, 2, 3} ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия

³ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (ФГАОУ ВО «РУДН»), г. Москва, Россия

¹ ORCID 0000-0003-1047-0105,
e-mail: babiraignirmi@ya.ru

² ORCID 0000-0001-6022-5955,
e-mail: slovareva.olga@gmail.com

³ ORCID 0000-0001-9014-4179,
e-mail: bashkirova@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Возбудитель бактериального ожога гороха *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett) Young et al. (*P. s.* pv. *pisi*) является основным фитопатогеном гороха посевного (*Pisum sativum* L.). Национальные организации по карантину и защите растений (НОКЗР) требуют надежных методов подтверждения отсутствия возбудителя бактериоза. Цель данной работы – изучение возможности применения теста на патогенность в диагностике возбудителя бактериального ожога гороха. В ходе апробации теста использовали растения гороха сорта Пионер, штамм *P. s.* pv. *pisi* CFBP 2105, набор «Проба-ГС», произведенный ООО «АгроДиагностика» (Россия), и праймеры AN7F/AN7R (Qing Ch. et al., 2016). После предварительных испытаний предложенный тест на патогенность может быть использован для определения вирулентности изолята, а также может быть предложен в качестве одного из дополнительных подтверждающих методов идентификации фитопатогена в исследуемом образце при разработке методических рекомендаций по выявлению и идентификации возбудителя ожога гороха.

Ключевые слова. *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, разработка методических рекомендаций, инокуляция, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

ВВЕДЕНИЕ



Бактериальный ожог гороха, вызванный *P. s.* pv. *pisi*, впервые был идентифицирован в 1915 г. в Колорадо, США (Sackett, 1916), и впоследствии был выявлен во многих странах, где развито производство гороха (Martín-Sanz A. et al., 2011; Martín-Sanz A. et al., 2012).

Using a pathogenicity test for the diagnosis of the bacterial pea blight agent

I.M. IGNATYEVA¹, O.YU. SLOVAREVA²,
I.G. BASHKIROVA³

^{1, 2, 3} FGBU "All-Russian Plant Quarantine Center" (FGBU "VNIIKR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia

³ FGAOU VO "Peoples' Friendship University of Russia" (FGAOU VO "RUDN"), Moscow, Russia

¹ ORCID 0000-0003-1047-0105,
e-mail: babiraignirmi@ya.ru

² ORCID 0000-0001-6022-5955,
e-mail: slovareva.olga@gmail.com

³ ORCID 0000-0001-9014-4179,
e-mail: bashkirova@mail.ru

ABSTRACT

The agent of the bacterial pea blight, *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Sackett) Young et al. (*P. s.* pv. *pisi*), is a main phytopathogen of pea (*Pisum sativum* L.). National Plant Protection Organizations (NPPOs) require reliable techniques to confirm the absence of the bacterial blight agent. The aim of this work is to study the possibility of applying a pathogenicity test for the diagnosis of the bacterial pea blight agent. During the approbation of the test, we used pea plants of the Pioneer variety, strain *P. s.* pv. *pisi* CFBP 2105, "Proba-GS" kit produced by LLC "AgroDiagnostika" (Russia), and the primers AN7F/AN7R (Qing Ch. et al., 2016). After preliminary tests, the proposed test for pathogenicity can be used to determine the virulence of the isolate, and can also be proposed as one of the additional confirmatory methods for identifying a phytopathogen in a test sample when developing guidelines for detecting and identifying the causative agent of the bacterial pea blight.

Key words. *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*, development of guidelines, inoculation, polymerase chain reaction (PCR).

INTRODUCTION

Bacterial pea blight caused by *P. s.* pv. *pisi* was first identified in Colorado, USA (Sackett, 1916), in 1915, and later it was detected in many countries where pea is produced (Martín-Sanz A. et al., 2011; Martín-Sanz A. et al., 2012). The pest is included in the Quarantine

Патоген включен в Карантинный перечень (список ограниченно распространенных карантинных видов) стран Восточной Африки (2001) и в Карантинный перечень Межафриканского фитосанитарного совета (IAPSC) (1989); в список карантинных вредных организмов, отсутствующих на территории Боливии, Парагвая, Перу, Чили (COSAVE) (2019); является карантинным организмом для Израиля и Туниса. Распространяясь с посевным материалом, зараженным бактериальной инфекцией в латентном состоянии, бактериоз значительно расширил свой ареал за последние годы. Вид включен в карантинный перечень ряда стран – импортеров гороха из РФ (Китай, Турция). Это ограничивает экспортный потенциал РФ. Основными покупателями российского гороха в январе – июле 2019 г. являлись: Турция – 20,8% (70 тыс. тонн), Пакистан – 17,5% (58,9 тыс. тонн), Индия – 16,7% (56,3 тыс. тонн), Италия – 10,0% (33,5 тыс. тонн), Бангладеш – 7,8% (26,2 тыс. тонн), Испания – 6,4% (21,5 тыс. тонн), Объединенные Арабские Эмираты – 3,3% (11,2 тыс. тонн), Германия – 2,9% (9,9 тыс. тонн), Египет – 2,6% (8,8 тыс. тонн), Непал – 2,2% (7,6 тыс. тонн). Экспортные поставки гороха из России в 2018 г. находились на отметке в 1143,7 тыс. тонн. По сравнению с 2017 г. в 2018 г. объемы увеличились на 9,7% (на 100,9 тыс. тонн), с 2013 г. – на 240,3% (на 807,6 тыс. тонн) (АБ Центр, 2019; Игнатьева и др., 2021; Akhtar M. A. et al., 1985; Benlioglu K. et al., 2010). На данное время ведутся фитосанитарные согласования по экспорту гороха в Китай.

После сбора урожая фитопатоген сохраняется в семенах. В случае высокой степени заражения семян могут наблюдаться симптомы как на самих всходах, так и на семенах. Симптомы болезни – маленькие, неправильной формы водянистые повреждения на листьях, черешках и стручках, распространяющиеся в стебли и часто сопровождающиеся некрозом (Ali M. et al., 2015). В дальнейшем инфекция в стеблях может распространяться вверх на другие прилистники и листья. С развитием заболевания зоны поражения разрастаются, растения усыхают и в итоге погибают. В условиях, подходящих для проникновения бактерий в ткани растений, распространение может происходить по всему полю. Чаще всего заражению способствуют иней, град или любой вид повреждения, облегчающий проникновение бактерии через поранения растений, за счет переноса фитопатогена с ветром на здоровые растения. Ранняя и достоверная диагностика *P. s. pv. pisi* предотвращает распространение патогена на новые территории Российской Федерации. Для определения распространения фитопатогена в РФ и установления зон, свободных от вредного организма, необходимо научное обследование посевных площадей. В связи со всем вышесказанным является актуальной разработка методических рекомендаций по выявлению и идентификации возбудителя бактериального ожога гороха *P. s. pv. pisi*. Тест на патогенность может быть предложен в качестве одного из дополнительных подтверждающих методов идентификации фитопатогена в исследуемом образце при разработке методических рекомендаций по выявлению и идентификации возбудителя ожога гороха, ранее идентифицированного с помощью молекулярных методов диагностики.

List (list of limitedly present quarantine species) of East African countries (2001) and the Inter-African Phytosanitary Council Quarantine List (IAPSC) (1989); the List of quarantine pests absent in Bolivia, Paraguay, Peru, Chile (COSAVE) (2019); it is a quarantine pest for Israel and Tunisia. Spreading with plants for planting infected with a bacterial infection in a latent state, the bacteriosis has significantly expanded its area in recent years. The species is included in the quarantine list of a number of countries importing peas from the Russian Federation (China, Turkey). This limits the export potential of the Russian Federation. The main buyers of Russian peas in January – July 2019 were: Turkey – 20.8% (70 thousand tons), Pakistan – 17.5% (58.9 thousand tons), India – 16.7% (56, 3 thousand tons), Italy – 10.0% (33.5 thousand tons), Bangladesh – 7.8% (26.2 thousand tons), Spain – 6.4% (21.5 thousand tons), United Arab Emirates – 3.3% (11.2 thousand tons), Germany – 2.9% (9.9 thousand tons), Egypt – 2.6% (8.8 thousand tons), Nepal – 2.2% (7.6 thousand tons). Export deliveries of peas from Russia in 2018 were at around 1,143.7 thousand tons. Compared to 2017, in 2018 the volumes increased by 9.7% (by 100.9 thousand tons), since 2013 – by 240.3% (by 807.6 thousand tons) (AB Center, 2019; Ignatyeva et al., 2021; Akhtar M. A. et al., 1985; Benlioglu K. et al., 2010). Phytosanitary agreements concerning the export of peas to China are being discussed.

After harvest, the phytopathogen remains in the seeds. In the case of a high degree of seed infestation, symptoms can be observed both on the seedlings themselves and on the seeds. Symptoms include small, irregular, watery lesions on leaves, petioles, and pods that extend into the stems and are often accompanied by necrosis (Ali M. et al., 2015). The infection in the stems can later spread upward to other stipules and leaves. With the development of the disease, the affected areas grow, the plants dry out and eventually die. Under conditions suitable for the penetration of bacteria into plant tissue, spreading can occur throughout the field. Most often, frost, hail, or any kind of damage that facilitates the penetration of bacteria through lesions to plants, due to the transfer of the phytopathogen with the wind to healthy plants, contributes to the infection. Early and reliable diagnosis of *P. s. pv. pisi* prevents the spread of the pathogen to new territories of the Russian Federation. To determine the spread of the phytopathogen in the Russian Federation and establish areas free from the pest, a scientific examination of the cultivated areas is necessary. Considering all of the stated above, it is relevant to develop guidelines for the detection and identification of the bacterial pea blight agent *P. s. pv. pisi*. The pathogenicity test can be proposed as one of the additional confirmatory methods for the identification of a phytopathogen in the sample under study when developing guidelines for the detection and identification of the bacterial pea blight agent, previously identified with molecular diagnostic methods.

MATERIALS AND METHODS

When conducting the research, a bacterial culture of the reference bacterial strain CFBP 2105 *P. s. pv. pisi* was used from the French collection of bacteria

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении исследований использовали бактериальную культуру референтного штамма бактерии CFBP 2105 *P. s. pv. pisi* из Французской коллекции бактерий фитопатогенов (Collection Francaise de Bacteries Phytopathogenes (CFBP), Франция). С целью апробации теста на патогенность проводили заражение растений гороха сорта Пионер штаммом CFBP.

При выборе сорта гороха отталкивались от сроков созревания культуры. Важно провести тест в кратчайшие сроки, не задерживая сроки диагностики фитопатогена в исследуемом образце. В исследовании был использован сорт гороха овощного Пионер (код сорта 9900993; год регистрации 2001; оригинал Spojnia-Hodowla I Nasiennictwo Ogrodnicze SP. Z.O.O., W. Nochowie, 63-100, Srem, Poland; срок созревания очень ранний; сорт устойчив к вирусу желтой мозаики фасоли). В список очень ранних сортов гороха овощного, которые также могут быть использованы при проведении данного теста, включены Ария, Корвин, Никитка, Оскар, Прима, Спринтер (сорт относительно устойчив к корневым гнилям) и Увертюра (Государственный реестр, 2019).

Провели посев 60 шт. семян гороха, предварительно замоченных в стерильной дистиллированной воде в течение суток. Каждое семя помещали в отдельную ячейку кассеты для рассады емкостью 90 мл, в качестве грунта использовали готовую смесь из верхового и низинного торфа, известняковой доломитовой муки, нитроаммофосфата и речного песка. В период получения всходов, а также на протяжении всего опыта применяли следующие условия: продолжительность освещения – 16 ч., температура – 25–27 °C, относительная влажность воздуха – 55–70%.

Заражение растений в фазе 2–3 листьев суточной культурой *P. s. pv. pisi* проводили на 11-й день. Для заражения одного растения использовали 10 мкл бактериальной суспензии в концентрации 10^6 КОЕ/мл. Метод заражения заключался в несквозном прокалывании основания листа и нанесении с помощью дозатора капли суспензии на место прокола (рис. 1) (International Seed Federation, 2020). В качестве отрицательного контроля заражения использовали стерильную дистиллированную воду. Растения, зараженные *P. s. pv. pisi* (50 шт.), пространственно изолировали от растений, представляющих собой отрицательный контроль заражения (10 шт.). Наблюдения за растениями проводили ежедневно.

Для подтверждения заражения проводили отбор и подготовку аналитических проб на 22-й день. Отдельные пробы брали от каждого из 10 зараженных растений и от одного растения, представляющего собой отрицательный контроль. Растение отделяли от корневой системы и измельчали с помощью скальпеля. К пробе добавляли 20–30 мл фосфатно-солевого буфера (PBS), после чего пробу помещали на ротационный шейкер и устанавливали режим 200 об/мин, встряхивали от 30 до 40 мин. Полученный мацерат фильтровали через бумажный фильтр с диаметром пор 3–5 мкм в пробирку объемом 50 мл. Пробирки уравновешивали попарно буфером, который использовали для мацерации, и центрифугировали в течение 10 мин. при 8000–10000 об/мин при температуре от 4 до 10 °C, используя центрифугу

phytopathogens (Collection Francaise de Bacteries Phytopathogenes (CFBP), France). In order to test the pathogenicity test, pea plants of the Pioneer variety were infected with the CFBP strain.

Choosing pea cultivars was based on the timing of the ripening of the culture. It is important to carry out the test as soon as possible, without delaying the diagnosis of the phytopathogen in the test sample. The study used the vegetable pea variety Pioneer (cultivar code 9900993; year of registration 2001; originator Spojnia-Hodowla I Nasiennictwo Ogrodnicze SP. Z.O.O., W. Nochowie, 63-100, Srem, Poland; ripening period is very early; variety resistant to yellow mosaic bean virus). The list of very early varieties of vegetable peas that can also be used in this test includes Aria, Corvin, Nikitka, Oscar, Prima, Sprinter (the variety is relatively resistant to root rot) and Overture (State Register, 2019).

60 pea seeds were sown, pre-soaked in sterile distilled water for 24 hours. Each seed was placed in a separate cell of a seedling cassette with a capacity of 90 ml; a ready-made mixture of high and low peat, limestone dolomite flour, nitroammophosphate and river sand was used as a soil. During the germination period, as well as throughout the entire experiment, the following conditions were used: duration of illumination – 16 h., temperature – 25–27 °C, and relative air humidity – 55–70%.

Infection of plants in the phase of 2–3 leaves with a daily culture of *P. s. pv. pisi* was performed on the 11th day. To infect one plant, 10 µl of a bacterial suspension at a concentration of 10^6 CFU/ml was used. The method of infection consisted in blind piercing of the base of the leaf and applying a drop of suspension to



Рис. 1. Капли суспензии *P. s. pv. pisi*, нанесенные на места проколов оснований листьев растений гороха (фото О.Ю. Словаревой)

Fig. 1. Suspension drops of *P. s. pv. pisi* applied to the puncture sites of the bases of the leaves of pea plants (photo by O.Yu. Slovareva)



Рис. 2. Симптомы увядания на верхней части инокулированного листа гороха через 7 суток после заражения *P. s. pv. pisi* (фото О.Ю. Словаревой)

Fig. 2. Wilting symptoms on the top of the inoculated pea leaf 7 days after infection with *P. s. pv. pisi* (photo by O.Yu. Slovareva)

с охлаждением Allegra X-30R (Beckman Coulter, Дания). После центрифугирования супернатант осторожно удаляли, а осадок ресусцинировали в 1 мл PBS. От каждой пробы отбирали 200 мкл и использовали для экстракции ДНК с помощью набора «Проба-ГС» (ООО «АгроДиагностика», Россия) и для проведения ПЦР с праймерами AN7F/AN7R, специфичными для *P. s. pv. pisi* (Qing Ch. et al., 2016). Для контроля ингибирования амплификации использовали смесь плазмида и праймеров Mus714F/Mus714R (Мазурин и др., 2012). Классическую ПЦР с праймерами и с внутренним положительным контролем проводили в отдельных пробирках для каждого образца, используя амплификатор T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Детекцию продуктов амплификации проводили, используя камеру для горизонтального электрофореза SE-2 (ООО «Хеликон», Россия), источник тока для электрофореза «Эльф» (ООО «ДНК-Технология», Россия) и гель-документирующую систему ChemiDoc (Bio-Rad, США).

Дополнительно в течение 21 суток (со дня заражения) с целью выявления симптомов заражения продолжали наблюдения за растениями, от которых пробы не отбирали.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В течение всего периода с момента заражения растений гороха суспензией *P. s. pv. pisi* до этапа отбора аналитических проб проводили наблюдения за развитием симптомов бактериального ожога гороха. Первые симптомы заражения отмечены на 18-й день, через 7 суток после инокуляции растений суспензией возбудителя бактериоза. На верхней части листа, в которой проводили инокуляцию, отмечены симптомы увядания (рис. 2). На растениях, инокулированных стерильной дистиллированной водой, отсутствовали признаки увядания и иные симптомы заболевания.

the puncture site using a dispenser (Fig. 1) (International Seed Federation, 2020). Sterile distilled water was used as a negative control of infection. Plants infected with *P. s. pv. pisi* (50 pieces) were spatially isolated from plants representing negative control of infection (10 pieces). Plants were observed daily.

To confirm the infection, the samples under study were taken and prepared on the 22nd day. Separate samples were taken from each of the 10 infected plants and from one plant, which is a negative control. The plant was separated from the root system and cut with a scalpel. 20–30 ml of phosphate-buffered saline (PBS) was added to the sample, after which the sample was placed on a rotary shaker and set to 200 rpm and shaken for 30 to 40 min. The resulting macerate was filtered through a paper filter with a pore diameter of 3–5 µm into a 50 ml test tube. The tubes were equilibrated in pairs with the maceration buffer and centrifuged for 10 min. at 8000–10000 rpm at a temperature of 4 to 10 °C using an Allegra X-30R refrigerated centrifuge (Beckman Coulter, Denmark). After centrifugation, the supernatant was carefully removed and the pellet was resuspended in 1 ml PBS. 200 µL was taken from each sample and used for DNA extraction using the Proba-GS kit (AgroDiagnostika, Russia) and for PCR with AN7F/AN7R primers specific for *P. s. pv. pisi* (Qing Ch. et al., 2016). To control the inhibition of amplification, a mixture of plasmid and primers Mus714F/Mus714R was used (Mazurin et al., 2012). Classical PCR with primers and with an internal positive control was performed in separate tubes for each sample using a T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Amplification products were detected using an SE-2 horizontal electrophoresis chamber (Helikon, Russia), an Elf electrophoresis current source (DNA-Technology, Russia) and a ChemiDoc gel documenting system (Bio-Rad, USA).

Additionally, in order to identify symptoms of infection, the plants from which samples were not taken were still observed for 21 days (from the day of infection).

RESULTS AND DISCUSSION

During the entire period from the moment of infection of pea plants with a *P. s. pv. pisi*, prior to the stage of taking samples for studying, the development of the bacterial pea blight symptoms was monitored. The first symptoms of infection were noted on the 18th day, 7 days after inoculation of plants with a suspension of the bacteriosis causative agent. Symptoms of wilting were noted on the upper part of the inoculated leaf (Fig. 2). Plants inoculated with sterile distilled water showed no signs of wilting and other symptoms of the disease.

11 days after infection, wilting symptoms were noted both on the entire area of inoculated leaves of pea plants and on the leaves located below (Fig. 3). There were no signs of wilting and other symptoms of the disease on plants inoculated with sterile distilled water. As a result of PCR with primers AN7F/AN7R for DNA samples isolated from inoculated plants, products with a length of 272 base pairs (bp) were obtained, which corresponded to a positive control of amplification, for which the DNA of *P. s. pv. pisi* was used (Fig. 4).

Через 11 суток после заражения симптомы увядания отмечены как на всей площади инокулированных листьев растений гороха, так и на листьях, расположенных ниже (рис. 3). Признаки увядания и иные симптомы заболевания отсутствовали на растениях, инокулированных стерильной дистиллированной водой. В результате проведенной ПЦР с праймерами AN7F/AN7R для образцов ДНК, выделенной из инокулированных растений, получены продукты длиной 272 пары оснований (п. о.), что соответствовало положительному контролю амплификации, в качестве которого использовали ДНК *P. s. pv. pisi* (рис. 4).

Для отрицательного контроля заражения (растение, инокулированное стерильной дистиллированной водой) и для отрицательных контролей выделения ДНК, а также для проведения ПЦР продукт амплификации с праймерами AN7F/AN7R отсутствовал. Для всех образцов и контролей в результате ПЦР с внутренним положительным контролем получены продукты амплификации длиной 714 п. о., что свидетельствует об отсутствии ингибирования ПЦР-реакции (рис. 4). Полученные результаты ПЦР позволяют сделать вывод о том, что возбудитель бактериального ожога гороха через 11 суток после заражения присутствовал в растениях, инокулированных бактериальной супензией, и отсутствовал в растениях, инокулированных стерильной дистиллированной водой.

