



Международные
стандарты
по фитосанитарным
мерам

2

Головневые
грибы рода
Tilletia

40

Рябина как растение –
хозяин возбудителя
бактериального
ожога плодовых

46

ПЦР
для диагностики
черной ножки
картофеля

65

ФИТОСАНИТАРИЯ. КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

PLANT HEALTH AND QUARANTINE

Свидетельство
о регистрации СМИ ПИ
№ ФС 77-76606

Русско-английский научный журнал

Декабрь № 4 (4) 2020

СТАТЬЯ НОМЕРА:

Карпологические коллекции

14

Новое в морфологии
суринамского мукоеда

23

Оптимизация подхода
к выявлению нематод
рода *Heterodera*

30



Фото: Robert Przybysz / shutterstock

Редакционная коллегия Editorial board

главный редактор:

Д.Ф. ЗИННИКОВ, и. о. директора ФГБУ «ВНИИКР»

ШЕФ-РЕДАКТОР:

С.Г. ЗИНОВЬЕВА, начальник отдела по связям с общественностью и СМИ ФГБУ «ВНИИКР»

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

РЕДАКЦИЯ

Г. Н. БОНДАРЕНКО – 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 – старший научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», кандидат биологических наук
О.А. КУЛИНИЧ – начальник отдела лесного карантина ФГБУ «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 – кандидат филологических наук, переводчик
В.В. ЧЕРЕПАНОВА – редактор-корректор ФГБУ «ВНИИКР»

CHIEF EDITOR:

D.F. ZINNIKOV, Acting Director of FGBU “VNIIKR”

MANAGING EDITOR:

S.G. ZINOVEVA, Head of the Public Relations and Mass Media Department of FGBU “VNIIKR”

EDITORIAL BOARD

YU.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 “VIZR”, 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
Y.A. SCHNEYDER – Head of Scientific Methodological and Experimental Center of FGBU “VNIIKR”, PhD in Biology

EDITORSHIP

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 – Senior Researcher of the Scientific and Methodological Department of Virology and Biology 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 – PhD in Philology, Translator
V.V. CHEREPANOVA – Copy Editor of FGBU “VNIIKR”

Содержание Content

ФАО ИНФОРМИРУЕТ

Международные стандарты по фитосанитарным мерам
СЕКРЕТАРИАТ МККЗР

FAO INFORMS

International Standards for Phytosanitary Measures
IPPC SECRETARIAT

2

КОЛЛЕКЦИИ

Карпологические коллекции сорных видов растений: современное состояние и перспективы развития
Ю.Ю. КУЛАКОВА

COLLECTIONS

Carpological Collections of Weed Plants: Modern Status and Development Prospects
Y.Y. KULAKOVA

14

НАУЧНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Новые данные о морфологии суринамского мукоеда *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae)
С.А. КУРБАТОВ

New Data on the Morphology of the Saw-Toothed Grain Beetle *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae)
S.A. KURBATOV

23

Оптимизированный подход к выявлению нематод рода *Heterodera* и карантинного вида *Heterodera glycines*
А.В. ИВАНОВ, С.В. СУДАРИКОВА, Е.А. ХУДЯКОВА

Optimized Approach for the Detection of *Heterodera* spp. and the Quarantine Species *Heterodera glycines*
A.V. IVANOV, S.V. SUDARIKOVA, E.A. KHUDYAKOVA

30

Головневые грибы рода *Tilletia* в фитосанитарных требованиях стран – импортеров российского зерна
Д.А. УВАРОВА, Т.А. СУРИНА

Smut Fungi of the Genus *Tilletia* in Phytosanitary Requirements of Russian Grain Importing Countries
D.A. UVAROVA, T.A. SURINA

40

Рябина (*Sorbus* spp.) как потенциальное растение – хозяин возбудителя бактериального ожога плодовых культур (*Erwinia amylovora*) в Российской Федерации
Н.В. ДРЕНОВА, М.О. КОНДРАТЬЕВ, А.А. ХАРЧЕНКО, Ю.С. ЦЫМБАЛ, Е.А. СУХОЛОЗОВА, Н.А. КВАШНИНА, Ф.С. ДЖАЛИЛОВ