В течение последующих 10 суток после подтверждения заражения методом ПЦР отмечали развитие заболевания на инокулированных супензиях возбудителя растениях гороха. Спустя 21 сутки после заражения отмечено увядание всего растения целиком и гибель 14 растений из 40 (рис. 5). На других 26 зараженных растениях отмечали наличие симптомов в виде увядания нижних листьев, малообширных хлорозов и краевых ожогов белого цвета (рис. 6). В то же время среди 9 растений, инокулированных стерильной дистиллированной водой, не отмечено симптомов заболевания.



Рис. 3. Симптомы увядания на нижних листьях гороха через 11 суток после заражения *P. s. pv. pisi* (фото О.Ю. Словаревой)

Fig. 3. Wilting symptoms on the lower leaves of peas 11 days after infection with *P. s. pv. pisi* (photo by O.Yu. Slovareva)

For negative control of infection (plant inoculated with sterile distilled water) and for negative controls of DNA extraction, as well as for PCR, the amplification product with primers AN7F/AN7R was absent. For all samples and controls, as a result of PCR with an internal positive control, amplification products of 714 bp in length were obtained, which indicates the absence of inhibition of the PCR reaction (Fig. 4). The obtained PCR results allow us to conclude that the causative agent of bacterial pea blight was present in plants inoculated with a bacterial suspension 11 days after infection, and was absent in plants inoculated with sterile distilled water.

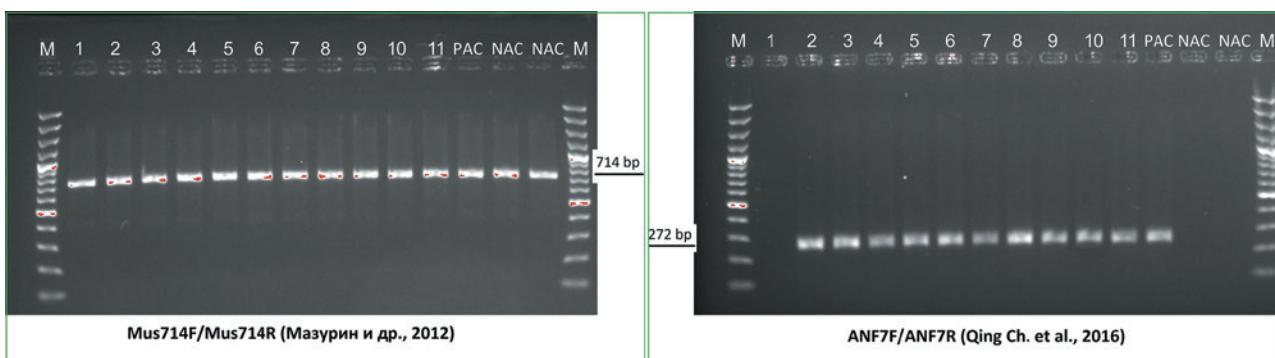


Рис. 4. Электрофореграмма, демонстрирующая результат ПЦР с праймерами AN7F/AN7R (Qing Ch. et al., 2016) для *P. s. pv. pisi* и *Mus714F/Mus714R* (Мазурин и др., 2012) для внутреннего положительного контроля ПЦР. 1 – отрицательный контроль заражения, 2–11 – зараженные растения гороха, PAC – положительный контроль амплификации, NAC – отрицательный контроль амплификации. 1 деление маркера генетического веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ready-to-use (Thermo Fisher Scientific, США) (M) = 100 п. о.

Fig. 4. Electrophoregram showing the result of PCR with primers AN7F/AN7R (Qing Ch. Et al, 2016) for *P. s. pv. pisi* and *Mus714F/Mus714R* (Mazurin et al., 2012) for internal positive PCR control. 1 – negative control of infection, 2–11 – infected pea plants, PAC – positive amplification control, NAC – negative amplification control. 1 division of the genetic weight marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ready-to-use (Thermo Fisher Scientific, USA) (M) = 100 bp.



Рис. 5. Гибель растений гороха спустя 21 сутки с момента заражения *P. s. pv. pisi* (фото О.Ю. Словаревой)

Fig. 5. The death of pea plants 21 days after infection with *P. s. pv. pisi* (photo by O.Yu. Slovareva)



Рис. 6. Симптомы заболевания растений гороха спустя 21 сутки с момента заражения *P. s. pv. pisi* (фото О.Ю. Словаревой)

Fig. 6. Symptoms of the disease of pea plants 21 days after infection with *P. s. pv. pisi* (photo by O.Yu. Slovareva)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования проведена апробация теста на патогенность возбудителя бактериального ожога гороха *P. s. pv. pisi*. В ходе работы установлено, что видимые симптомы заражения растений гороха могут быть получены не ранее чем через 7 суток после инокуляции растений при указанных условиях, таких как концентрация возбудителя в инокулянте, фенологическая фаза растений, условия освещения, температуры и влажности. Через 10 суток после инокуляции возможно подтверждение заражения молекулярными методами при тестировании экстрактов растений. Проведенное исследование показывает, что *P. s. pv. pisi* в условиях искусственного заражения может вызывать видимые симптомы заболевания на растениях гороха посевного, в ряде случаев приводя к их гибели.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Т. 1. «Сорта растений» (официальное издание). – М: ФГБНУ «Росинформагротех», 2019, 516 с.
- Игнатьева И., Словарева О., 2021. Применение метода ПЦР для идентификации возбудителя бактериального ожога гороха *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* в семенном и растительном материале зернобобовых культур. – Сборник материалов 11-й Всероссийской конференции молодых ученых и специалистов «Актуальные вопросы биологии, селекции, технологий возделывания и переработки сельскохозяйственных культур». – Краснодар, 182–186.
- Мазурин Е., Копина М., Шероколова Н., 2012. Контроль достоверности результатов фитосанитарной экспертизы при использовании молекулярных методов диагностики. – Вестник РУДН, № 3: 31–38.
- Akhtar M., Aslam M., 1985. Outbreaks and new records. Pakistan. Bacterial blight of pea caused

During the next 10 days after confirmation of infection by PCR, the development of the disease was noted on pea plants inoculated with a suspension of the pathogen. Twenty-one days after infection, the whole plant withered and 14 out of 40 plants died (Fig. 5). On the other 26 infected plants, symptoms were noted in the form of wilting of the lower leaves, small-scale chlorosis, and white marginal burns (Fig. 6). At the same time, among 9 plants inoculated with sterile distilled water, no symptoms of the disease were noted.

CONCLUSION

As a result of the study, the pathogenicity test of the bacterial pea blight agent, *P. s. pv. pisi*, was approved. During the work, it was found that visible symptoms of infection of pea plants can be obtained no earlier than 7 days after inoculation of plants under specified conditions, such as the concentration of the pathogen in the inoculant, phenological phase of plants, lighting conditions, temperature and humidity. 10 days after inoculation, it is possible to confirm the infection by molecular methods when testing plant extracts. The study shows that *P. s. pv. pisi* under conditions of artificial infection can cause visible symptoms of the disease on pea plants, in some cases leading to their death.

REFERENCES

- State register of breeding achievements approved for use. V. 1. "Plant varieties" (official publication). M. FGBNU «Rosinformagrotehh», 2019; 516 pp. (in Russian).
- Ignatyeva I., Slovareva O. The application of the PCR method for identification of the bacterial pea blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in seed and plant material of leguminous crops [Применение метода ПЦР для идентификации бактериального ожога гороха *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* в семенном и растительном материале зернобобовых культур]. Collection of materials of the 11th All-Russian conference of young scientists and specialists "Topical issues of biology, selection, technology of cultivation and processing of agricultural crops." Krasnodar, 2021; 182–186 (in Russian).
- Mazurin E., Kopina M., Sherokolava N. Controlling the reliability of results received during laboratory testing for phytosanitary purposes when molecular diagnostic methods are used [Контроль достоверности результатов фитосанитарной экспертизы при использовании молекулярных методов диагностики]. *RUDN Bulletin*, 2012; 3: 31–38 (in Russian).
- Akhtar M., Aslam M. Outbreaks and new records. Pakistan. Bacterial blight of pea caused by

- by *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. – FAO Plant Protection Bulletin, 33 (2): 75–76.
5. Ali M., Raja M., Irshad G., Zafar K., Hasan M., Shaheen F., 2015. Isolation and characterization of seedborne *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* from pea (*Pisum sativum* L.). – Asian J Agribiol, 3 (3): 78–83.
 6. Benlioglu K., Ozyilmaz U., Ertan D., 2010. First report of bacterial blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* on pea in Turkey. – Plant Disease, 94 (7): 923.
 7. Martín-Sanz A., Palomo J., Pérez de la Vega M. et al., 2011. Identification of pathovars and races of *Pseudomonas syringae*, the main causal agent of bacterial diseases in pea in North-Central Spain, and the search for resistance. – European Journal of Plant Pathology, 129: 57–69.
 8. Martín-Sanz A., Pérez de la Vega M., Murillo J. et al., 2012. Genetic, biochemical and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* strains. – Plant Pathology, 61: 1063–1072.
 9. Sackett W., 1916. A bacterial stem blight of field garden peas. – Bulletin of the Colorado Agricultural Experimental Station, 217: 3–43.
 10. Qing Ch., Jun-ting Q., Zhen-ji L., Zhi-peng F., Fu-rong L., Hong-yun C., Jian-ping Y., 2016. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* from imported Canadian pea seeds. – Acta Phytopathologica Sinica, 46 (2): 169–175.
 11. АБ Центр, 2019. Экспорт гороха из России в 2001–2019 гг. – URL: <https://ab-centre.ru/news/eksport-goroba-iz-rossii-v-2001-2019-gg> (дата обращения: 19.04.2021).
 12. El Comité de Sanidad Vegetal (COSAVE), 2019. Lista de Plagas Cuarentenarias para la Región del COSAVE. – URL: http://www.cosave.org/sites/default/files/paginas/adjuntos/An.Res_N%C2%B00266_LISTA%20DE%20PLAGAS%20CATEGORIA%20I%20y%20II%20-%20SEPT%202019.pdf (дата обращения: 12.04.2021).
 13. EPPO Global Database. Inter-African Phytosanitary Council (IAPSC). Categorization. – <https://gd.eppo.int/rppo/IAPSC/categorization> (дата обращения: 19.04.2021).
 14. International Seed Federation, 2020. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* on Pea Seed. – URL: https://www.worldseed.org/wp-content/uploads/2021/02/Protocol_Pea_Psp_December-2020.pdf (дата обращения: 01.02.2021).
- Pseudomonas syringae** pv. *pisi*. FAO Plant Protection Bulletin, 1985; 33 (2): 75–76.
5. Ali M., Raja M., Irshad G., Zafar K., Hasan M., Shaheen F. Isolation and characterization of seedborne *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* from pea (*Pisum sativum* L.). Asian J Agribiol, 2015; 3 (3): 78–83.
 6. Benlioglu K., Ozyilmaz U., Ertan D. First report of bacterial blight caused by *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* on pea in Turkey. Plant Disease, 2010; 94 (7): 923.
 7. Martín-Sanz A., Palomo J., Pérez de la Vega M. et al. Identification of pathovars and races of *Pseudomonas syringae*, the main causal agent of bacterial diseases in pea in North-Central Spain, and the search for resistance. European Journal of Plant Pathology, 2011; 129: 57–69.
 8. Martín-Sanz A., Pérez de la Vega M., Murillo J. et al. Genetic, biochemical and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* strains. Plant Pathology, 2012; 61: 1063–1072.
 9. Sackett W. A bacterial stem blight of field garden peas. Bulletin of the Colorado Agricultural Experimental Station, 1916; 217: 3–43.
 10. Qing Ch., Jun-ting Q., Zhen-ji L., Zhi-peng F., Fu-rong L., Hong-yun C., Jian-ping Y. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* from imported Canadian pea seeds. Acta Phytopathologica Sinica, 2016; 46 (2): 169–175.
 11. AB Center. Export of peas from Russia in 2001–2019. 2019. URL: <https://ab-centre.ru/news/eksport-goroba-iz-rossii-v-2001-2019-gg> (last accessed: 19.04.2021).
 12. El Comité de Sanidad Vegetal (COSAVE), 2019. Lista de Plagas Cuarentenarias para la Región del COSAVE. URL: http://www.cosave.org/sites/default/files/paginas/adjuntos/An.Res_N%C2%B00266_LISTA%20DE%20PLAGAS%20CATEGORIA%20I%20y%20II%20-%20SEPT%202019.pdf (last accessed: 12.04.2021).
 13. EPPO Global Database. Inter-African Phytosanitary Council (IAPSC). Categorization. <https://gd.eppo.int/rppo/IAPSC/categorization> (last accessed: 19.04.2021).
 14. International Seed Federation, 2020. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* on Pea Seed. URL: https://www.worldseed.org/wp-content/uploads/2021/02/Protocol_Pea_Psp_December-2020.pdf (last accessed: 01.02.2021).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Игнатьева Ирина Михайловна, научный сотрудник лаборатории бактериологии и анализа ГМО ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0003-1047-0105, e-mail: babiraignirmi@ya.ru.

Словарева Ольга Юрьевна, младший научный сотрудник отдела организации межлабораторных сличительных испытаний ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0001-6022-5955, e-mail: slovareva.olga@gmail.com.

Башкирова Ида Геннадьевна, младший научный сотрудник лаборатории бактериологии и анализа ГМО ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; аспирант ФГАОУ ВО «РУДН», г. Москва, Россия; ORCID 0000-0001-9014-4179, e-mail: bashkirovaид@mail.ru.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Irina Ignatyeva, Researcher, Bacteriology and GMO Analysis Laboratory, Laboratory Testing Center, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0003-1047-0105, e-mail: babiraignirmi@ya.ru.

Olga Slovareva, Junior Researcher, Bacteriology and GMO Analysis Laboratory, Laboratory Testing Center, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0001-6022-5955, e-mail: slovareva.olga@gmail.com.

Ida Bashkirova, Junior Researcher, Bacteriology and GMO Analysis Laboratory, Laboratory Testing Center, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; Post-graduate student of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "RUDN", Moscow, Russia; ORCID 0000-0001-9014-4179, e-mail: bashkirovaид@mail.ru.

Разработка методов диагностики вирида латентной мозаики персика (PLMVd)

Ю.Н. ПРИХОДЬКО¹, Т.С. ЖИВАЕВА²,
Е.Н. ЛОЗОВАЯ³, Ю.А. ШНЕЙДЕР⁴, Е.В. КАРИМОВА⁵
ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»
(ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское,
Московская обл., Россия

¹ e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

² e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

³ e-mail: evgeniyaf@mail.ru

⁴ ORCID 0000-0002-7565-1241,

e-mail: yury.shneyder@mail.ru

⁵ ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Вирид латентной мозаики персика (PLMVd) является карантинным вредным организмом, включенным в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза в список карантинных вредных организмов, отсутствующих на территории Евразийского экономического союза.

Вирид латентной мозаики персика поражает косточковые плодовые культуры, вызывая значительные потери урожая. Методы выявления и идентификации этого патогена в Российской Федерации были разработаны сотрудниками ФГБУ «ВНИИКР» в 2015–2018 гг.

В статье приводятся результаты испытаний и валидации нескольких пар видоспецифичных праймеров, используемых в мировой практике для диагностики PLMVd методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также результаты экспериментов с праймерами, разработанными авторами.

Ключевые слова. Peach latent mosaic viroid, ПЦР, обратная транскрипция, специфичность, чувствительность, воспроизводимость.

Development of diagnostic methods of Peach Latent Mosaic Viroid (PLMVd)

Y.U.N. PRIKHODKO¹, T.S. ZHIVAEVA²,
E.N. LOZOVAYA³, YU.A. SHNEYDER⁴, E.V. KARIMOVA⁵
FGBU “All-Russian Plant Quarantine Center”
(FGBU “VNIIKR”), Bykovo, Ramenskoye,
Moscow Oblast, Russia

¹ e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

² e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

³ e-mail: evgeniyaf@mail.ru

⁴ ORCID 0000-0002-7565-1241,

e-mail: yury.shneyder@mail.ru

⁵ ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru

ABSTRACT

Peach latent mosaic viroid (PLMVd) is a quarantine pest included in the Common List of Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union, the list of quarantine pests absent in the Eurasian Economic Union.

PLMVd affects stone fruit crops, causing significant yield losses. Methods for the detection and identification of this pathogen in the Russian Federation were developed by the specialists of FGBU “VNIIKR” in 2015–2018.

The article presents the results of testing and validation of several pairs of species-specific primers used in world practice for the diagnosis of PLMVd by the polymerase chain reaction (PCR) method, as well as the results of experiments with primers developed by the authors.

Key words. Peach latent mosaic viroid, PCR, reverse transcription, specificity, sensitivity, reproducibility.

ВВЕДЕНИЕ

Bирид латентной мозаики персика (Peach latent mosaic viroid, PLMVd) является типовым представителем рода *Pelamoviroid* семейства Avsunviroidae. Этот патоген отсутствует на территориях стран, входящих в состав ЕАЭС (Россия, Киргизстан, Казахстан, Армения, Беларусь).

PLMVd представляет собой бескапсидную кольцевую одноцепочечную РНК, локализованную в клетках инфицированных растений, которая не выявляется даже при использовании электронного микроскопа. Из-за отсутствия белковой оболочки

INTRODUCTION

Peach latent mosaic viroid, PLMVd, is a typical representative of the genus *Pelamoviroid* of the family Avsunviroidae. This pathogen is absent in the territories of the EAEU countries (Russia, Kyrgyzstan, Kazakhstan, Armenia, Belarus).

PLMVd is a capsid circular single-stranded RNA localized in the cells of infected plants, which is not detected even when using an electron microscope.

применение серологических методов диагностики для выявления вириода латентной мозаики персика невозможно.

Для определения PLMVd используют биотесты на растениях-индикаторах и молекулярные методы диагностики.

Впервые метод ПЦР для выявления PLMVd был апробирован в США с использованием праймеров PLMVd-c/PLMVd-h (Shamloul et al., 1995). В дальнейшем другими авторами были разработаны праймеры для использования в различных модификациях метода ПЦР. Тем не менее международно признанный диагностический протокол выявления и идентификации PLMVd по-прежнему отсутствует. В Российской Федерации до исследований специалистов ФГБУ «ВНИИКР» диагностика PLMVd методом ПЦР не была апробирована.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились со следующими изолятами вириода латентной мозаики персика: PLMVd PC-1134 (DSMZ, Германия), PLMVd-IVIA (IVIA, Испания), Magn-1, Pyt-1, Pyt-2 и Pyt-3 (ФГБУ «ВНИИКР», Россия). Изоляты PLMVd – Magn-1, Pyt-1, Pyt-2 и Pyt-3 – были выявлены и идентифицированы специалистами научного подразделения ФГБУ «ВНИИКР» в плодах персика импортного происхождения. Зараженный материал хранился при температуре -80°C .

Оценку специфичности используемых праймеров проводили с референтными изолятами нецелевых вириодов из коллекции DSMZ: вириода рубцеватости плодов яблони (ASSVd PC-1136), вириода пузырчатого рака коры груши (PBCVd PC-1135), вириода веретеновидности клубней картофеля (PSTVd PV-0860) и вириода карликовости хризантемы (CSVd PV-0735).

Выделение РНК изучаемых изолятов вириода выполняли со следующими комплектами реагентов для выделения нуклеиновых кислот, изготовленными отечественными производителями: «Проба-НК» (ООО «АгроДиагностика», Россия) «НК-М-Сорб» и «ФитоСорб» (оба – ООО «Синтол», Россия).

Для реакции обратной транскрипции использовали следующие наборы и реагенты:

- 1) «Комплект реагентов для обратной транскрипции» (ООО «АгроДиагностика», Россия), в состав которого входит праймер OT-Random;
- 2) «MMLV RT Kit» (ЗАО «Евроген», Россия);
- 3) «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific, США);
- 4) «Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit RT-qPCR» (Thermo Scientific, США).

При постановке реакции обратной транскрипции испытывали следующие праймеры: Oligo dT₁₈, Oligo dT₁₇, Random dN₆ и Random dN₁₀.

Наборы использовали согласно инструкциям фирм-производителей.

Для отработки диагностики PLMVd методом классической ПЦР были испытаны праймеры cPLMVd/hPLMVd (Loret et al., 1999), RF-44 F/RF-43 R (Ambrós et al., 1998), PLMVd-P1F/PLMVd-P1R, PLMVd-P3F/PLMVd-P4R, PLMVd-P9F/PLMVd-P2R (RMDVB FGBU «VNIIKR»*).

* НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР» – научно-методический отдел вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР».

Due to the lack of a protein coat, the use of serological diagnostic methods for detecting the PLMVd is impossible.

To identify PLMVd, bioassays on indicator plants and molecular diagnostic methods are used.

The PCR method for detecting PLMVd was first tested in the USA using the PLMVd-c/PLMVd-h primers (Shamloul et al., 1995). Later, other authors developed primers for use in various modifications of the PCR method. However, an internationally recognized diagnostic protocol for the detection and identification of PLMVd is still lacking. In the Russian Federation, before the research of specialists of the FGBU «VNIIKR», the diagnosis of PLMVd by PCR was not tested.

MATERIALS AND METHODS

Experiments were carried out with the following PLMVd isolates: PLMVd PC-1134 (DSMZ, Germany), PLMVd-IVIA (IVIA, Spain), Magn-1, Pyt-1, Pyt-2, and Pyt-3 (VNIIKR, Russia). PLMVd isolates – Magn-1, Pyt-1, Pyt-2 and Pyt-3 – were detected and identified by specialists of the scientific department of the FGBU «VNIIKR» in peach fruits of imported origin. The infected material was stored at -80°C .

Evaluation of the specificity of the tested primers was carried out with reference isolates of non-target viroids from the DSMZ collection: apple scar skin viroid (ASSVd PC-1136), pear blister canker viroid (PBCVd PC-1135), potato spindle tuber viroid (PSTVd PV-0860) and chrysanthemum stunt viroid (PV-0735).

Isolation of RNA of the studied viroid isolates was performed with the following sets of reagents for the isolation of nucleic acids manufactured by domestic manufacturers: PREP-NA (AgroDiagnostica, Russia) NK-M-Sorb and FitoSorb (both – Syntol, Russia).

The following kits and reagents were used for the reverse transcription reaction:

- 1) «Reagent kit for reverse transcription» (AgroDiagnostica, Russia), which includes the primer OT-Random;
- 2) «MMLV RT Kit» (Evrogen, Russia);
- 3) «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific, USA);
- 4) «Thermo Scientific Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit RT-qPCR» (Thermo Scientific, USA).

When staging the reverse transcription reaction, the following primers were tested: Oligo dT₁₈, Oligo dT₁₇, Random dN₆ and Random dN₁₀.

The kits were used according to the manufacturer's instructions.

For testing PLMVd diagnostics by the method of classical PCR, primers were tested cPLMVd/hPLMVd (Loret et al., 1999), RF-44 F/RF-43 R (Ambrós et al., 1998), PLMVd-P1F/PLMVd-P1R, PLMVd-P3F/PLMVd-P4R, PLMVd-P9F/PLMVd-P2R (RMDVB FGBU «VNIIKR»*).

The primers IB-Fw/IB-Rev (Boubourakas et al., 2011) and PLMVd-P1F/PLMVd-P1R (RMDVB FGBU «VNIIKR») tested by real-time PCR (RT-PCR) with the addition of SYBR Green dye.

* Scientific and Methodological Department of Virology and Bacteriology, FGBU «VNIIKR».

Таблица 1

Характеристика праймеров, использованных в экспериментах для отработки диагностики PLMVd методом ПЦР

Table 1

Characteristics of primers used in experiments for testing PLMVd diagnostics by PCR

Название праймера Primer name	Последовательность 5'→3' Sequence 5'→3'	Длина продукта (п. о.) Product length (bp)	Автор Author
PLMVd RF-43 R	CTGGATCACACCCCCCTCGGAACCAACCGCT	340	Ambrós et al., 1998
PLMVd RF-44 F	TGTGATCCAGGTACCGCCGTAGAACT		
cPLMVd	AACTGCAGTGCTCCGAATAGGGCAC	337	Loreti et al., 1999
hPLMVd	CCCGATAGAAGGCTAACGACCTCG		
PLMVd-H	CTCGCAATGAGGTAAGGTG		
PLMVd-C	ACGTCGTAATCCAGTTCTAC	100	Luigi, Fagioli, 2011
PLMVd-P	CTTCTGGAACCAAGCGG		
PLMVd-P1F	AAGGCTAAGCACCTCGCAAT	98	НМОБ ФГБУ «ВНИИКР» RMDVB FGBU “VNIIKR”
PLMVd-P1R	TTTCTACGGCGGTACCTGGA		
PLMVd-P3F	GCCGTATCTCAACGGCTCAT	252	НМОБ ФГБУ «ВНИИКР» RMDVB FGBU “VNIIKR”
PLMVd-P4R	GAGGGGACCGGGTTGAATC		
PLMVd-P9F	GCATCCCAGCGACTCATCA	248	НМОБ ФГБУ «ВНИИКР» RMDVB FGBU “VNIIKR”
PLMVd-P2R	GAGGGGACCGGGTTGAATC		
IB-Fw	ACC TCG CAA TGA GGT AAG	118–120	Boubourakas et. al., 2011
IB-Rev	GGT TTG AAT CCC GGG TAG A		

Праймеры IB-Fw/IB-Rev (Boubourakas et. al., 2011) и PLMVd-P1F/PLMVd-P1R (НМОБ ФГБУ «ВНИИКР») испытывали методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с добавлением красителя SYBR Green.

«Комплект реагентов для ПЦР-амплификации к-ДНК Peach latent mosaic viroid» (ООО «АгроДиагностика», Россия) и праймеры PLMVd-H/PLMVd-C с зондом PLMVd-P (Luigi, Fagioli, 2011) испытывали методом ПЦР-РВ.

Характеристика испытуемых праймеров приведена в таблице 1.

Для постановки ПЦР в экспериментах с PLMVd были испытаны следующие коммерческие наборы реагентов:

1. «Screen Mix-HS» (ЗАО «Евроген», Россия);
2. «5x Mas^{DD} TaqMIX-2025» с красным красителем (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия);
3. «Thermo Scientific Dream Taq Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific, США);
4. «5x Mag^{DD} TaqMIX-2025» (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия);
5. «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific, США);
6. «One-step RT-PCR kit» (Qiagen, Нидерланды);
7. «SuperScript III Platinum SYBR Green one-step qPCR kit with ROX» (Invitrogen, США);
8. «qPCRmix-HS SYBR» (ЗАО «Евроген», Россия);
9. «qPCRmix-HS SYBR + High ROX» (ЗАО «Евроген», Россия);
10. «2,5x Реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии ROX» (ООО «Синтол», Россия).

Детекцию результатов ПЦР в формате «Форез» осуществляли с помощью электрофореза в 1,5%-м агарозном геле. Величину продуктов амплификации измеряли, используя маркер молекулярного

“Set of reagents for PCR amplification of c-DNA Peach latent mosaic viroid” (AgroDiagnostica, Russia) and PLMVd-H/PLMVd-C primers with a PLMVd-P probe (Luigi, Fagioli, 2011) were tested by RT-PCR.

The characteristics of the tested primers are shown in Table 1.

For PCR in experiments with PLMVd, the following commercial reagent kits were tested:

1. “Screen Mix-HS” (Evrogen, Russia);
2. “5x Mas^{DD} TaqMIX-2025” with red dye (Dialat Ltd., Russia);
3. “Thermo Scientific Dream Taq Green PCR Master Mix (2X)” (Thermo Scientific, USA);
4. “5x Mag^{DD} TaqMIX-2025” (Dialat Ltd., Russia);
5. “Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)” (Thermo Scientific, USA);
6. “One-step RT-PCR kit” (Qiagen, Netherlands);
7. “SuperScript III Platinum SYBR Green one-step qPCR kit with ROX” (Invitrogen, USA);
8. “qPCRmix-HS SYBR” (Evrogen, Russia);
9. “qPCRmix-HS SYBR + High ROX” (Evrogen, Russia);
10. “2.5x Reaction mixture for RT-PCR in the presence of ROX” (Syntol, Russia).

Detection of PCR results was carried out using electrophoresis in 1.5% agarose gel. Amplification products were measured using a GeneRuler 100 bp Plus DNA molecular weight marker from Thermo Scientific, USA.

The validity of the amplification products was determined by their sequencing.

веса ДНК GeneRuler 100 bp Plus фирмы Thermo Scientific, США.

Валидность продуктов амплификации определяли путем их секвенирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

По результатам исследования установлено, что испытуемые праймеры характеризуются высокой специфичностью к PLMVd, не реагировали с изолятами нецелевых виридов ASSVd, PBCVd, PSTVd и CSVd. Эффективность в выявлении изолятов целевого объекта существенно различалась. Так, праймеры PLMVd RF-44 F/PLMVd RF-43 R (Ambrós et al., 1998), PLMVd-P1F/PLMVd-P1R и PLMVd-P9F/PLMVd-P2R (ИМОВБ ФГБУ «ВНИИКР») позволяли диагностировать лишь от двух до четырех изолятов PLMVd из шести испытуемых, в связи с чем их дальнейшее испытание было признано нецелесообразным.

Для диагностики PLMVd с праймерами cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) и PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (ИМОВБ ФГБУ «ВНИИКР») были испытаны 1-этапный и 2-этапный форматы ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) и 4 набора реагентов для ПЦР: «OneStep RT-PCR Kit» (Qiagen), «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific), «Screen Mix-HS» («Евроген»), «5x Mas^{DD} TaqMix-2025» («Диалат»). Для оценки воспроизводимости результатов эксперимента с каждым набором реагентов было проведено исследование в 3-кратной повторности.

При использовании праймеров cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) при проведении в 1-этапном формате ОТ-ПЦР с набором реагентов «OneStep RT-PCR Kit» (Qiagen) специфические продукты планируемой величины были получены для пяти изолятов PLMVd из шести испытуемых. При этом для трех изолятов наблюдалась низкая воспроизводимость результатов выявления. Попытка оптимизировать этот тест путем изменения температуры отжига праймеров не привела к желаемым результатам. Сделан вывод о низкой пригодности данного формата 1-этапной ОТ-ПЦР для выявления PLMVd с использованием праймеров cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) (табл. 2).

При испытании праймеров cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) методом 2-этапной ОТ-ПЦР на результаты тестов заметное влияние оказывал способ проведения обратной транскрипции. Так, ПЦР с набором реагентов «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific) и с кДНК, синтезированной набором «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific) и универсальными праймерами Random dN₆ + Oligo dT₁₈, позволяла диагностировать 5 изолятов PLMVd из шести испытуемых. Положительная реакция не была получена лишь с изолятом PLMVd-IVIA, который представляет собой сок инфицированного растения персика, нанесенный на мембрану для хранения нуклеиновых кислот; этот изолят характеризуется очень низкой концентрацией. В то же время 2-этапная ОТ-ПЦР с набором реагентов «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific) и с кДНК, синтезированной с набором «MMLV RT Kit» («Евроген») и обратным специфическим праймером cPLMVd, позволила диагностировать все 6 испытуемых изолятов PLMVd.

RESULTS OF STUDIES

According to the results of the study, it was found that the tested primers are characterized by high specificity for PLMVd, did not react with the isolates of the non-target viroids ASSVd, PBCVd, PSTVd, and CSVd. Efficiency in identifying target isolates varied significantly. Thus, the primers PLMVd RF-44 F/PLMVd RF-43 R (Ambrós et al., 1998), PLMVd-P1F/PLMVd-P1R, and PLMVd-P9F/PLMVd-P2R (RMDVB FGBU "VNIIKR") made it possible to diagnose only two up to four PLMVd isolates out of six subjects, in connection with which further testing was considered inappropriate.

For the diagnosis of PLMVd with primers cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) and PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology of (RMDVB) FGBU "VNIIKR"), 1-step and 2-step PCR formats with reverse transcription (RT-PCR) were tested and 4 PCR reagent kits: OneStep RT-PCR Kit (Qiagen), Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), Screen Mix-HS (Evrogen), 5x MasDD TaqMix-2025 (Dialat). To assess the reproducibility of the results of the experiment with each set of reagents, a study was carried out in 3 replicates.

When using the cPLMVd/hPLMVd primers (Loreti et al., 1999) in 1-step RT-PCR format with the One-Step RT-PCR Kit (Qiagen), specific target-size products were obtained for five PLMVd isolates out of six tested ones. At the same time, low reproducibility of detection results was observed for three isolates. An attempt

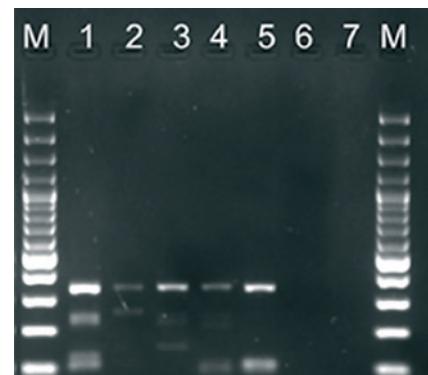


Рис. 1. Результаты экспериментов с праймерами cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999).

2-этапная ОТ-ПЦР; OT – набором «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific) и праймерами Random dN₆ + Oligo dT₁₈; ПЦР – набором «5x Mas^{DD} Mix-2025» («Диалат»).

Образцы: 1 – PLMVd PC-1134; 2 – Magn-1; 3 – Pyt-1; 4 – Pyt-2; 5 – Pyt-3; 6 – PLMVd-IVIA; 7 – отрицательный контроль (вода).

Fig. 1. Results of experiments with primers cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999).

2-step RT-PCR; OT – with First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) and Random dN₆ + Oligo dT₁₈ primers; PCR – with the kit “5x MasDD Mix-2025” (Dialat).

Samples: 1 – PLMVd PC-1134; 2 – Magn-1; 3 – Pyt-1; 4 – Pyt-2; 5 – Pyt-3; 6 – PLMVd-IVIA; 7 – negative control (water).

Таблица 2
Итоговая таблица ОТ-ПЦР для праймеров cPLMVd/hPLMVd

Table 2
Summary table of RT-PCR for primers cPLMVd/hPLMVd

Изоляты Isolates	«One step RT PCR» (Qiagen)	1-этапная ОТ-ПЦР 2-step RT-PCR											
		1-step RT-PCR		«Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific)		«Mas ^{DD} Mix-2025» «Диалат» (Dialat)		«Screen Mix-HS» «Евроген» (Evrogen)					
		Обратная транскрипция Reverse transcription											
		Праймеры для ОТ RT primers			Праймеры для ОТ RT primers			Праймеры для ОТ RT primers					
		Random dN ₆ , Oligo dT ₁₈	Random dN ₁₀ , Oligo dT ₁₇	cPLMVd	Random dN ₆ , Oligo dT ₁₈	Random dN ₁₀ , Oligo dT ₁₇	cPLMVd	Random dN ₆ , Oligo dT ₁₈	Random dN ₁₀ , Oligo dT ₁₇	cPLMVd			
PLMVd PC-1134	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Magn-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Pyt-1	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Pyt-2	±	+	+	+	+	±	+	+	+	+			
Pyt-3	±	+	±	+	+	±	+	±	+	+			
PLMVd-IVIA	-	-	±	+	-	±	+	-	±	+			
ASSVd PC-1136	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
PBCVd PC-1135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
PSTVd PV-0860	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
CSVd PV-0735	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

Аналогичные результаты были получены для праймеров cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) при постановке реакции с набором для обратной транскрипции «MMLV RT Kit» («Евроген») совместно с реагентной смесью для ПЦР «5x Mas^{DD} TaqMix-2025» («Диалат»).

В экспериментах с праймерами cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) и набором реагентов «Screen Mix-HS» («Евроген») стабильная амплификация специфических продуктов наблюдалась для пяти изолятов PLMVd из шести испытуемых. В опыте с кДНК, синтезированной набором «MMLV RT Kit» («Евроген») и обратным праймером cPLMVd, наблюдались также и следы специфического продукта для шестого испытуемого изолята PLMVd-IVIA (табл. 2).

В экспериментах с наборами реагентов для амплификации «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific) и «5x Mas^{DD} TaqMix-2025» («Диалат») и набором для обратной транскрипции «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific), наряду со специфическими, наблюдалось также образование и неспецифических продуктов амплификации (рис. 1).

Таким образом, проведенные исследования показали возможность диагностики PLMVd с использованием праймеров cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999).

to optimize this test by changing the primer annealing temperature did not lead to the desired results. It was concluded that this format is not suitable for 1-step RT-PCR for detecting PLMVd using primers cPLMVd/hPLMVd (Loreti et al., 1999) (Table 2).

When testing the cPLMVd/hPLMVd primers (Loreti et al., 1999) by 2-step RT-PCR, the test results were significantly influenced by the method of reverse transcription. Thus, PCR with a set of reagents “Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)” (Thermo Scientific) and with cDNA synthesized by the “First Strand cDNA Synthesis Kit” (Thermo Scientific) and universal primers Random dN₆ + Oligo dT₁₈, allowed diagnosing 5 PLMVd isolates out of six subjects. A positive reaction was not obtained only with the isolate PLMVd-IVIA, which is the juice of an infected peach plant coated on a membrane for storing nucleic acids; this isolate has a very low concentration. At the same time, 2-step RT-PCR with the Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) reagent kit (Thermo Scientific) and with cDNA synthesized

Из двух испытанных форматов классической ПЦР преимущество имел 2-этапный формат. Установлено, что при проведении ПЦР в 2-этапном формате необходимо использовать кдНК, синтезированную с использованием обратного праймера cPLMVd. Для проведения ПЦР с этими праймерами наиболее целесообразно использовать наборы реагентов «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific) и «Screen Mix-HS» («Евроген») (табл. 2).

Наиболее оптимальные результаты в выявлении PLMVd методом классической ПЦР наблюдались в экспериментах с разработанными специалистами ФГБУ «ВНИИКР» праймерами PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР»). Эти праймеры были разработаны с использованием программы Primer-BLAST к геному изолята PLMVd PL133A, выявленного на персике в Сербии и депонированного под номером EF151298 в GenBank NCBI. Анализ *in silico* показал комплементарность этих праймеров с геномом 360 изолятов PLMVd, депонированных в GenBank NCBI, и отсутствие комплементарности с геномом каких-либо нецелевых вироидов. При реакции этих праймеров с геномом изолятов PLMVd амплифицируется продукт величиной 250–254 п. н.

Праймеры PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР») были испытаны с шестью изолятами PLMVd в 1-этапном и 2-этапном форматах ОТ-ПЦР с наборами реагентов «OneStep RT-PCR Kit» (Qiagen) (для 1-этапного формата), «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific), «Screen Mix-HS» («Евроген») и «5x Mas^{DD} TaqMix-2025» («Диалат») (для 2-этапного формата). При этом 2 последних набора реагентов испытывали с кдНК, синтезированной двумя способами: набором «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific) с праймерами Random dN₆ + Oligo dT₁₈ и набором «MMLV RT Kit» («Евроген») с обратным праймером PLMVd-P4R.

По результатам исследования установлена возможность эффективного использования праймеров PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР») при проведении ОТ-ПЦР как в 1-этапном, так и в 2-этапном форматах.

Режимы ОТ-ПЦР для использования праймеров PLMVd-P3F/PLMVd-P4R: обратная транскрипция – по методике производителя; амплификация: предварительная денатурация – 5 мин. при 95 °C, затем 40 циклов (95 °C – 30 сек., 60 °C – 45 сек., 72 °C – 60 сек.), финальная элонгация – 5 мин.

При проведении 2-этапной ОТ-ПЦР с наборами реагентов «Screen Mix-HS» («Евроген») и «5x Mas^{DD} TaqMix-2025» («Диалат») преимущество имело использование кдНК, синтезированной набором «MMLV RT Kit» («Евроген») с праймером PLMVd-P4R, по сравнению с использованием кдНК, синтезированной набором «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific) и праймерами Random dN₆ + Oligo dT₁₈. При использовании набора реагентов «Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)» (Thermo Scientific) наблюдалась низкая воспроизводимость результатов (табл. 3).

Таким образом, проведенные эксперименты показали высокую эффективность праймеров PLMVd-P3F/PLMVd-P4R, которые разработаны специалистами ФГБУ «ВНИИКР» и могут быть рекомендованы для тестирования подкарантинной

with the MMLV RT Kit (Evrogen) and reverse specific primer cPLMVd, made it possible to diagnose all 6 tested PLMVd isolates.

Similar results were obtained for the cPLMVd/hPLMVd primers (Loreti et al., 1999) when the reaction was set up with the MMLV RT Kit (Evrogen) together with the 5x MasDD TaqMix-2025 PCR reaction mixture (Dialat).

In experiments with the cPLMVd/hPLMVd primers (Loreti et al., 1999) and the Screen Mix-HS reagent kit (Evrogen/Evrogen), stable amplification of specific products was observed for five PLMVd isolates out of six subjects. In the experiment with cDNA synthesized by the MMLV RT Kit (Evrogen) and the reverse primer cPLMVd, traces of the specific product were also observed for the sixth test isolate PLMVd – IVIA (Table 2).

In experiments with amplification reagent kits “Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)” (Thermo Scientific) and “5x MasDD TaqMix-2025” (Dialat) and a set for reverse transcription “First Strand cDNA Synthesis Kit” (Thermo Scientific), along with specific ones, the formation of nonspecific amplification products was also observed (Fig. 1).

Thus, our studies have shown the possibility of diagnosing PLMVd using the cPLMVd/hPLMVd primers (Loreti et al., 1999). Of the two formats tested, classical PCR had the advantage of the 2-step format. It was found that when carrying out PCR in a 2-step format, it is necessary to use cDNA synthesized using the reverse primer cPLMVd. To carry out PCR with these primers, it is most advisable to use the Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) and Screen Mix-HS (Evrogen) reagent kits (Table 2).

The most optimal results in the detection of PLMVd by the classical PCR method were observed in experiments with the primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (NMOVB FGBU VNIIKR) developed by specialists from the VNIIKR. These primers were designed using the Primer-BLAST program against the genome of the PLMVd PL133A isolate found in peach in Serbia and deposited under the number EF151298 at GenBank NCBI. *In silico* analysis showed the complementarity of these primers with the genome of 360 PLMVd isolates deposited in GenBank NCBI, and the absence of complementarity with the genome of any non-target viroids. When these primers react with the genome of PLMVd isolates, a product of 250–254 bp is amplified.

Primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (RMDVB FGBU “VNIIKR”) were tested with six PLMVd isolates in 1-step and 2-step RT-PCR formats with OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) (for 1-stage format), Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific), Screen Mix-HS (Evrogen) and 5x MasDD TaqMix-2025 (Dialat) (for 2-stage format). At the same time, the last 2 reagent kits were tested with cDNA synthesized by two methods: the First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) with the Random dN₆ + Oligo dT₁₈ primers and the MMLV RT Kit (Evrogen) with the reverse primer PLMVd-P4R.

Таблица 3 **Итоговая таблица ОТ-ПЦР для праймеров PLMVd-P3F/PLMVd-P4R**

Table 3
Summary table of RT-PCR for primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R

Изоляты Isolates	«One step RT PCR» (Qiagen)	1-этапная ОТ-ПЦР		2-этапная ОТ-ПЦР 2-step RT-PCR							
		1-step RT-PCR	«Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix» (2X) (Thermo Scientific)	«Mas ^{DD} Mix-2025» «Диалат» (Dialat)	«Screen Mix-HS» «Евроген» (Evrogen)						
PLMVd PC-1134	+	+	+	+	+	Обратная транскрипция Reverse transcription					
Magn-1	+	+	+	+	+	Праймеры для ОТ RT primers		Праймеры для ОТ RT primers		Праймеры для ОТ RT primers	
Pyt-1	+	+	+	+	+	Random dN ₆ , Oligo dT ₁₈	Random dN ₁₀ , Oligo dT ₁₇	Random dN ₆ , Oligo dT ₁₈	Random dN ₁₀ , Oligo dT ₁₇	Random dN ₆ , Oligo dT ₁₈	Random dN ₁₀ , Oligo dT ₁₇
Pyt-2	+	+	+	+	+	PLMvd-P4R	PLMvd-P4R	PLMvd-P4R	PLMvd-P4R	PLMvd-P4R	PLMvd-P4R
Pyt-3	+	+	+	+	+						
PLMVd-IVIA	+	+	+	+	+				-	+	+
ASSVd PC-1136	-	-	-	-	-			-	-	-	-
PBCVd PC-1135	-	-	-	-	-			-	-	-	-
PSTVd PV-0860	-	-	-	-	-			-	-	-	-
CSVd PV-0735	-	-	-	-	-			-	-	-	-

продукции на наличие PLMVd. Данные праймеры возможно использовать как в 1-этапном формате ОТ-ПЦР набором реагентов «OneStep RT-PCR Kit» (Qiagen), так и в 2-этапном формате с различными наборами реагентов, из которых преимущество имеют наборы «5x Mas^{DD} TaqMix-2025» («Диалат»), «Screen Mix-HS» («Евроген»). При проведении ОТ-ПЦР в 2-этапном формате необходимо использовать кдНК, синтезированную наборами «MMLV RT Kit» («Евроген») с обратным праймером PLMVd-P4R. Результаты некоторых экспериментов с праймерами PLMVd-P3F/PLMVd-P4R представлены на рис. 2.

Чувствительность тестов с праймерами PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР») оценивали на примере двух изолятов вириода – PLMVd PC-1134 и Magn-1. Выделение РНК проводили наборами «Проба-НК» («АгроДиагностика») и «Фито-Сорб-М» («Синтол»). Для постановки ПЦР в 1-этапном формате использовали набор реагентов «OneStep RT-PCR Kit» (Qiagen). Для ПЦР в 2-этапном формате для обратной транскрипции применяли «MMLV RT Kit» («Евроген») с обратным праймером PLMVd-P4R, для амплификации – «Screen Mix-HS» («Евроген»).

При проведении ОТ-ПЦР в 1-этапном формате с набором реагентов «OneStep RT-PCR Kit» четкий положительный сигнал для изолята PLMVd PC-1134

According to the results of the study, the possibility of effective use of primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (RMDVB FGBU "VNIIKR") was established when carrying out RT-PCR in both 1-step and 2-step formats.

RT-PCR modes for using primers PLMVD-P3F/PLMVD-P4R: reverse transcription – according to the manufacturer's method; amplification: preliminary denaturation – 5 min. at 95 °C, then 40 cycles (95 °C – 30 sec., 60 °C – 45 sec., 72 °C – 60 sec.), final elongation – 5 min.

When carrying out a 2-step RT-PCR with the Screen Mix-HS (Evrogen) and 5x MasDD TaqMix-2025 (Dialat) reagent kits, the advantage was given to the user of cDNA synthesized by the MMLV RT Kit (Evrogen) with the PLMvD-P4R primer, compared to using the cDNA synthesized by the First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) and the Random dN₆ + Oligo dT₁₈ primers. When using a set of reagents "Thermo Scientific Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (2X)" (Thermo Scientific), low reproducibility of results was observed (Table 3).

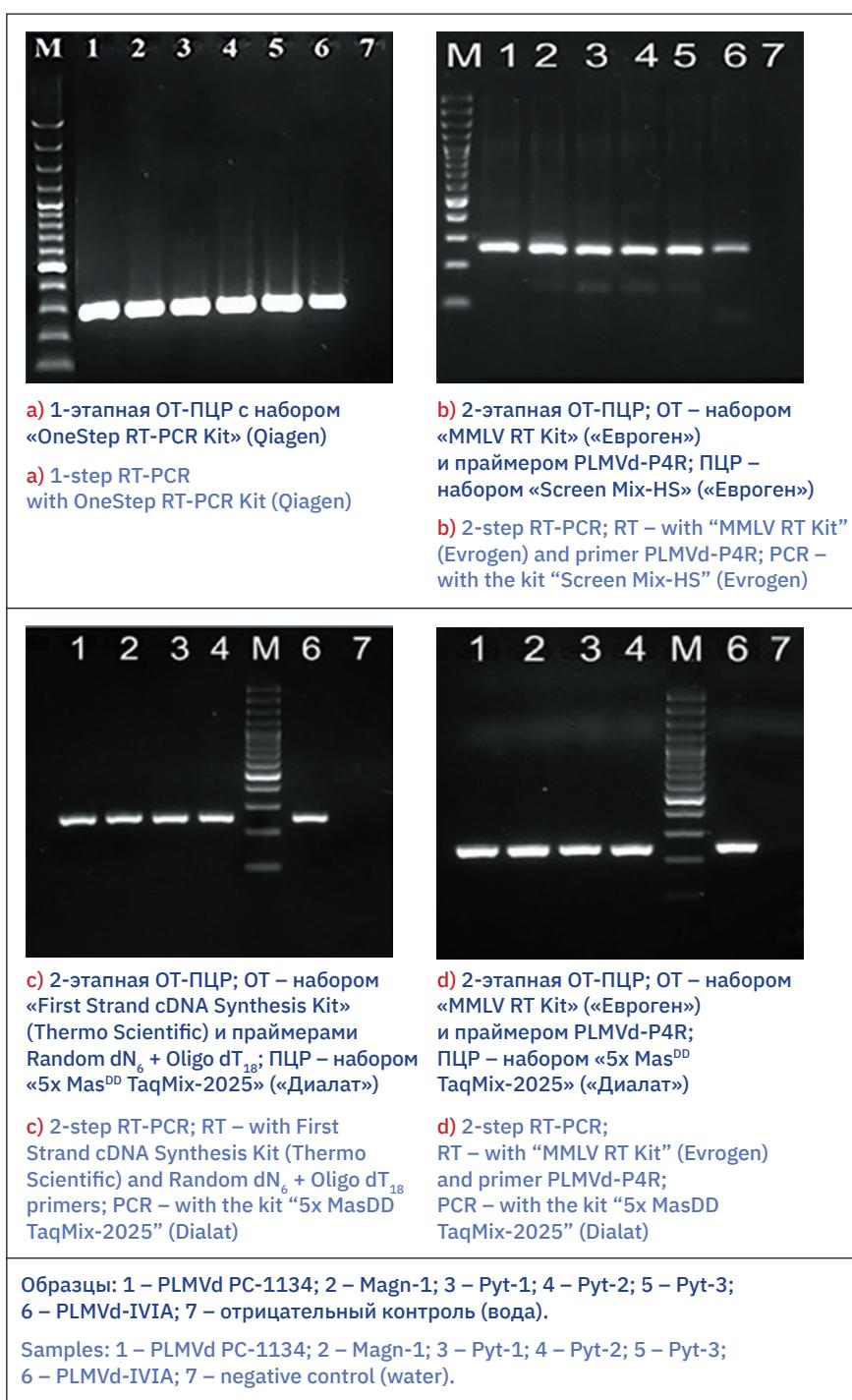


Рис. 2. Результаты некоторых экспериментов с праймерами PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (НМОБ ФГБУ «ВНИИКР»)

Fig. 2. Results of some experiments with primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (RMDVB FGBU “VNIIKR”)

вне зависимости от используемых наборов для выделения РНК наблюдался при разведении экстрактов сока в 10⁻³ включительно (рис. 3), а для изолята PLMVd Magn-1 – при разведении в 10⁻² включительно.

При проведении ПЦР в 2-этапном формате с набором реагентов «Screen Mix-HS» («ЕвроГен») для обоих изолятов вириода положительный сигнал наблюдался при разведении в 10⁻³ после использования для выделения РНК набора «Фитосорб-М» («Синтол») и в 10⁻² – после использования набора «Проба-НК» («АгроДиагностика»).

Для выявления PLMVd методом ПЦР в реальном времени в присутствии интеркалирующего

Thus, the experiments carried out showed the high efficiency of the PLMVd-P3F/PLMVd-P4R primers, which were developed by the specialists of VNIIKR and can be recommended for testing regulated products for the presence of PLMVd. These primers can be used both in a 1-step RT-PCR format with the OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) and in a 2-step format with various reagent kits, of which the 5x MasDD TaqMix-2025 (Dialat) and “Screen Mix-HS” (Evrogen) have an advantage. When carrying out RT-PCR in a 2-step format, it is necessary to use the cDNA synthesized by the MMLV RT Kit (Evrogen) with the reverse primer PLMVd-P4R. The results of some experiments with the PLMVd-P3F/PLMVd-P4R primers are shown in Fig. 2.

The sensitivity of tests with primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (RMDVB FGBU “VNIIKR”) was assessed using the example of two viroid isolates – PLMVd PC-1134 and Magn-1. Isolation of RNA was carried out with the sets “PREP-NA” (AgroDiagnostica) and “Fitosorb-M” (Synthol). To set up PCR in a 1-step format, a OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) was used. For PCR in a 2-step format, the MMLV RT Kit (Evrogen) with the reverse primer PLMVd-P4R was used for reverse transcription, and Screen Mix-HS (Evrogen) was used for amplification.

When carrying out RT-PCR in a 1-step format with the OneStep RT-PCR Kit, a clear positive signal for the PLMVd PC-1134 isolate, regardless of the kits used for RNA isolation, was observed at a dilution of juice extracts of 10⁻³ inclusive (Fig. 3), and for isolate PLMVd Magn-1 – at a dilution of 10⁻² inclusive.

When PCR was carried out in a 2-step format with a set of reagents “Screen Mix-HS” (Evrogen) for both

viroid isolates, a positive signal was observed at a dilution of 10⁻³ after using the kit “Fitosorb-M” (Synthol) and at 10⁻² – after using the set “PREP-NA” (AgroDiagnostica).

To detect PLMVd by real-time PCR in the presence of the SYBR Green intercalating dye, the IB-Fw/IB-Rev primers were tested (Boubourakas et al., 2011). It was found that these primers are most expedient to use with the SuperScript III Platinum SYBR Green one-step

красителя SYBR Green проведено испытание праймеров IB-Fw/IB-Rev (I. Boubourakas et al., 2011). Установлено, что эти праймеры наиболее целесообразно использовать с наборами реагентов «SuperScript III Platinum SYBR Green one-step qPCR kit with ROX» (Invitrogen) в 1-этапном формате ОТ-ПЦР-РВ или «qPCRmix-HS SYBR + High ROX» («Евроген») в 2-этапном формате. Для 2-этапного формата необходим предварительный синтез кДНК с набором для обратной транскрипции «MMLV RT Kit» («Евроген») и обратным специфическим праймером IB-Rev.

Проведена оптимизация тестов «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК Peach latent mosaic virus» («АгроДиагностика»).

При оценке специфичности данного набора не было отмечено неспецифической реакции с референтными изолятами нецелевых вироидов: ASSVd, CSVd, PBCVd и PSTVd.

Установлено, что для постановки ПЦР набором «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК Peach latent mosaic virus» («АгроДиагностика») в равной степени эффективно использование кДНК, синтезированной набором для обратной транскрипции «MMLV RT Kit» («Евроген») с праймерами Random dN₁₀ + Oligo dT₁₇ или набором для обратной транскрипции «Комплект реагентов для обратной транскрипции» («АгроДиагностика») с праймером OT-Random. Несколько худшие результаты были получены для кДНК, синтезированной набором для обратной транскрипции «First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Scientific) с праймерами Random dN₆ + Oligo dT₁₈ (рис. 4).

Положительные сигналы для изолята PLMVd-IVIA наблюдались на очень высоком пороговом цикле – 40,0–40,3. Выявление пяти остальных изолятов достигалось на пороговых циклах от 26,6 до 37,5. Для выявления изолятов PC-1134, Pyt-1 и Pyt-2 преимущество имела кДНК, синтезированная набором «MMLV RT Kit», а для изолятов Magn-1 и Pyt-3 – кДНК, синтезированная набором «Комплект реагентов для обратной транскрипции» («АгроДиагностика»).

Установлено, что чувствительность выявления изолятов целевого объекта набора для ПЦР-РВ к PLMVd «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК Peach latent mosaic virus» («АгроДиагностика») варьирует от 10⁰ до 10⁻² в зависимости от способов выделения РНК и вариантов проведения обратной транскрипции. В образцах с кДНК, синтезированной набором «Комплект реагентов для обратной транскрипции» («АгроДиагностика») и праймером OT-Random, чувствительность составила 10⁻² для РНК обоих испытуемых изолятов вироида, PLMVd PC-1134 и Magn-1, выделенной набором «Проба-НК» («АгроДиагностика»). При использовании для выделения РНК набора «ФитоСорб-М» («Синтол») чувствительность выявления изолята PLMVd PC-1134 составила 10⁻¹, а изолята Magn-1 – 10⁰. В тестах с кДНК, синтезированной набором «MMLV RT Kit» («Евроген») и праймерами Random dN₁₀ + Oligo dT₁₇, чувствительность выявления изолята PLMVd PC-1134 составила 10⁻² и 10⁻¹ для РНК, выделенной наборами «Проба-НК» («АгроДиагностика») и «ФитоСорб-М» («Синтол») соответственно. На чувствительность выявления изолята Magn-1, которая составила 10⁻¹, вариант выделения РНК не оказывал существенного влияния.

qPCR kit with ROX (Invitrogen) in 1-step RT-PCR-RT format or qPCRmix-HS SYBR + High ROX (Evrogen) in a 2-stage format. For the 2-step format, preliminary cDNA synthesis is required with a reverse transcription kit "MMLV RT Kit" (Evrogen) and a reverse specific primer IB-Rev.

Optimization of the tests "Set of reagents for PCR amplification of cDNA Peach latent mosaic virus" (AgroDiagnostica) was carried out.

When assessing the specificity of this kit, no nonspecific reaction with reference isolates of non-target viroids was noted: ASSVd, CSVd, PBCVd and PSTVd.

It has been established that for PCR with the kit "Kit of reagents for PCR amplification of cDNA Peach latent mosaic virus" (AgroDiagnostica), it is equally effective to use cDNA synthesized by the kit for reverse transcription "MMLV RT Kit" (Evrogen) with primers Random dN₁₀ + Oligo dT₁₇ or reverse transcription kit "Reagent kit for reverse transcription" (AgroDiagnostica) with primer OT-Random. Somewhat worse results were obtained for cDNA synthesized by the First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) with the Random dN₆ + Oligo dT₁₈ primers (Fig. 4).

Positive signals for isolate PLMVd-IVIA were observed at a very high threshold cycle of 40.0–40.3.

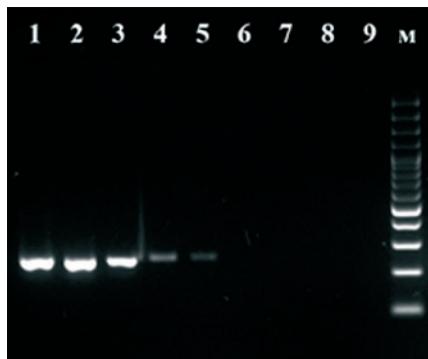


Рис. 3. Определение чувствительности выявления PLMVd методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров PLMVd-P3F/PLMVd-P4R.

Выделение РНК – набором «ФитоСорб-М» («Синтол»), ОТ-ПЦР – набором «OneStep RT-PCR» (Qiagen) и праймерами PLMVd-P3F PLMVd-P4R.

Образцы: 1 – PLMVd PC-1134 (концентрация – 32,7 нг/мкл);
2 – PLMVd PC-1134/1:10; 3 – PLMVd PC-1134/1:100;
4 – PLMVd PC-1134/1:1000; 5 – PLMVd PC-1134/1:10000;
6 – PLMVd PC-1134/1:100000; 7 – PLMVd PC-1134/1:1000000;
8 – PLMVd PC-1134/1:10000000; 9 – отрицательный контроль.

Fig. 3. Determination of the sensitivity of detection of PLMVd by RT-PCR using primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R.

Isolation of RNA – with the kit "PhytoSorb-M" (Synthol), RT-PCR – with the kit "OneStep RT-PCR" (Qiagen) and primers PLMVd-P3F PLMVd-P4R.

Samples: 1 – PLMVd PC-1134 (concentration – 32.7 ng/μl);
2 – PLMVd PC-1134/1:10; 3 – PLMVd PC-1134/1:100;
4 – PLMVd PC-1134/1:1000; 5 – PLMVd PC-1134/1:10000;
6 – PLMVd PC-1134/1:100000; 7 – PLMVd PC-1134/1:1000000;
8 – PLMVd PC-1134/1:10000000; 9 – negative control.

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Cp, Fam	Cp, Hex	Результат
A1	PLMVd-PC1134_OT – («АгроДиагностика»)	34,4	30,2	+
A2	Magn-1_OT – («АгроДиагностика»)	31,0	29,8	+
A3	Pyt-1_OT – («АгроДиагностика»)	31,6	33,7	+
A4	Pyt-2_OT – («АгроДиагностика»)	33,5	31,8	+
A5	Pyt-3__OT – («АгроДиагностика»)	33,3	31,5	+
A6	PLMVd-IVIA_OT – («АгроДиагностика»)	40,3	31,2	+
A7	PLMVd- PC1134_OT – MMLV RT Kit	29,4	29,7	+
A8	Magn-1_OT – MMLV RT Kit	32,5	30,3	+
B1	Pyt-1__OT – MMLV RT Kit	26,6	30,6	+
B2	Pyt-2__OT – MMLV RT Kit	33,2	31,0	+
B3	Pyt-3__OT – MMLV RT Kit	35,5	30,6	+
B4	PLMVd IVIA_OT – MMLV RT Kit	40,0	30,9	+
B5	PLMVd- PC1134_OT – First Strand cDNA Synthesis	32,0	30,2	+
B6	Magn-1_OT – First Strand cDNA Synthesis	35,6	30,8	+
B7	Pyt-1_OT – First Strand cDNA Synthesis	28,3	31,0	+
B8	Pyt-2__OT – First Strand cDNA Synthesis	34,8	31,3	+
C1	Pyt-3__OT – First Strand cDNA Synthesis	37,5	31,2	+
C2	PLMVd-IVIA_OT – First Strand cDNA Synthesis		30,9	-
C3	K-		31,1	-
C4	K+	28,4	31,0	+

Рис. 4. Влияние трех вариантов проведения обратной транскрипции на эффективность выявления изолятов PLMVd набором «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации кДНК Peach latent mosaic virus» для ПЦР-РВ к PLMVd («АгроДиагностика»)

Hole number	Tube ID	Cp, Fam	Cp, Hex	Result
A1	PLMVd-PC1134_OT – (AgroDiagnostica)	34.4	30.2	+
A2	Magn-1_OT – (AgroDiagnostica)	31.0	29.8	+
A3	Pyt-1_OT – (AgroDiagnostica)	31.6	33.7	+
A4	Pyt-2_OT – (AgroDiagnostica)	33.5	31.8	+
A5	Pyt-3__OT – (AgroDiagnostica)	33.3	31.5	+
A6	PLMVd-IVIA_OT – (AgroDiagnostica)	40.3	31.2	+
A7	PLMVd- PC1134_OT – MMLV RT Kit	29.4	29.7	+
A8	Magn-1_OT – MMLV RT Kit	32.5	30.3	+
B1	Pyt-1__OT – MMLV RT Kit	26.6	30.6	+
B2	Pyt-2__OT – MMLV RT Kit	33.2	31.0	+
B3	Pyt-3__OT – MMLV RT Kit	35.5	30.6	+
B4	PLMVd IVIA_OT – MMLV RT Kit	40.0	30.9	+
B5	PLMVd- PC1134_OT – First Strand cDNA Synthesis	32.0	30.2	+
B6	Magn-1_OT – First Strand cDNA Synthesis	35.6	30.8	+
B7	Pyt-1_OT – First Strand cDNA Synthesis	28.3	31.0	+
B8	Pyt-2__OT – First Strand cDNA Synthesis	34.8	31.3	+
C1	Pyt-3__OT – First Strand cDNA Synthesis	37.5	31.2	+
C2	PLMVd-IVIA_OT – First Strand cDNA Synthesis		30.9	-
C3	K-		31.1	-
C4	K+	28.4	31.0	+

Fig. 4. Influence of three variants of reverse transcription on the efficiency of detecting PLMVd isolates using the kit “Kit of reagents for PCR amplification of cDNA Peach latent mosaic virus” for PCR-RT to PLMVd (AgroDiagnostica)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные эксперименты позволяют рекомендовать «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации к-ДНК Peach latent mosaic virus» («АгроДиагностика») для проведения скрининговых тестов на наличие PLMVd.

С использованием скринингового теста с «Комплектом реагентов для ПЦР-амплификации к-ДНК Peach latent mosaic virus» («АгроДиагностика») и подтверждающего теста методом классической ПЦР с праймерами PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (НМОБФ ГБУ «ВНИИКР»), 2 изолята PLMVd выявлены в образцах подкарантинной продукции, отобранных в ходе предотгрузочных обследований в питомниках Италии.

The detection of the remaining five isolates was achieved at threshold cycles from 26.6 to 37.5. To identify isolates PC-1134, Pyt-1, and Pyt-2, the cDNA synthesized with the MMLV RT Kit had an advantage, and for isolates Magn-1 and Pyt-3, the cDNA synthesized with the Reverse Transcription Reagent Kit (AgroDiagnostica).

It has been established that the sensitivity of detecting isolates of the target object of the RT-PCR kit to PLMVd “Kit of reagents for PCR amplification of cDNA Peach latent mosaic virus” (AgroDiagnostica) varies from 10^0 to 10^{-2} depending on the methods of RNA isolation and options for performing reverse transcriptions. In samples with cDNA synthesized by the kit “Reagent kit for reverse transcription” (AgroDiagnostica) and the primer OT-Random, the sensitivity was 10^{-2} for the RNA of both tested viroid isolates, PLMVd PC-1134 and Magn-1, isolated by the kit “Sample-NK” (Agro-Diagnostica). When using the kit “FitoSorb-M” (Synthol) for RNA isolation, the detection sensitivity of the PLMVd PC-1134 isolate was 10^{-1} , and the Magn-1 isolate – 10^0 . In tests with cDNA synthesized by the MMLV RT Kit (Evrogen) and primers Random dN₁₀ + Oligo dT₁₇, the detection sensitivity of the PLMVd isolate PC-1134 was 10^{-2} and 10^{-1} for RNA isolated with the PREP-NA (AgroDiagnostica) and Fito-Sorb-M (Synthol) respectively. The detection sensitivity of the Magn-1 isolate, which was 10^{-1} , was not significantly affected by the RNA isolation option.

CONCLUSION

The experiments carried out make it possible to recommend the “Set of reagents for PCR amplification of c-DNA Peach latent mosaic virus” (AgroDiagnostica) for screening tests for the presence of PLMVd.

Using a screening test with the “Kit of reagents for PCR amplification of c-DNA Peach latent mosaic virus” (AgroDiagnostica) and a confirmation test by the method of classical PCR with primers PLMVd-P3F/PLMVd-P4R (RMDVB FGBU “VNIIKR”), 2 isolates PLMVd detected in samples of regulated products taken during pre-shipment surveys in nurseries in Italy.

В процессе проведенных исследований отработана диагностика вириода латентной мозаики персика, основанная на использовании различных модификаций полимеразной цепной реакции. Таким образом, описанные в статье исследования легли в основу разработанных впервые в Российской Федерации методических рекомендаций по выявлению и идентификации этого патогена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ambrós S., Hernández C., Desvignes J.C., Flores R., 1998. Genomic structure of three phenotypically different isolates of Latent mosaic viroid: Implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasi species. – *Journal of Virology*, 72: 7397–7406.
2. Boubourakas I.N., Voloudakis A.E., Fasseas K., Resnick N., Kolta H., Kyriakopoulou P.E., 2011. Cellular localization of Peach latent mosaic viroid in peach sections by liquid phase *in situ* RT-PCR. – *Plant Pathology*, 60: 468–473.
3. Loret S., Faggioli F., Cardoni M., Mordenti G., Babini A.R., Poggi Pollini C., Barba M., 1999. Comparison of different diagnostic methods for detection of Peach latent mosaic viroid. – *Bulletin OEPP/EPPO*, 29: 433–438.
4. Luigi M., Faggioli F., 2011. Development of quantitative real-time PCR for the detection and quantification of Peach latent mosaic viroid. – *Eur. J. Plant Pathol.*, 130: 109–116.
5. Shamloul A.M., Minafra A., Hadidi A., Giunchetti L., Waterworth H.E., Allam E.K., 1995. Peach latent mosaic viroid: nucleotide sequencing of an Italian isolate, sensitive detection using RT-PCR and geographic distribution. – *Acta Horticulturae*, 386: 522–530.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Приходько Юрий Николаевич, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия;
e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru.

Живаева Татьяна Степановна, научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия;
e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru.

Лозовая Евгения Николаевна, научный сотрудник отдела аспирантуры ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия;
e-mail: evgeniyaf@mail.ru.

Шнейдер Юрий Андреевич, кандидат биологических наук, начальник научно-методического и экспериментального центра, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия;
ORCID 0000-0002-7565-1241,
e-mail: yury.shneyder@mail.ru.

Каримова Елена Владимировна, кандидат биологических наук, начальник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0001-6474-8913,
e-mail: elenavkar@mail.ru.

In the course of the research carried out, the diagnostics of the PLMVd was developed, based on the use of various PCR modifications. Thus, the studies described in the article formed the basis for the methodological recommendations for the detection and identification of this pathogen developed for the first time in the Russian Federation.

REFERENCES

1. Ambrós S., Hernández C., Desvignes J.C., Flores R. Genomic structure of three phenotypically different isolates of Latent mosaic viroid: Implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasi species. *Journal of Virology*, 1998; 72: 7397–7406.
2. Boubourakas I.N., Voloudakis A.E., Fasseas K., Resnick N., Kolta H., Kyriakopoulou P.E. Cellular localization of Peach latent mosaic viroid in peach sections by liquid phase *in situ* RT-PCR. *Plant Pathology*, 2011; 60: 468–473.
3. Loret S., Faggioli F., Cardoni M., Mordenti G., Babini A.R., Poggi Pollini C., Barba M. Comparison of different diagnostic methods for detection of Peach latent mosaic viroid. *Bulletin OEPP/EPPO*, 1999; 29: 433–438.
4. Luigi M., Faggioli F. Development of quantitative real-time PCR for the detection and quantification of Peach latent mosaic viroid. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2011; 130: 109–116.
5. Shamloul A.M., Minafra A., Hadidi A., Giunchetti L., Waterworth H.E., Allam E.K. Peach latent mosaic viroid: nucleotide sequencing of an Italian isolate, sensitive detection using RT-PCR and geographic distribution. *Acta Horticulturae*, 1995; 386: 522–530.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yuri Prikhodko, PhD in Agriculture, leading researcher, Scientific and Methodological Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru.

Tatiana Zhivaeva, researcher, Scientific and Methodological Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru.

Evgeniya Lozovaya, researcher, Postgraduate Studies Department, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; e-mail: evgeniyaf@mail.ru.

Yuri Shneyder, PhD in Biology, Head of Research and Methodology and Experimental Center, Leading Researcher, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0002-7565-1241, e-mail: yury.shneyder@mail.ru.

Elena Karimova, PhD in Biology, Head of Scientific and Methodological Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru.

Некоторые результаты исследований насекомых – фитофагов повилик *Cuscuta* spp. (Cuscutaceae), проведенных сотрудниками ВНИИ карантина растений

О.Г. ВОЛКОВ

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия
 ORCID 0000-0002-1539-0342, e-mail: volkovog@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Представлены результаты исследований насекомых, являющихся фитофагами карантинных сорных растений – повилик *Cuscuta* spp. (Cuscutaceae). Исследования были проведены сотрудниками ВНИИ карантина растений на территории Российской Федерации и некоторых сопредельных государств с конца 1980-х до начала 2000-х годов. Список выявленных на повиликах и идентифицированных фитофагов составил 26 видов насекомых из отрядов Homoptera, Heteroptera, Lepidoptera, Coleoptera и Diptera. Изучена биология ряда видов фитофагов и некоторых их паразитов из отряда Hymenoptera. Приведены подробные данные о биологии наиболее значимых фитофагов – галловых повиликовых долгоносиков рода *Smicronyx* и повиликовой мухи *Melanagromyza cuscutae*, а также об их воздействии на повилики. Сделаны выводы о незначительном регуляторном воздействии выявленных фитофагов на популяции повилик.

Ключевые слова. Биологический контроль сорных растений, естественные враги, подавление популяций сорняков, полифаги, олигофаги.



ВВЕДЕНИЕ

Главным направлением исследований, проводимых во Всесоюзном (позднее – Всероссийском) НИИ карантина растений (ВНИИКР), являлась разработка методов борьбы с карантинными вредными организмами, локализации и ликвидации их очагов.

Соответственно, разрабатывались агротехнические, химические и биологические методы контроля вредителей, патогенов и сорняков. В отделе биологического метода, который был оформлен как отдельная структура в 1968 г.,

Some results of studying phytophagous insects feeding on *Cuscuta* spp. (Cuscutaceae) conducted by FGBU “VNIIKR” researchers

O.G. VOLKOV

FGBU “All-Russian Plant Quarantine Center” (FGBU “VNIIKR”), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia
 ORCID 0000-0002-1539-0342, e-mail: volkovog@mail.ru

ABSTRACT

The article presents the results of studying the insects feeding on quarantine weeds of *Cuscuta* spp. (Cuscutaceae). The research was conducted by FGBU “VNIIKR” specialists in the Russian Federation and some neighboring countries from the late 1980s to the early 2000s. The list of the detected on *Cuscuta* spp. and identified phytophages includes 26 insect species of the orders Homoptera, Heteroptera, Lepidoptera, Coleoptera and Diptera. The biology of some phytophagous species and some of their parasites of Hymenoptera order has been studied. Detailed data on the biology of the most significant phytophages, *Smicronyx* genus snout and bark beetles and *Melanagromyza cuscutae*, as well as their effect on Cuscutaceae have been given. Conclusions have been drawn about the insignificant regulatory effect of the identified phytophages on Cuscutaceae populations.

Key words. Biological control of weeds, natural enemies, suppression of weed populations, polyphages, oligophages.

INTRODUCTION

The main direction of research carried out in the All-Union (later – All-Russian) Plant Quarantine Center (FGBU “VNIIKR”) has been development of methods for controlling quarantine pests, localizing and eliminating their outbreaks. Accordingly, agrotechnical, chemical and biological methods for controlling

развивались методы интродукции полезных организмов и их внутриареального переселения (расселения). В отделе насчитывалось до 20 сотрудников – энтомологов и фитопатологов, в течение 30 лет (1976–2005 гг.) отдел возглавлял доктор биологических наук С.С. Ижевский. Ряд проектов завершился полным или частичным успехом. Так, например, впервые была успешно осуществлена программа интродукции северокорейского яйцееда оэнциртуса *Ooencyrtus kuvanae* (How.), являющегося энтомофагом вредителя леса – непарного шелкопряда. Кроме того, успешными были программы биологического контроля вредителей цитрусовых культур, культур закрытого грунта и другие. В процессе исследований было получено много новой информации о вредных организмах, а также об их агентах биологического контроля. Часть этой информации была опубликована в периодических изданиях и в сборниках трудов, но многое из того, что вошло в научные отчеты, осталось неопубликованным.

В направлении биологического контроля карантинных видов сорных растений изучались фитофаги и фитопатогены. Основными видами-мишениями были амброзии *Ambrosia* spp., горчак ползучий *Acroptilon repens* (Linnaeus) de Candolle и повилики *Cuscuta* spp. Кроме того, целый ряд программ выполнялся совместно с международными и иностранными организациями, прежде всего с CABI (Centre for Agriculture and Bioscience International) и организациями по биологическому контролю из США, Канады и других стран. По этим проектам исследовались фитофаги льнянки *Linaria vulgaris* Mill., перистолистника *Myriophyllum spicatum* L., молочаев *Euphorbia* spp., бодяков *Cirsium* spp. и ряда других видов (рис. 1). Ранее была опубликована только часть информации о начальном этапе изучения фитофагов повилик (Волков, 1989, 1991).

Решение опубликовать информацию о ранее проведенных специалистами ВНИИКР исследованиях фитофагов повилик было принято и потому, что в последние годы интерес к этой теме возник вновь (Сухолозова и др., 2020). Возможно, новые исследователи примут во внимание данную информацию о фитофагах повилик.

Повилики – облигатные паразитические цветковые растения, входят в состав семейства Cuscutaceae с единственным родом *Cuscuta*. В мировой флоре, по данным разных авторов, насчитывается от 150–170 видов повилик (Никитичева, 1981; Киселева и др., 2010) до более чем 200. Такое расхождение данных объясняется в том числе высокой полиморфностью этих растений и условностью границ вида даже для самых обычных их представителей (Бейлин, 1986). Во флоре СССР насчитывали от 36 (Бутков, 1953) до 38 (Никитин, 1983) видов повилик.

pests, pathogens and weeds have been developed. The Biology Method Department, which was formed as a separate structure in 1968, developed methods of introduction of useful organisms and their internal migration (dispersion). The Department contained up to 20 specialists – entomologists and phytopathologists, for 30 years (1976–2005) the department was headed by Doctor of Biological Sciences, S.S. Izhevskiy. Some projects were completed with full or partial success. For example, for the first time, an introduction program was successfully implemented for *Ooencyrtus kuvanae* (How.), entomophage of the forest pest – gypsy moth. In addition, biological pest control programs for citrus crops, indoor crops and others have been successful. During the research, a lot of new information was obtained about pests, as well as their biological control agents. Some of this information was published in journals and in collections of works, but much of what was included in scientific reports remained unpublished.

Phytophages and phytopathogens were studied in the direction of biological control of quarantine weed species. The main target species were *Ambrosia* spp., *Acroptilon repens* (Linnaeus) de Candolle and *Cuscuta* spp. In addition, a number of programs were carried out jointly with international and foreign organizations, primarily with CABI (Centre for Agriculture and Bioscience International) and biological control organizations from the USA, Canada and other countries. These projects studied phytophages of *Linaria vulgaris* Mill., *Myriophyllum spicatum* L., *Euphorbia* spp., *Cirsium* spp. and some other species (Fig. 1). Previously, only a part of the information on the initial stage of studying the phytophages of *Cuscuta* spp. was published (Volkov, 1989, 1991).



Рис. 1. Заведующий отделом биологического метода ВНИИКР С.С. Ижевский выявляет повреждения молочая *Euphorbia* sp. Казахстан (фото О.Г. Волкова)

Fig. 1. Head of Biological Method Department of FGBU "VNIIKR", S.S. Izhevskiy, detects the damage on *Euphorbia* sp. Kazakhstan (photo by O.G. Volkov)

Наибольшее разнообразие видов этого рода отмечено в южных регионах, например на небольшой территории Кыргызстана – 20 видов (Лазьков, Султанова, 2011). В современной России выявлено около 15 видов повилик (Киселева и др., 2010), все они отнесены к карантинным сорням растениям.

Можно отметить, что большинство видов повилик являются автохтонными для территории России и занимают весь пригодный для их существования ареал, как, например, повилика европейская (рис. 2). Тем не менее некоторыми авторами отмечается расширение ареалов и повышение обилия вредоносных повилик, особенно в южных регионах нашей страны (Мариковский, Иванников, 1968). Этот процесс, по-видимому, в первую очередь связан с деятельностью человека, которая ведет как к непосредственному распространению сорняка (через новые транспортные маршруты, орошение и пр.), так и к разрушению устойчивых природных биотопов. Иллюстрацией к такому выводу могут послужить наши наблюдения в Нуралинском заповеднике (Узбекистан). В этом горном заповеднике, который во время исследований занимал около 30 000 га, имеются 3 урочища, примерно равные по составу растительности (орехоплодные леса). В первом из них, Хаят-сае, в котором расположен кишлак и центральная усадьба, мы насчитали 5 видов повилик подродов *Grammica* (повилика полевая), *Cuscuta* и *Monogyna*. Во втором, Тикчи-сае, где люди не живут, но регулярно выпасают скот, были обнаружены только повилики подрода *Monogyna*, но обильно растущие. В третьем, самом отдаленном, Маджерум-сае, – наиболее охраняемая часть заповедника, труднодоступная для людей и недоступная для транспорта. Там не выпасается скот и повилики вообще не были обнаружены. Аналогичную картину мы наблюдали и в заповеднике «Аксу-Джабаглы» (Казахстан).

Сведения о вредоносности повилик неоднозначны. Кроме прямого вреда растениям, наносимого паразитированием на них, повилики известны как переносчики вирусных и микоплазменных патогенов – в частности, повилика полевая *Cuscuta campestris* Yunck. переносит мозаику табака и курчавость свеклы (Никитичева, 1981). В то же время некоторые известные гербологи считают повилику сорняком, не требующим специальных мер воздействия и устраниющимся при соблюдении зональной агротехники (Никитин, 1983), т. е. сорняком низкой культуры земледелия. Повилики, как обильно и длительно цветущие энтомофильные растения, являются и хорошими медоносами (Булгакова, 1989). Повилику полевую *Cuscuta campestris* в Южном Китае применяли в качестве биоагента для борьбы с другим видом – *Mikania micrantha* (Asteraceae), который относится к числу 10 наиболее опасных инвазивных видов и наносит большой экономический ущерб в этом регионе. Развитие *Cuscuta campestris* подавляло рост и развитие биомассы микании, что можно считать успешным применением повилики в качестве агента биоконтроля (Файвуш, Таманян, 2014).

Сегодня в борьбе с этим сорняком применяют в основном агротехнические и химические методы, но в связи с тем, что повилики характеризуются постоянным присутствием на необрабатываемых землях, обилием семенной продукции и множественностью путей распространения, эти меры

The decision to publish information about the studies of the phytophages of *Cuscuta* spp. that had been carried out earlier by the VNIIKR specialists was also made because in recent years interest in this topic has reappeared (Sukholozova et al., 2020). Perhaps, new researchers will take into account the information about the phytophages of *Cuscuta* spp.

Cuscuta spp. are obligate parasitic flowering plants, part of the family Cuscutaceae with the only genus *Cuscuta*. According to different authors, the world flora contains 150–170 *Cuscuta* spp. (Nikiticheva, 1981; Kiseleva et al., 2010) up to more than 200. This discrepancy in data is explained, among other things, by the high polymorphism of these plants and the conventionality of the species areas even for their most common representatives (Beilin, 1986). In the flora of the USSR, from 36 (Butkov, 1953) to 38 (Nikitin, 1983) *Cuscuta* spp. were counted. The greatest diversity of species of this genus is noted in the southern regions, for example, in a small territory of Kyrgyzstan – 20 species (Lazkov, Sultanova, 2011). In modern Russia, about 15 *Cuscuta* spp. have been identified (Kiseleva et al., 2010), all of them are classified as quarantine weeds.

It can be noted that most *Cuscuta* spp. are autochthonous for the territory of Russia and occupy the entire habitat suitable for their existence, such as, for example, European dodder (Fig. 2). Nevertheless, some authors note the expansion of habitats and an increase in the abundance of harmful dodders, especially in the southern regions of Russia (Marikovsky, Ivannikov, 1968). Apparently, this process is primarily associated with human activities, which leads both to the direct spread of the weed (through new transport routes, irrigation, etc.) and to the destruction of sustainable natural biotopes. Our observations in the Nurata Nature Reserve (Uzbekistan) can serve as an illustration of this conclusion. In this mountain reserve, which during the research covered about 30,000 hectares, there are 3 natural boundaries, approximately



Рис. 2. Повилика европейская *Cuscuta europaea* L. на крапиве. Россия, Московская область (фото О.Г. Волкова)

Fig. 2. European dodder *Cuscuta europaea* L. on nettles. Russia, Moscow region (photo by O.G. Volkov)



Рис. 3. Автор статьи О.Г. Волков в поисках фитофагов повилик. Таласский Алатау, хребет Бугулутор (фото И. Олонцева)

Fig. 3. The author of the article is O.G. Volkov in search of phytophagous dodders. Talasskiy Alatau, Bugulutor ridge (photo by I. Olontsev)

способны дать лишь временный эффект. К тому же в настоящее время во всем мире общественное мнение склоняется к сокращению и отмене применения пестицидов, в том числе и гербицидов, поскольку показано их чрезвычайно отрицательное воздействие как на окружающую среду, так и на человека.

В этих условиях нами была предпринята попытка найти объект – фитофага, способного стать агентом биологического контроля повилик. Предполагалось, что, в случае обнаружения такого фитофага, его можно будет расселять в те части ареала повилик, в которых он отсутствует, т. е. методом внутриареального расселения. Также один из потенциальных вариантов применения такого фитофага – массовое производство в лабораторных условиях и внесение в очаги. Поиск должен был проводиться как в местах непосредственной вредоносности повилик (сельхозугодия), так и в минимально нарушенных биотопах (заповедники).

Изучением фитофагов повилик в нашей стране занимались и ранее. В ходе исследований, которые проводили в основном в Казахстане, было выявлено наличие специализированных фитофагов сорняка, таких как повиликовый галловый слоник и повиликовая муха (Иванников, 1972; Шинкаренко, 1980, 1982). Однако призывы некоторых авторов к активному использованию фитофагов, на наш взгляд, ничем не обоснованы. Совокупный перечень фитофагов повилик по литературным источникам составляет более 70 видов клещей и насекомых, но подробный литературный обзор мы в данной работе опускаем.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полевые исследования были проведены нами на территории Узбекистана (в Джизакской, Ташкентской, Самаркандской, Ферганской областях и в Нурутинском заповеднике); в Казахстане (в Чимкентской, Джамбульской, Алма-Атинской, Уральской областях и в заповеднике «Аксу-Джабаглы»), в Московской области, в Киргизии (в Чуйской и Иссык-Кульской областях) (рис. 3). Также полевые

равны в составе растительности (ореховые леса). В первом из них, Hayat-say, в котором расположены деревня kishlak (село) и центральная усадьба, насчитывали 5 видов доддеров из подрода *Grammica*, *Cuscuta* и *Monogyna*. Во втором, Tikchi-sai, необитаемом, но используемом для скотоводства, только доддеры из подрода *Monogyna* были обнаружены, хотя и в изобилии. Третий и самый удаленный, Majerum-sai, является самой защищенной частью заповедника, где нет доступа для людей и недоступен для транспорта. Животные там не пасутся и доддеров не было обнаружено. Аналогичная картина наблюдалась в Аксу-Джабаглы заповеднике (Казахстан).

Information about the harmfulness of dodders is ambiguous.

Apart from direct damage to plants caused by parasitizing them, dodders are known as carriers of viral and mycoplasma pathogens – in particular, *Cuscuta campestris* Yunck is a vector of string leaf and beet stripe-and-curl disease (Nikiticheva, 1981). At the same time, some well-known herbologists consider dodder a weed that does not require special control measures and which is eliminated by zonal agricultural technology (Nikitin, 1983), i. e., a weed of low crop cultivation. Dodders, as abundantly and long-term flowering entomophilous plants, are also good honey plants (Bulgakova, 1989). In South China, *Cuscuta campestris* was used as a biological control agent for another species – *Mikania micrantha* (Asteraceae), which belongs to 10 most harmful invasive species and causes great economic losses in this area. The development of *Cuscuta campestris* suppressed the growth and development of *Mikania* biomass, which can be considered a successful use of dodder as a biocontrol agent (Faivush, Tamanyan, 2014).

Today, mainly agricultural and chemical methods are used to control this weed, but due to the fact that dodders are characterized by a constant presence on uncultivated lands, an abundance of seed production and a multiplicity of ways of spreading, these measures can only have a temporary effect. In addition, at present, all over the world, public opinion is inclined to reduce and eliminate the use of pesticides, including herbicides, since their extremely negative impact on both the environment and humans has been shown.

Under these conditions, we made an attempt to find an object – a phytophage capable of becoming a biological control agent of dodders. It was assumed that, if such a phytophage was found, it could be resettled in those parts of the dodders area where it was absent, i. e., by the method of internal dispersion. Also, one of the potential applications of such a phytophage is mass production in laboratory conditions and introduction



Рис. 4. Повилика полевая *Cuscuta campestris* Yunck. на дурнишнике *Xanthium* sp. с галлами повиликового долгоносика *Smicronyx* sp. Казахстан (фото О.Г. Волкова)

Fig. 4. *Cuscuta campestris* Yunck. on *Xanthium* sp. with galls of *Smicronyx* sp. Kazakhstan (photo by O.G. Volkov)

исследования под нашим руководством были проведены студентом кафедры энтомологии биологического факультета МГУ Д. Щепоткиным на острове на реке Или (Казахстан) в процессе подготовки курсовой работы.

Точно идентифицировать вид повилики, особенно в полевых условиях, достаточно сложно. Однако род на цветущих растениях хорошо разделяется на 3 подрода: *Grammica*, *Cuscuta* и *Monogyna* (*Monogynella*) (Федоров, Камелин, 1981). Учитывая, что фитофаги повилик представлены полифагами или олигофагами и монофагами среди них не выявлено, такого разделения на подроды при сборах фитофагов вполне достаточно. Однако можно отметить, что в подроде *Grammica* мы везде работали с повиликой полевой *Cuscuta campestris* Yunck. (рис. 4), а в подроде *Cuscuta* – с повиликой европейской *Cuscuta europaea* L. На других видах подрода специализированные фитофаги нами обнаружены не были. Что касается повилик подрода *Monogyna*, среди которых в местах исследований наиболее распространены повилика хмелевидная *Cuscuta lupuliformis* Krock., повилика Леманна *Cuscuta lemanniana* Bunge и повилика одностолбиковая *Cuscuta monogyna* Vahl, то в дальнейшем мы будем эти виды называть толстостебельными повиликами (рис. 5).

Поиск и сбор фитофагов повилик проводили по общепринятым методикам сбора насекомых. Собирали также повреждения повилик, галлы и плоды для выведения фитофагов. С целью выведения фитофагов галлы и плоды экспонировали в стеклянных банках емкостью около 1 л. На дно банок насыпали прокаленный и увлажненный снизу песок слоем 2 см, на поверхность песка раскладывали плоды или галлы. Часть образцов выдерживали при пониженной температуре (+2...+4 °C) 1–2 месяца и лишь после этого выкладывали на экспонирование. Выходящих из образцов фитофагов перемещали в теплицу ВНИИКР на выращиваемые в ней повилики. Выводившихся паразитических

входили вспышки. The search was to be carried out both in places of direct harmfulness of dodders (farmland) and in minimally disturbed biotopes (reserves).

The study of phytophages of dodders in Russia was carried out earlier. In the course of research conducted mainly in Kazakhstan, the presence of specialized phytophages of the weed was revealed, such as *Smicronyx* and *Melanagromyza cuscuteae* (Ivannikov, 1972; Shinkarenko, 1980, 1982). However, the calls of some authors for the active use of phytophages, in our opinion, are unjustified. According to literary sources, the cumulative list of phytophages of dodders is more than 70 species of mites and insects, but we omit a detailed literary review in this work.

MATERIALS AND METHODS

Field studies were carried out in Uzbekistan (in Jizzakh, Tashkent, Samarkand, Fergana regions and in the Nurata nature reserve); in Kazakhstan (in the Chimkent, Dzhambul, Alma-Ata, Ural regions and in the Aksu-Dzhabagly reserve), in Moscow Oblast, in Kyrgyzstan (in the Chui and Issyk-Kul regions) (Fig. 3). Also, field research under our supervision was carried out by D. Schepotkin, a student of the Department of Entomology, Faculty of Biology, Moscow State University, on an island on the Ili River (Kazakhstan) in the process of preparing a term paper.

It is quite difficult to accurately identify the species of dodder, especially in the field. However, the genus on flowering plants is well divided into 3 subgenera: *Grammica*, *Cuscuta* and *Monogyna* (*Monogynella*) (Fedorov, Kamelin, 1981). Considering that the phytophages of dodders are represented by polyphages or oligophages, and no monophages were found among them, such a division into subgenera when collecting phytophages is quite sufficient. However, it can be noted that in the subgenus *Grammica* we worked with *Cuscuta campestris* Yunck. (Fig. 4), and in the subgenus *Cuscuta* – *Cuscuta europaea* L. No specialized phytophages on other species of the subgenus *Monogyna*, among which in research sites the most common ones are *Cuscuta lupuliformis* Krock., *Cuscuta lemanniana* Bunge and *Cuscuta monogyna* Vahl, these will be referred to as thick-stemmed dodders (Fig. 5).

The search and collection of phytophages of dodders was carried out according to the generally accepted methods of collecting insects. We also collected damages from dodders, galls and fruits for the cultivation of phytophages. In order to cultivate phytophages, galls and fruits were exposed in glass jars with a capacity of about 1 liter. Calcined and moistened sand with a layer of 2 cm was poured on the bottom of the



Рис. 5. Толстостебельная повилика с плодами на кустарнике. Узбекистан (фото О.Г. Волкова)

Fig. 5. A thick-stemmed dodder with fruits on a bush. Uzbekistan (photo by O.G. Volkov)

перепончатокрылых монтировали для коллекционного материала. Для массового сбора фитофагов и их паразитов в сильно запыленных местах, при обработках пестицидами и прочих неблагоприятных условиях нами были изготовлены специальные экстгаустер и морилка, повысившие производительность и качество сборов.

Изучение биологии фитофагов проводили как в полевых, так и в камеральных условиях. После определения видовой принадлежности фитофагов, по литературным данным определяли специфичность их трофических связей; для наиболее эффективных фитофагов определяли фенологию развития, степень повреждаемости ими повилик, расселительные способности, а также выясняли процент зараженности фитофагов паразитами.

В целях определения трофических связей выходивших из плодов повилики насекомых новых для науки видов (например, *Eurytoma* sp.), плоды в небольшом количестве экспонировали в подготовленных пробирках без дна, помещенными в пакетах воды. В этом случае вскрытием плодов можно было определить характер питания насекомого – фитофага или паразита.

Собранным личинкам фитофагов давали возможность допитаться и окуклиться. Для имаго фитофагов предоставляли дополнительное питание раствором меда или на цветах и гуттациях повилик. Затем фитофагов выпускали в боксы с вегетирующей повиликой.

Поскольку повилики паразитируют на других растениях, на них нередко присутствуют фитофаги растений – хозяев повилик или полифаги, использующие для питания оба вида растений.

Обработку собранного материала, кроме ВНИИКР, проводили также в ЗИН АН СССР (г. Ленинград), в Институте зоологии АН УССР (г. Киев), во ВНИИБМЗР (г. Кишинев) и на кафедре энтомологии и в Зоологическом музее МГУ. Идентификацию отдельных групп насекомых проводили: Д. Тищечкин (Homoptera (Hemiptera):

jars, fruits or galls were laid on the surface of the sand. Some of the samples were kept at a low temperature (+2...+4 °C) for 1–2 months and only after that they were laid out for exposure. Phytophages emerging from the samples were transferred to the VNIIKR greenhouse on the dodders grown there. The hatched parasitic hymenoptera were mounted for collection material. For the mass collection of phytophages and their parasites in highly dusty places, during treatment with pesticides and other unfavorable conditions, we made a special exhauster and stain, which increased the productivity and quality of the collection.

The study of the biology of phytophages was carried out both in field and in laboratory conditions. After determining the species of phytophages, the specificity of their trophic con-

nections was determined according to the reference data; for the most effective phytophages, the phenology of development, the degree of damage to dodders by them, dispersal abilities were determined, and the percentage of infection of phytophages with parasites was also determined.

In order to determine the trophic links insect species emerging from the fruits of dodders new for science (e. g., *Eurytoma* sp.), small amounts of fruits were exposed in prepared test tubes without a bottom, placed in water vapor. In this case, by opening the fruit, it was possible to determine the nature of the feeding type of the insect – phytophage or parasite.

The collected phytophagous larvae were let to feed and pupate. For phytophage imagoes, additional nutrition was provided with a solution of honey or on flowers and guttations of dodders. Then the phytophages were released into boxes with vegetative dodders.

Since dodders parasitize on other plants, phytophages of plants are often present on them – the hosts of dodders or polyphages, which use both plant species for nutrition.

The processing of the collected material, in addition to VNIIKR, was also carried out at the ZIN of the USSR Academy of Sciences (Leningrad), at the Institute of Zoology of the Academy of Sciences of the Ukrainian SSR (Kiev), at the VNIIBMZR (Kishinev) and at the Department of Entomology and at the Zoological Museum of Moscow State University. Individual groups of insects were identified by: D. Tishechkin (Homoptera (Hemiptera): Issidae, Tettigometridae, Aphrophoridae, Cicadellidae), I. Kerzhner (Hemiptera-Heteroptera), L. Medvedev (Coleoptera: Chrysomelidae), B. Korotyaev (Coleoptera: Coccinellidae), M. Ter-Minasyan (Coleoptera: Bruchidae), I. Plyushch (Lepidoptera: Lycaenidae), V. Kuznetsov (Lepidoptera: Tortricidae), E. Antonova

Issidae, Tettigometridae, Aphrophoridae, Cicadellidae), И. Кержнер (Hemiptera-Heteroptera), Л. Медведев (Coleoptera: Chrysomelidae), Б. Коротяев (Coleoptera: Curculionidae), М. Тер-Минасян (Coleoptera: Bruchidae), И. Плющ (Lepidoptera: Lycaenidae), В. Кузнецов (Lepidoptera: Tortricidae), Е. Антонова и J. Viidalepp (Lepidoptera: Geometridae), М. Зерова (Hymenoptera: Eurytomidae), В. Тобиас (Hymenoptera: Braconidae). Значительная часть собранного материала остается неидентифицированной.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Список выявленных нами на повиликах и идентифицированных фитофагов:

- Homoptera
 - Auchenorrhyncha
 - Issidae
 - 1. *Hysteropterum asiaticum* Leth.
 - 2. *Hysteropterum* sp.
 - 3. *Brachyprosopa bicorne* Kusn.
 - Tettigometridae
 - 4. *Tettigometra* sp.
 - Aphrophoridae
 - 5. *Aphrophora salicina* (Goeze)
 - Cicadellidae
 - 6. *Platymetopius* sp.
 - 7. *Fieberiella macchiae* Lnv.
 - Hemiptera-Heteroptera
 - Miridae
 - 8. *Lygus gemellatus* (H.-S.)
 - 9. *Chlamydatus pullus* (Reut.)
 - 10. *Campylomma annulicornis* Sign.
 - 11. *Campylomma diversicornis* Reut.
 - 12. *Deraeocoris ventralis* Reut.
 - 13. *Deraeocoris serenus* (Dgl. et Sc.)
 - Lygaeidae
 - 14. *Lygaeus equestris* (L.)
 - Coleoptera
 - Curculionidae
 - 15. *Smicronyx coecus* (Reich.)
 - 16. *S. albopictus* Fst.
 - 17. *Smicronyx* sp.
 - 18. *Tychius (Lepidotychius) urbanus* Fst. Вид указан на верблюжьей колючке *Alhagi* spp.
 - Chrysomelidae
 - 19. *Pachybrachis nigropunctatus* Suffr. Вид указан на верблюжьей колючке *Alhagi* spp. и солодке *Glycyrrhiza* spp. (Лопатин, 2010).
 - Bruchidae (Bruchinae)
 - 20. *Bruchidius imbricornis* Panz. На бобовых, вредит козлятнику *Galega officinalis* (Hodge, 2012).
 - Lepidoptera
 - Lycaenidae
 - 21. *Celastrina (Lycaena, Cyanaris) argiolus* (L.)
 - Tortricidae
 - 22. *Clytia ambiguella* Hübner
 - 23. *Lobesia (Endopiza)* sp.
 - Geometridae
 - 24. *Gymnoscelis pumilata* Hübner (*postgenitata* Dietze)
 - 25. *Eupithecia barteli* ssp. *artshae* Viid.
 - Diptera
 - Agromyzidae
 - 26. *Melanagromyza cuscuteae* Hering
- Обращает на себя внимание обедненность энтомофауны фитофагов повилик. Особенно мало

and J. Viidalepp (Lepidoptera: Geometridae), M. Zerova (Hymenoptera: Eurytomidae), V. Tobias (Hymenoptera: Braconidae). Much of the collected material remains unidentified.

RESULTS AND DISCUSSION

The list of phytophages detected on dodders and identified:

- Homoptera
- Auchenorrhyncha
- Issidae
 - 1. *Hysteropterum asiaticum* Leth.
 - 2. *Hysteropterum* sp.
 - 3. *Brachyprosopa bicorne* Kusn.
- Tettigometridae
 - 4. *Tettigometra* sp.
- Aphrophoridae
 - 5. *Aphrophora salicina* (Goeze)
- Cicadellidae
 - 6. *Platymetopius* sp.
 - 7. *Fieberiella macchiae* Lnv.
- Hemiptera-Heteroptera
- Miridae
 - 8. *Lygus gemellatus* (H.-S.)
 - 9. *Chlamydatus pullus* (Reut.)
 - 10. *Campylomma annulicornis* Sign.
 - 11. *Campylomma diversicornis* Reut.
 - 12. *Deraeocoris ventralis* Reut.
 - 13. *Deraeocoris serenus* (Dgl. et Sc.)
- Lygaeidae
 - 14. *Lygaeus equestris* (L.)
- Coleoptera
- Curculionidae
 - 15. *Smicronyx coecus* (Reich.)
 - 16. *S. albopictus* Fst.
 - 17. *Smicronyx* sp.
 - 18. *Tychius (Lepidotychius) urbanus* Fst. The species is indicated on *Alhagi* spp.
- Chrysomelidae
 - 19. *Pachybrachis nigropunctatus* Suffr. The species is indicated on *Alhagi* spp. and *Glycyrrhiza* spp. (Лопатин, 2010).
- Bruchidae (Bruchinae)
 - 20. *Bruchidius imbricornis* Panz. On Fabaceae, it damages *Galega officinalis* (Hodge, 2012).
- Lepidoptera
- Lycaenidae
 - 21. *Celastrina (Lycaena, Cyanaris) argiolus* (L.)
- Tortricidae
 - 22. *Clytia ambiguella* Hübner
 - 23. *Lobesia (Endopiza)* sp.
- Geometridae
 - 24. *Gymnoscelis pumilata* Hübner (*postgenitata* Dietze)
 - 25. *Eupithecia barteli* ssp. *artshae* Viid.
- Diptera
 - Agromyzidae
 - 26. *Melanagromyza cuscuteae* Hering

Attention is drawn to the impoverishment of the entomofauna of the phytophages of dodders. There are especially few species capable of going through the full

видов, способных проходить на повиликах полный цикл своего развития. По-видимому, один из основных факторов, способствующих этому, – отсутствие у повилик листьев и корней вследствие их облигатного паразитизма. Таким образом, выпадают группы филлофагов и ризофагов, во многих случаях составляющие большинство из видов насекомых – потребителей растений. Кроме того, повилики содержат ядовитые алкалоиды, что является причиной отравлений скота и требует от фитофагов наличия специальных ферментов. К тому же повилики, в отличие от большинства высших растений, сами являются консументами («хемоорганогетеротрофами» (Гиляров, 2016)), и, следовательно, их фитофаги уже консументы второго порядка (Твердислов и др., 2012). Подавляющее большинство питающихся на повиликах насекомых с неполным превращением являются полифагами. Нередко в условиях жаркого и сухого климата Средней Азии и юга Казахстана они используют стебли повилик как источники влаги, не причиняя им заметного вреда. Некоторые из выявленных насекомых, как, например, клопы родов *Deraeocoris* и *Campylomma*, являются даже фитозоофагами. Кроме того, исследования показали, что видовой состав фитофагов с неполным превращением, особенно многочисленных цикадок, не совпадает даже в близлежащих биотопах. Следовательно, какого-либо предпочтения повилик этими видами-полифагами не отмечено, и сорняк является достаточно случайным компонентом их трофических связей.

Повреждения, наносимые повиликам насекомыми с полным превращением, более значительны и зачастую относятся к генеративным органам. Можно выявить следующие виды насекомых-фитофагов, наносящих существенные повреждения повиликам.

1. *Celastrina (Lycaena, Cyanaris) argiolus* (L.) (Lepidoptera: Lycaenidae)

Гусеницы этой голубянки встречались на плодах толстостебельных повилик во многих местах сборов, исключая участки обрабатываемых сельхозугодий. Гусеницы около 1 см длиной, по внешнему виду напоминают небольших слизней или мокриц: брюшная сторона плоско-вогнутая, спинная – выпуклая; гусеницы голые. Окраска – от коричневого до зеленоватого тонов, по окраске гусеницы очень сходны с плодами толстостебельных повилик. Процесс питания своеобразен: гусеница переползает с плода на плод и выедает их изнутри, погружая в плод голову на вытягивающейся передней части туловища, само туловище остается снаружи плода (рис. 6).

Во время питания (14–20 дней) гусеница уничтожает десятки плодов толстостебельных повилик. Через 15–20 дней после оккулирования выходят имаго, почти целиком голубые (самцы) (рис. 7) или с широкой темной оторочкой по переднему и внешнему краю крыльев (самки) бабочки, в размахе крыльев 25–30 мм.

По литературным данным, отмечено питание гусениц этого вида на вегетативных и генеративных органах растений семейств бобовых, крушиновых, вересковых и других (Koch, 1984), в том числе и на культурных растениях. Так, нами обнаружено питание гусениц этой бабочки незрелыми

cycle of their development on dodders. Apparently, one of the main factors contributing to this is the absence of leaves and roots in dodders due to their obligate parasitism. Thus, the groups of phyllophages and rhizophages, which in many cases constitute the majority of insect species – plant consumers, fall out. In addition, dodders contain poisonous alkaloids, which are the cause of cattle poisoning and require special enzymes from phytophages. Besides, unlike most higher plants, dodders are themselves consumers ("chemo-organoheterotrophs" (Gilyarov, 2016)), and, therefore, their phytophages are already second-order consumers (Tverdislov et al., 2012). The overwhelming majority of incompletely transformed insects feeding on dodders are polyphages. Often, in the hot and dry climate of Central Asia and southern Kazakhstan, they use the stems of dodders as a source of moisture, without causing them significant damage. Some of the detected insects, such as bugs of the genera *Deraeocoris* and *Camptylomma*, are even phytozophages. In addition, studies have shown that the species composition of phytophages with incomplete transformation, especially of numerous leafhoppers, does not coincide even in nearby biotopes. Consequently, no preference for dodders by these polyphagous species was noted, and the weed is a rather random component of their trophic links.

Damage caused by fully transformed insects to dodders is more significant and often refers to generative organs. The following species of phytophagous insects causing significant damage to dodders can be identified.

1. *Celastrina (Lycaena, Cyanaris) argiolus* (L.) (Lepidoptera: Lycaenidae)

Larvae of this moth were found on the fruits of thick-stemmed dodders in many harvesting areas, excluding areas of cultivated farmland. Larvae are about 1 cm long, in appearance they resemble small slugs or wood lice: the ventral side is flat-concave, the dorsal side is convex; larvae are naked. Coloring – from brown to greenish tones, larvae are very similar in color to the fruits of thick-stemmed dodders. The feeding process



Рис. 6. Гусеница голубянки *Celastrina argiolus* (L.) на плоде толстостебельной повилики. Казахстан (фото О.Г. Волкова)

Fig. 6. Larva of *Celastrina argiolus* (L.) on the fruit of a thick-stemmed dodder. Kazakhstan (photo by O.G. Volkov)



Рис. 7. Самец голубянки *Celastrina argiolus* (L.), выведен из гусеницы с плода толстостебельной повилики (фото О.Г. Волкова)

Fig. 7. Male of *Celastrina argiolus* (L.), cultivated from the larva from the fruit of the thick-stemmed dodder (photo by O.G Volkov)



Рис. 8. Повиликовый долгоносик *Smicronyx* sp. на цветках повилики европейской. Россия, Московская область (фото О.Г. Волкова)

Fig. 8. Weevil *Smicronyx* sp. on the flowers of European dodder. Russia, Moscow Oblast (photo by O.G. Volkov)

плодами черной смородины в Московской области. Широкий спектр питания не дает возможности рассматривать эту бабочку как возможного агента биологической борьбы с повиликами. В то же время интересно выяснить, имеются ли в этом виде специализированные популяции, предпредлагающие повилику. Такие факторы, как быстрое развитие и поливольтинность в южных регионах, питание на генеративных органах и т. д., сделали бы эту голубянку одним из наиболее эффективных фитофагов повилик. Нами отмечено поражение гусениц этой бабочки паразитами – ихневмонидами.

2. *Gymnoscelis pumilata* Hübner (*postgenitata* Dietze) (Lepidoptera: Geometridae)

Небольшая гусеница этой бабочки-пяденицы встречается на повиликах редко, питается соцветиями и плодами толстостебельных повилик. Этот вид также отмечен как полифаг, в его спектр питания входят растения из семейств сложноцветных, вересковых, лютиковых, розоцветных.

3. *Eupithecia barteli* ssp. *artshae* Viid. (Lepidoptera: Geometridae)

Эта пяденица по особенностям питания сходна с предыдущим видом, встречается еще более редко, повреждения, наносимые ею, незначительны. Вид описан Видалеппом, биология слабо изучена.

4. *Clytia ambiguella* Hübner (Lepidoptera: Tortricidae)

5. *Lobesia (Endopiza)* sp. (Lepidoptera: Tortricidae)

Личинки этих листоверток активно питаются плодами толстостебельных повилик, но оба вида также являются полифагами, первая к тому же известна как листовертка двулетняя виноградная и вредит винограду, смородине и ряду других сельскохозяйственных культур.

6. *Smicronyx coecus* (Reich.) (Coleoptera: Curculionidae)

7. *S. albopictus* Fst.

8. *Smicronyx* sp.

Специализированный род Смикроникс семейства долгоносиков охватывает около 100 видов, распространенных в основном в Западном полушарии. В фауне жуков СССР насчитывалось 10 видов этого рода (Байтенов, 1974). Все представители

is peculiar: the larva crawls from fetus to fetus and eats them from the inside, immersing its head into the fetus on the stretching front part of the body, the body itself remains outside the fetus (Fig. 6).

During the feeding (14–20 days), the larva destroys dozens of fruits of thick-stemmed dodders. In 15–20 days after pupation, adults emerge, almost entirely blue (males) (Fig. 7) or with a wide dark margin along the front and outer edge of the wings (female) of the butterfly, with a wingspan of 25–30 mm.

According to reference data, feeding of larvae of this species on the vegetative and generative organs of plants of the families of Fabaceae, buckthorns, heathers, and others was noted (Koch, 1984), including cultivated plants. So, we found feeding of larvae of this butterfly on immature fruits of black currant in Moscow Oblast. A wide range of nutrition does not make it possible to consider this moth as a possible biological control agent for dodders. At the same time, it is interesting to find out whether there are specialized populations in this species that prefer dodder. Factors such as rapid development and polyvoltinity in the southern regions, feeding on generative organs, etc., would make this lepidoptera one of the most effective dodder phytophages. We have noted the larvae of this moth are damaged by parasites – Ichneumonidae.

2. *Gymnoscelis pumilata* Hübner (*postgenitata* Dietze) (Lepidoptera: Geometridae)

A small larva of this moth is rarely found on dodders; it feeds on inflorescences and fruits of thick-stemmed dodders. This species is also noted as a polyphage, its nutrition spectrum includes plants from the families of Asteraceae, Heather, Buttercup, Rosaceae.

3. *Eupithecia barteli* ssp. *artshae* Viid. (Lepidoptera: Geometridae)

This moth is similar in feeding habits to the previous species, it is even more rare, the damage caused by it is insignificant. The species is described by Vidalepp, the biology is poorly studied.

рода являются фитофагами-галлообразователями заразих и повилик. Долгоносики (слоники) встречались везде, где были повилики (рис. 8).

Биология видов повиликовых долгоносиков сходна. Нами она была изучена в основном в Алма-Атинской области Казахстана. Зимуют долгоносики в стадии имаго в почве, на поверхность выходят в зависимости от температуры в конце весны и в начале лета, дополнительное питание осуществляют на стеблях повилик, в стебли же, после спаривания, откладывают яйца. По мере внутритканевого питания личинок участок стебля преобразуется в галл диаметром до 2–3 см на повилике полевой (рис. 4) и до 4–5 см на толстостебельных повиликах (рис. 9). В одном галле часто можно обнаружить 3–4 личинки долгоносика, каждая из которых находится в отдельной камере. После прекращения питания личинка прогрызает отверстие в стенке галла, выходит из него и оккулируется в верхних слоях почвы. После выхода личинок участок стебля повилики с галлами засыхает.

В условиях Алма-Атинской области весь цикл развития занимает около месяца, из этого времени на стадию яйца и питающейся личинки приходится около 15 суток, на стадию предкуколки – 5–6 суток, на стадию куколки – около 10 суток.

По-видимому, вследствие слабой расселительной способности долгоносиков ярко выражена

4. *Clyisia ambiguella* Hübner (Lepidoptera: Tortricidae)

5. *Lobesia (Endopiza)* sp. (Lepidoptera: Tortricidae)

The larvae of these leafroller moths actively feed on the fruits of thick-stemmed dodders, but both species are also polyphages, the former is also known as the vine moth and causes damage to grapes, currants and some other crops.

6. *Smicronyx coecus* (Reich.) (Coleoptera: Curculionidae)

7. *S. albopictus* Fst.

8. *Smicronyx* sp.

The specialized genus *Smicronyx* of the family of weevils includes about 100 species, distributed mainly in the Western Hemisphere. In the fauna of beetles of the USSR, there were 10 species of this genus (Baytenov, 1974). All representatives of the genus are phytophages-gall-forming broomrape and dodders. Weevils were found wherever there were dodders (Fig. 8).

The biology of the species of dodder weevils is similar. We studied it mainly in the Alma-Ata region of Kazakhstan. Weevils overwinter in the adult stage in the soil, they come to the surface depending on the temperature in late spring and early summer; additional feeding is carried out on the stems of dodders, and after mating, they lay eggs in the stems. With the interstitial feeding of the larvae, the section of the stem is transformed into a gall with a diameter of up to 2–3 cm



Рис. 9. Галлы повиликового долгоносика *Smicronyx* sp. на толстостебельной повилике, Казахстан (слева), и повилике европейской, Россия, Московская область (справа вверху). Справа внизу видно выходное отверстие в центре галла (фото О.Г. Волкова)

Fig. 9. Galls of the dodder weevil *Smicronyx* sp. on thick-stemmed dodder, Kazakhstan (left), and European dodder, Russia, Moscow Oblast (top right). At the bottom right is the outlet in the center of the gall (photo by O.G. Volkov)

очаговость поражения ими повилик. Особенно наглядно она выражена тогда, когда повилика полевая сплошь покрывает значительный участок травянистой растительности: в этом случае смикрониксом обычно занята только часть этого покрова, имеющая выраженные границы, на остальном участке галлов практически нет. Такую картину мы наблюдали в Алма-Атинской области (Казахстан) на острове на реке Или у поселка Карагач и в некоторых других местах.

Наши полевые наблюдения не выявили высокой степени влияния смикроников на популяции повилик, несмотря на то, что они были обнаружены нами во всех местах сборов. Заселенность растений повилик галлами может быть очень различной, тем не менее они почти не различаются по своему развитию, срокам цветения, созревания и обилию генеративной продукции.

Не удалось попытки наладить ведение культуры *S. albopictus* на толстостебельных повиликах в теплице ВНИИКР. Всего было использовано около двух сотен слоников, выпускемых на повилику на герани (пеларгонии). Несмотря на то, что повилика находилась в разной стадии развития – от проростков до начала цветения – и наблюдались попытки спаривания слоников, ни один галл получен не был.

Одной из причин этому может быть избирательность слоником не только повилики, но и ее растения-хозяина, с которым она тесно связана физиологически. Так, мы наблюдали, что повилика полевая на дурнишнике, гречишных и марьевых бывает сплошь покрыта галлами, в то же время на этом же виде повилики на верблюжьей колючке (семейство бобовых) галлы обнаружить не удавалось. Такая же картина была отмечена нами и для толстостебельных повилик: на шиповнике галлы встречались, на молочае – нет.

Смикроники имеют своих паразитов, которыми бывает поражено 20–35% личинок. Из этих паразитов наиболее широко распространены браконид *Bracon murgabensis* Tob. Его личинку часто можно встретить в камере галла вместе с личинкой долгоносика, которую она высасывает, прикрепившись к телу. Паразитоиды оккукливаются в камерах галлов, имаго прогрызает в стенке галла более мелкое, чем личинка долгоносика, отверстие и выходит приблизительно одновременно с выходом личинок долгоносика на оккулирование. Также смикроникс поражается ихневмонидами *Aneuclis melanarius* Holm. и хальцидами *Eupelmus* sp. и *Habrocytus* sp. В низовьях реки Или отмечено поражение этого слоника хальцидой *Eurytoma* sp. n. Другие авторы (Шинкаренко, 1982a) называют более высокие цифры поражения галловых долгоносиков паразитами – до 80%.

9. Повиликовая муха *Melanagromyza cuscuteae* Hering (Diptera: Agromyzidae)

Взрослые мухи черные, с металлическим блеском, глаза красные, длина крыльев составляет 2,4–2,7 мм. Повиликовая муха широко распространена, она обнаружена нами во всех местах сборов без исключения, но поражает в основном только толстостебельные повилики.

Зимует на стадии куколки в пупарии, в плодах повилик. Вылет имаго на юге и юго-востоке Казахстана – в конце мая – начале июня (Иванников, 1969). При содержании пупариев в лаборатории

on the field dodder (Fig. 4) and up to 4–5 cm on thick-stemmed dodders (Fig. 9). In one gall, 3–4 weevil larvae can often be found, each of which is in a separate chamber. Once stopped the feeding, the larva makes a hole in the wall of the gall, leaves it and pupates in the upper layers of the soil. After the larvae emerge, the section of the dodder stem with galls dries up.

Under the conditions of the Alma-Ata region, the entire development cycle takes about a month, of which the egg stage and feeding larva stage takes about 15 days, the prepupal stage – 5–6 days, the pupa stage – about 10 days.

Apparently, due to the weak dispersal ability of weevils, the outbreak damage of dodders is clearly expressed. It is especially seen when the field dodder completely covers a significant area of herbaceous vegetation: in this case, only a part of this cover, which has pronounced boundaries, is usually occupied by *Smicronyx* spp., while there are practically no galls in the rest of the area. We observed this in the Alma-Ata region (Kazakhstan) on an island on the Ili River near the village of Karagach and in some other places.

Our field observations did not reveal a high degree of influence of *Smicronyx* spp. on the populations of dodders, despite the fact that they were detected in all collection sites. The populations of dodder plants with galls can be very different, nevertheless, they almost do not differ in their development, flowering time, ripening and abundance of generative production.

Attempts to establish the culture of *S. albopictus* on thick-stemmed dodders in the VNIIKR greenhouse failed. In total, about two hundred weevils were used, released for dodder on geranium (pelargonium). Despite the fact that the dodder was at different stages of development – from seedlings to the beginning of flowering – and attempts to mate weevils were observed, not a single gall was obtained.

One of the reasons for this may be the weevil's selectivity not only of the dodder, but also of its host plant, with which it is closely connected physiologically. So, we observed that the field dodder on cocklebur, buckwheat and haze can be completely covered with galls, at the same time, it was not possible to find galls on the same type of dodder on a camel thorn (a family of legumes). The same picture was noted for thick-stemmed dodders: galls were found on rose hips, but not on milkweed.

Smicronyx spp. have their own parasites, which affect 20–35% of larvae. Of these parasites, the most widespread is *Bracon murgabensis* Tob. Its larva can often be found in the gall chamber, along with the weevil larva, which it saps when attached to the body. Parasitoids pupate in the chambers of the galls; the imago makes a smaller hole in the gall wall than the weevil larva and emerges approximately simultaneously with the pupation of the weevil larvae. Also, *Smicronyx* spp. are affected by Ichneumonidae *Aneuclis melanarius* Holm. and Chalcidoidea *Eupelmus* sp. and *Habrocytus* sp. In the lower reaches of the Ili River, this weevil was noted to be damaged by *Eurytoma* sp. n. Other authors (Shinkarenko, 1982a) mention higher numbers of parasite infestation of gall weevils – up to 80%.



Рис. 10. Повиликовая муха *Melanagromyza cuscuteae* Hering откладывает яйца в толстостебельную повилику.
Берег реки Джабаглы.
Казахстан (фото О.Г. Волкова)

Fig. 10. *Melanagromyza cuscuteae* Hering laying eggs in a thick-stemmed dodder. Bank of the Dzhabagly River. Kazakhstan (photo by O.G. Volkov)

при плюсовой температуре вылет начинается с декабря и продолжается до июня, с основным пиком в апреле – мае. После вылета муhi проходят дополнительное питание на гуттациях на стеблях повилик, через несколько дней спариваются и откладывают яйца в стебли (рис. 10).

Первое поколение развивается внутри стеблей повилик. Через 18–20 дней личинка муhi оккулируется, предварительно приготовив отверстие для вылета имаго, еще через 10 дней появляются муhi нового поколения. Теперь самки откладывают яйца в молодые плоды повилик, личинки нового поколения развиваются внутри плодов, питаясь семенами. В 1 плоде развивается всегда только 1 личинка, которая выедает содержимое всех 3–4 семян повилик. Окуклируется она тут же, в плоде, предварительно, как и предыдущая стадия, приготовив отверстие для имаго. Пораженные плоды, высыхая, остаются на растении, в отличие от осыпающихся непораженных плодов. Количество пораженных плодов в образце могло достигать 70%, но обычно не превышало 15–20%. Учитывая, что повилики производят десятки тысяч плодов, такая техническая эффективность не оказывает существенного влияния на популяции повилик. Поражения повилик внутристеблевой стадией нами были встречены редко, личинки муhi фактически образовывали галлы, почти неотличимые от галлов повиликового долгоносика. 35–40% pupariев муhi бывают заражены паразитами, в основном хальцидами *Tetrastichus* sp. и *Eurytoma* sp. n. Любопытно, что встречается поражение личинок повиликовых муhi браконидом *Bracon murgabensis* Tob. – основным паразитоидом повиликового галлового долгоносика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

1. В результате полевых и лабораторных исследований нами на повиликах было выявлено и идентифицировано 26 видов насекомых-фитофагов.

2. Большинство выявленных фитофагов неспециализированные и способны поражать

9. *Melanagromyza cuscuteae* Hering (Diptera: Agromyzidae)

Adult flies are black with a metallic sheen, eyes are red, and wings are 2.4–2.7 mm long. This dodder fly is widespread, we found it in all collection sites, without exception, but it mainly affects only thick-stemmed dodders.

It overwinters at the pupal stage in puparia, in dodder fruits. The flight of adults in the south and southeast of Kazakhstan is in late May – early June (Ivannikov, 1969). When puparia are kept in the laboratory at above-zero temperatures, the flight begins in December and lasts until June, with the main peak in April – May. After the flight, the flies undergo additional feeding on guttations on the stems of dodders, after a few days they mate and lay eggs in the stems (Fig. 10).

The first generation develops inside dodder stems. After 18–20 days, the fly larva pupates, having previously prepared a hole for the flight of the imago; 10 more days later, flies of a new generation appear. Now the females lay eggs in young dodder fruits, the larvae of the new generation develop inside the fruits, feeding on the seeds. In 1 fruit, only 1 larva develops, which eats up the contents of all 3–4 dodder seeds. It pupates right there, in the fetus, preliminarily, like the previous stage, having prepared a hole for the imago. Affected fruits, drying out, remain on the plant, in contrast to crumbling unaffected fruits. The number of affected fetuses in a sample could reach 70%, but usually did not exceed 15–20%. Considering that dodders produce tens of thousands of fruits, this technical efficiency does not have a significant impact on dodder populations. Damage of dodder by weevil was rarely detected; larvae of flies actually formed galls, almost indistinguishable from the galls of dodder weevil. 35–40% of pupariums of flies can be infested with parasites, mainly by *Tetrastichus* sp. and *Eurytoma* sp. n. It is curious that dodder fly larvae can be affected by *Bracon murgabensis* Tob. – the main parasitoid of the dodder gall weevil.

RESULTS AND CONCLUSIONS

1. As a result of field and laboratory studies, we detected and identified 26 species of phytophagous insects on dodders.

2. Most of the identified phytophages are non-specialized and are capable of infecting plants from other families, including cultivated ones; some of the species are phytophages of plants that are hosts of dodders. Specialized phytophages of dodders (oligophages) are several species of weevils of the genus *Smicronyx* and the fly *Melanagromyza cuscuteae* Hering.

3. In the process of sufficiently extensive field studies, no dodder populations free from specialized phytophages, gall weevils of the genus *Smicronyx* and the fly *Melanagromyza cuscuteae*, were detected. Consequently, the dispersion of these phytophages in places free from them has no prospect.

4. Field observations and preliminary stationary experiments have nowhere revealed the regulatory effect of phytophages on the populations of dodders. Accordingly, there is no reason for the direct use of these phytophages in the outbreaks of parasitic plants.

и растения из других семейств, в том числе культурные, часть видов является фитофагами растений – хозяев повилик. Специализированными фитофагами повилик (олигофагами) являются несколько видов жуков-долгоносиков рода *Smicronyx* и повиликовая муха *Melanagromyza cuscuteae* Hering.

3. Обнаружить в процессе достаточно обширных полевых исследований популяции повилик, свободные от специализированных фитофагов – галловых повиликовых долгоносиков р. *Smicronyx* и повиликовой мухи *Melanagromyza cuscuteae*, – нам не удалось. Следовательно, расселение этих фитофагов в свободные от них места не имеет перспективы.

4. Полевые наблюдения и предварительные стационарные опыты нигде не выявили регулирующего воздействия фитофагов на популяции повилик. Соответственно, нет основания и для непосредственного применения этих фитофагов в очагах паразитических растений.

5. Вызывает интерес возможность использования местных специализированных фитофагов повилик в качестве переносчиков патогенов сорняка (Слепян, 1973), например спор гриба *Alternaria cuscutacidae* Rudakov.

Благодарность. За помощь в выполнении данного исследования автор выражает искреннюю благодарность всем вышеупомянутым энтомологам, идентифицировавшим собранный материал, а также: Петру Ивановичу Киму и Григорию Ивановичу Петько (Казахстан), сотрудникам Чимкентской карантинной инспекции, Ивану Олонцеву (заповедник «Аксу-Джабаглы»), Оскару Эдмундовичу Бэрю и Эдмунду Рудользовичу Гуммелю (Узбекистан), супругам Коршуновым (Нуратинский заповедник) и многим инспекторам, лесникам и егерям, помогавшим в этой работе.

Особую благодарность автор выражает бывшему начальнику отдела биологического метода ВНИИКР Сергею Сергеевичу Ижевскому, оказавшему всестороннюю помощь автору в этом и других начинаниях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Байтенов М. Жуки-долгоносики Средней Азии и Казахстана. – Алма-Ата: Изд-во «Наука» Казахской ССР, 1974, 287 с.
2. Бейлин И. Паразитизм и эпифитотиология (на примере паразитов из высших растений). – М.: Наука, 1986, 352 с.
3. Булгакова Л. Медоносы кочевого пчеловодства. – Ташкент: Мехнат, 1989, 144 с.
4. Бутков А., 1953. Семейство Повиликовые / В кн.: Флора СССР, т. XIX. – М.-Л., 43–76.
5. Волков О., 1989. Перспективы биологической регуляции повилик. – Защита растений, № 11: 18–19.
6. Волков О., 1991. Фитофаги как вероятные агенты биологической борьбы с повиликами / В кн.: Карантинные вредители, болезни и сорные растения. Сборник научных трудов, часть II. – Быково, 177–184.
7. Гиляров А.М. Экология биосфера. – М.: Издательство Московского университета, 2016, 160 с.
8. Иванников А., 1969. Мушка *Melanagromyza cuscuteae* – враг повилики в Казахстане. – Вестник сельскохозяйственной науки, № 1: 85–88.

5. Of interest is the possibility of using local specialized phytophages of dodders as vectors of weed pathogens (Slepyan, 1973), for example, fungal spores of *Alternaria cuscutacidae* Rudakov.

Acknowledgement. For help in carrying out this study, the author expresses his sincere gratitude to all the above-mentioned entomologists who identified the collected material, as well as: Peter Ivanovich Kim and Grigory Ivanovich Petko (Kazakhstan), specialists of the Chimkent quarantine inspection, Ivan Olontsev (Aksu-Dzhabagly reserve), Oskar Edmundovich Ber and Edmund Rudolfovich Gummel (Uzbekistan), the Korshunovs (Nurata Nature Reserve) and many inspectors, foresters and gamekeepers who assisted in this work.

The author expresses special gratitude to the former head of the Biological Method Department of FGBU “VNIIKR”, Sergei Sergeevich Izhevskiy, who provided comprehensive assistance to the author in this and other endeavors.

REFERENCES

1. Baytenov M. Weevils of Central Asia and Kazakhstan [Zhuki-dolgonosiki Sredney Azii i Kazakhstana]. Alma-Ata, Nauka of Kazakh SSR, 1974; 287 pp. (in Russian).
2. Beilin I. Parasitism and epiphytobiology (on the example of parasites from higher plants) [Parazitizm i epifitotobiologiya (na primere parazitov iz vysshikh rasteniy)]. M., Nauka, 1986; 352 pp. (in Russian).
3. Bulgakova L. Honey plants of nomadic bee-keeping [Medonosy kochevogo pchelovodstva]. Tashkent, Mekhnat, 1989; 144 pp. (in Russian).
4. Butkov A. Family Cuscutaceae [Semeystvo Povilikovyye]. Flora of the USSR, v. XIX. M.-L., 1953: 43–76 (in Russian).
5. Volkov O. Prospects for biological regulation of Cuscutaceae [Perspektivy biologicheskoy reguliatsii povilik]. Plant protection, 1989; 11: 18–19 (in Russian).
6. Volkov O. Phytophages as Potential Agents of Biological Control of Dodders [Fitofagi kak veroyatnyye agenty biologicheskoy bor'by s povilikami]. Quarantine pests, diseases and weeds. Collection of scientific papers, part II. Bykovo, 1991: 177–184 (in Russian).
7. Gilyarov A.M. Ecology of the biosphere [Ekologiya biosfery]. M., Moscow University Publishing House, 2016: 160 pp. (in Russian).
8. Ivannikov A. Fly *Melanagromyza cuscuteae* – enemy of dodder in Kazakhstan [Mushka *Melanagromyza cuscuteae* – vrag poveliki v Kazakhstane]. Agricultural Science Bulletin, 1969; 1: 85–88 (in Russian).
9. Ivannikov A. Dodder fly [Povilikovaya mukha]. Plant protection, 1972; 7: 23–24 (in Russian).
10. Kiseleva K., Mayorov S., Novikov V. Flora of Central Russia: Atlas-Keys [Flora sredney polosy Rossii: Atlas-opredelitel]. M., Phyton +, 2010; 544 pp. (in Russian).
11. Lazkov G., Sultanova B. Cadastre of flora of Kyrgyzstan: vascular plants [Kadastr flory Kyrgyzstana: sosudistyye rasteniya]. Norrlinia, 2011; 24: 1–166 (in Russian).
12. Lopatin I. Leaf beetles (Insecta, Coleoptera, Chrysomelidae) of Central Asia [Zhuki-listoyedy

9. Иванников А., 1972. Повиликовая муха. – Защита растений, № 7: 23–24.
10. Киселева К., Майоров С., Новиков В. Флора средней полосы России: Атлас-определитель. – М.: ЗАО «Фитон+», 2010, 544 с.
11. Лазьков Г., Султанова Б., 2011. Кадастр флоры Кыргызстана: сосудистые растения. – Norrlinia, № 24: 1–166.
12. Лопатин И. Жуки-листоеды (Insecta, Coleoptera, Chrysomelidae) Центральной Азии. – Минск: БГУ, 2010, 511 с.
13. Мариковский П., Иванников А., 1968. О перспективах биологического метода борьбы с повиликами в Казахстане. – Труды Казахского института защиты растений, т. 10. – Алма-Ата, 202–208.
14. Никитин В. Сорные растения флоры СССР. – Л.: Наука, 1983, 454 с.
15. Никитичева З., 1981. Семейство Повиликовые Cuscutaceae / В кн.: Жизнь растений, т. V, часть II. – М: Просвещение, 389–390.
16. Слепян Э. И. Патологические новообразования и их возбудители у растений: галлогенез и паразитарный тератогенез. – Л.: Наука, 1973, 512 с.
17. Сухолозова Е., Сухолозов Е., Сафонов А., 2020. Повилики естественных и антропогенно измененных сообществ Пензенской области и возможные агенты их биологического контроля. – Фитосанитария и карантин растений, № 3 (3): 52–64.
18. Твердислов В., Сидорова А., Яковенко Л. Биофизическая экология. – М.: Красанд, 2012, 544 с.
19. Файвуш Г., Таманян К. Инвазивные и экспансивные виды растений Армении. – Ереван: Институт ботаники НАН РА, 2014, 272 с.
20. Федоров А. (отв. редактор), Камелин Р. (редактор тома). Флора европейской части СССР, т. V. – Л.: Наука, 1981, 380 с.
21. Шинкаренко В., 1980. Враг повилики. – Защита растений, № 11: 44.
22. Шинкаренко В., 1982. Фитофаги повилик. – Защита растений, № 2: 29–30.
23. Шинкаренко В., 1982а. Долгоносики в борьбе с повиликами. – Защита растений, № 7: 30–31.
24. Koch M., Wir bestimmen Schmetterlinge. – Leipzig-Radebeul: Neumann Verlag, 1984, 792 p.
25. Hodge P.J., 2012. *Bruchidius imbricornis* (Panzer, 1795) (Chrysomelidae) new to the British Isles. – URL: <https://www.researchgate.net/publication/308012323> (дата обращения: 31.05.2021).
- (Insecta, Coleoptera, Chrysomelidae) Tsentralnoy Azii]. Minsk, BGU, 2010; 511 pp. (in Russian).
13. Marikovsky P., Ivannikov A. On the prospects of the biological method of combating dodders in Kazakhstan [O perspektivakh biologicheskogo metoda borby s povilikami v Kazakhstane]. *Works of the Kazakh Institute of Plant Protection*, vol. 10. Alma-Ata, 1968; 202–208 (in Russian).
14. Nikitin V. Weed plants of the flora of the USSR [Sornyye rasteniya flory SSSR]. L., Nauka, 1983; 454 pp. (in Russian).
15. Nikiticheva Z. Family Cuscutaceae [Semeistvo Cuscutaceae]. *Plant Life*. Vol. V, Part II. M., Prosveshenie, 1981; 389–390 (in Russian).
16. Slepyan E.I. Pathological neoplasms and their causative agents in plants: gallogenesis and parasitic teratogenesis [Patologicheskiye novoobrazovaniya i ikh vozбудители у растений: галлогенез и паразитарный тератогенез]. L., Nauka, 1973; 512 pp. (in Russian).
17. Sukholozova E., Sukholozov E., Safonov A. Dodders of natural and anthropogenically modified coenoses in Penza region and their possible biological control agents [Poviliki yestestvennykh i antropogenno izmenennykh soobshchestv Penzenskoy oblasti]. *PLANT Health and Quarantine*, 2020; 3 (3): 52–64 (in Russian).
18. Tverdisslov V., Sidorova A., Yakovenko L. Biophysical ecology [Biofizicheskaya ekologiya]. M., Krasand, 2012; 544 pp. (in Russian).
19. Faivush G., Tamanyan K. Invasive and expansive plant species in Armenia [Invazivnyye i ekspanativnyye vidy rasteniy Armenii]. Yerevan, Institute of Botany NAS RA, 2014; 272 pp. (in Russian).
20. Fedorov A. (executive editor), Kamelin R. (volume editor). Flora of the European part of the USSR [Flora yevropeyskoy chasti SSSR], vol. V. L., Nauka, 1981; 380 pp. (in Russian).
21. Shinkarenko V. Enemy of the dodder [Vrag poviliki]. *Plant Protection*, 1980; 11: 44 (in Russian).
22. Shinkarenko V. Phytophages of dodders [Fitofagi povilik]. *Plant Protection*, 1982; 2: 29–30 (in Russian).
23. Shinkarenko V. Weevils in the fight against dodders [Dolgonosiki v borbe s povilikami]. *Plant Protection*, 1982; 7: 30–31 (in Russian).
24. Koch M., Wir bestimmen Schmetterlinge. Leipzig-Radebeul: Neumann Verlag, 1984, 792 p.
25. Hodge P. J., 2012. *Bruchidius imbricornis* (Panzer, 1795) (Chrysomelidae) new to the British Isles. URL: <https://www.researchgate.net/publication/308012323> (last accessed: 31.05.2021).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Волков Олег Геннадьевич, начальник отдела биометода ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия;
ORCID 0000-0002-1539-0342, e-mail: volkovog@mail.ru.

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Oleg Volkov, Head of Biomethod Department, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0002-1539-0342, e-mail: volkovog@mail.ru.

Памяти товарища

11 сентября исполнилось бы 66 лет безвременно ушедшему от нас Сергею Алексеевичу Федосову – товарищу по работе и по жизни, с которым связано несколько десятков лет дружбы и сотрудничества. Улеглась первая острая боль от потери близкого человека. Осталась память о нем – его добрых делах, его яркой жизни, научных исследованиях. Остались воспоминания о его удачных высказываниях, неординарных молниеносных решениях больших и малых проблем. Эта память согревает в различных житейских ситуациях.

Сергей Алексеевич всегда трудился с большим интересом, постигал законы природы, испытывая высокую радость познания. Всю жизнь его привлекал животный мир. С юношеских лет он выращивал дома всякую живность. Затем, после окончания Московского государственного университета, стал зрелым специалистом по изучению развития живых организмов, взаимоотношений между растениями и их вредителями, используя полученные данные для разработки щадящих природу средства защиты растений.

Его разработки в области суточных ритмов остаются оригинальными и вызывают интерес среди специалистов. Диссертационная работа С.А. Федосова была связана с изучением циркадных ритмов насекомых – это слабоизученная область в биологии.

От рождения ему было свойственно жизнелюбие. Это, в свою очередь, определяло его жизненный путь и напрямую отражалось в работе, в научных исследованиях. Круг его интересов был необычайно широк. Он был неутомим и на полевых работах, и за рабочим столом, смело экспериментируя, предлагая оригинальные идеи.

Сергей Алексеевич никогда не жаловался на трудности жизни, относился с большой благодарностью и теплотой к тем, кто помогал ему, и сам никому никогда не отказывал в помощи.

После университета он 10 лет проработал во ВНИИ карантина растений, успешно защитил диссертацию. В 2000-е годы Сергей Алексеевич стал работать в области экспорта/импорта плодовоощной продукции, фитосанитарное состояние которой его интересовало и с практической точки зрения.

Спустя годы появилась возможность вернуться к исследовательской работе, и он это сделал уже как специалист высокого класса, знающий внутренние и внешние проблемы карантинной службы.



ФЕДОСОВ Сергей Алексеевич

11.09.1955–13.01.2019

Научный сотрудник Всероссийского центра карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР»)

С.А. Федосов с энтузиазмом работал в области профилактики: он предотвращал проникновение вредных организмов на территорию нашей страны, изучая их биологию, вредоносность, разрабатывая систему защитных мероприятий. Его выступления на Ученом совете всегда были содержательны и ярки. Они затрагивали не только научные проблемы, но и проблемы практиков, непосредственно занимающихся импортом/экспортом и перевозкой растительной продукции.

Не верится, что нет больше с нами этого энергичного, веселого, постоянно готового к действию, трудолюбивого, надежного товарища и коллеги. Память о нем, его добрые дела останутся в наших сердцах навсегда.

*В.Н. Жимерикин,
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»*

Здесь может быть ваша статья!

Журнал ««Фитосанитария. Карантин растений» приглашает авторов для публикации своих научных работ

Редакция журнала «Фитосанитария. Карантин растений» рада предложить вам возможность публикации ваших статей на страницах журнала. Наша цель – привлечение внимания к наиболее актуальным проблемам карантина растений специалистов сельского хозяйства и всех заинтересованных в этом людей.

В журнале рассматриваются основные направления развития науки и передового опыта в области карантина и защиты растений, публикуется важная информация о новых методах и средствах, применяемых как в России, так и за рубежом, а также о фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации.

Мы доносим до широкого круга читателей объективную научно-просветительскую и аналитическую информацию: мнения ведущих специалистов по наиболее принципиальным вопросам карантина растений, данные о значимых новейших зарубежных и отечественных исследованиях, материалы тематических конференций.

Редакция журнала «Фитосанитария. Карантин растений» приглашает к сотрудничеству как выдающихся деятелей науки, так и молодых ученых, специалистов-практиков, работающих в области фитосанитарии, для обмена опытом, обеспечения устойчивого фитосанитарного благополучия и для новых научных дискуссий.

ЗАДАЧИ ЖУРНАЛА

- Изучение основных тенденций развития науки в области карантина растений
- Анализ широкого круга передовых технологий в области мониторинга и лабораторных исследований по карантину растений
- Обсуждение актуальных вопросов карантина растений

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫМ СТАТЬЯМ

К публикации принимаются статьи на двух языках: русском и английском, содержащие результаты собственных научных исследований, объемом до 15 страниц, но не менее 3 (при одинарном интервале и размере шрифта 12). Оптимальный объем статьи – от 1500 слов. Статьи большего объема могут быть приняты по согласованию с редакцией журнала.

СТРУКТУРА ПРЕДОСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ*

1. УДК, название статьи.
2. Инициалы, фамилия автора.
3. Место работы автора, город, страна, ORCID ID, адрес электронной почты.
4. Аннотация (краткое точное изложение содержания статьи, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): 200–250 слов, но не более 2000 знаков с пробелами.
5. Ключевые слова (5–10 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи.
6. Введение.
7. Материалы и методы.
8. Результаты и обсуждения.
9. Выводы/заключение.
10. Список литературы (т. е. список всей использованной литературы, ссылки на которую даются в самом тексте статьи): правила составления направляются автору по запросу.
11. Информация об авторах: приводится полная информация о каждом из авторов (место работы, город, страна, ORCID ID, адрес электронной почты).
12. Иллюстративные материалы (фотографии, рисунки) допускаются хорошей контрастности, с разрешением не ниже 300 точек на дюйм (300 dpi), оригиналы прикладываются к статье отдельными файлами в формате .tiff или .jpeg (иллюстрации, не соответствующие требованиям, будут исключены из статей, поскольку достойное их воспроизведение типографским способом невозможно). Необходимо указать авторство каждой фотографии (Ф. И. О. фотографа или ссылку).
13. В редакцию необходимо предоставить две рецензии на статью («внешнюю» и «внутреннюю»).

* В таком же порядке и структуре предоставляется англоязычный перевод статьи.

Работа должна быть представлена в редакторе WORD, формат DOC, шрифт Times New Roman, размер шрифта – 12, межстрочный интервал – одинарный, размер полей по 2 см, отступ в начале абзаца 1 см, форматирование по ширине. Рисунки, таблицы, схемы, графики и пр. должны быть обязательно пронумерованы, иметь источники и помещаться на печатном поле страницы. Название таблицы – над таблицей; название рисунка/графика – под рисунком/графиком.

БОЛЕЕ ПОДРОБНЫЕ УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ СТАТЕЙ ВЫ МОЖЕТЕ УЗНАТЬ В НАШЕЙ РЕДАКЦИИ:

Адрес: 140150, Россия, Московская область, г. Раменское, р. п. Быково, ул. Пограничная, д. 32

Контактное лицо: Зиновьева Светлана Георгиевна

Телефон: 8 (499) 707-22-27, e-mail: zinoveva-s@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»)



– Научное и методическое обеспечение деятельности Россельхознадзора, его территориальных управлений и подведомственных ему учреждений в сфере карантина и защиты растений

– Установление карантинного фитосанитарного состояния подкарантинных материалов и территории Российской Федерации путем проведения лабораторных экспертиз и мониторингов

– Научное сотрудничество с национальными и международными организациями в области карантина растений

- Ведущее учреждение в Российской Федерации по синтезу и применению феромонов для выявления карантинных и некарантинных вредителей и борьбы с ними
- ФГБУ «ВНИИКР» – партнер международной программы по координации научных исследований в области карантина растений EUPHRESCO II (EUropean PHytosanitary RESearch COordination)
- В ФГБУ «ВНИИКР» создан и действует Технический комитет по стандартизации ТК 42 «Карантин и защита растений»
- Ведущее научно-методическое учреждение в составе Координационного совета по карантину растений государств – участников СНГ
- 19 филиалов на территории Российской Федерации
- Головное научно-методическое учреждение по реализации Плана первоочередных мероприятий, направленных на гармонизацию карантинных фитосанитарных мер государств – членов Таможенного союза

140150, Россия,
Московская область,
г. Раменское, р. п. Быково,
ул. Пограничная, д. 32
Тел./факс:
8 (499) 707-22-27
e-mail: office@vniikr.ru
<http://www.vniikr.ru>