Mountain-Ash (*Sorbus* spp.) as a Potential Host Plant of Fire Blight (*Erwinia amylovora*) in the Russian Federation
N.V. DRENOVA, M.O. KONDRATYEV, A.A. KHARCHENKO, YU.S. TSYMBAL, E.A. SUKHOLOZOVA, N.A. KVASHNINA, F.S. DZHALILOV

46

Использование ПЦР-систем для диагностики возбудителей бактериоза черная ножка картофеля
А.И. УСКОВ, И.В. ШМЫГЛЯ, А.А. СТАХЕЕВ, С.К. ЗАВРИЕВ, Ю.А. ВАРИЦЕВ, П.А. ГАЛУШКА, Н.В. СУСЛОВА

Using PCR Systems for the Diagnosis of Potato Blackleg Agents
A.I. USKOV, I.V. SHMYGLYA, A.A. STAKHEEV, S.K. ZAVRIYEV, Y.A. VARITSEV, P.A. GALUSHKA, N.V. SUSLOVA

65

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
Дизайн и верстка: Мария Бондарь
Учредитель: ФГБУ «ВНИИКР», 140150, Московская область, г. Раменское, р. п. Быково, ул. Пограничная, д. 32
Издатель: ООО «Вейнард»
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: 14 декабря 2020 г.
Дата выхода в свет: 21 декабря 2020 г.

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.
Design & Composition: Mariya Bondar
Establisher: FGBU VNIIKR, 140150, Moskovskaya oblast, Ramenskoye, g. p. Bykovo, Pogranichnaya ulitsa, 32
Publisher: ООО “Veynard”
Editorial Board Office:
Tel: +7 (495) 925-06-34

E-mail: veinardltd@gmail.com
Subscription indexes:
AO 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: 14/12/2020
Issue date: 21/12/2020



Международные стандарты по фитосанитарным мерам

ЗАЩИТИМ РАСТЕНИЯ – СОХРАНИМ ЖИЗНЬ

Знаете ли вы, что МСФМ – это единственные международные стандарты, посвященные здоровью растений?

Международные стандарты по фитосанитарным мерам (МСФМ) – это международные инструменты, которые члены Всемирной торговой организации (ВТО) признают в качестве международных эталонов в части, касающейся торговли растительными товарами. Эти стандарты применяются при международной торговле в рамках Соглашения по применению санитарных и фитосанитарных мер (Соглашения по СФС).

Международная конвенция по карантину и защите растений (МККЗР) – единственная признанная на международном уровне стандартоустанавливающая конвенция в области здоровья растений.

Эти стандарты также вносят вклад в реализацию Повестки дня Организации Объединенных Наций (ООН) в области устойчивого развития на период до 2030 года и Целей ООН в области устойчивого развития.



Роль МСФМ

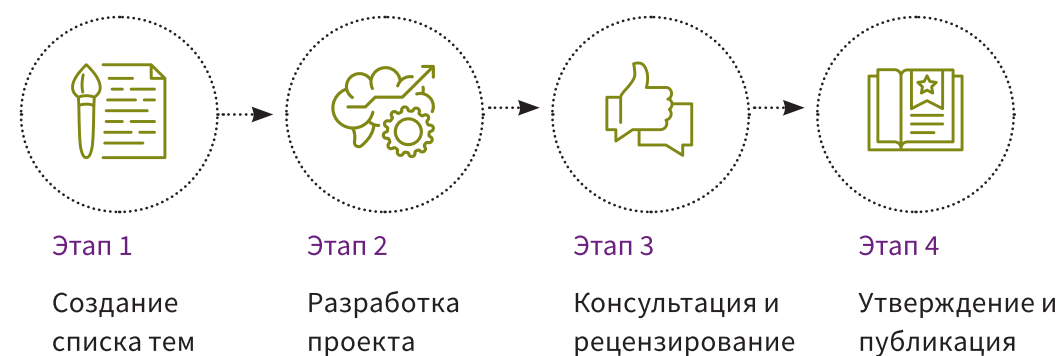
МККЗР и МСФМ имеют фундаментальное значение для международной гармонизации фитосанитарных мер и популяризации глобального сотрудничества, направленного на содействие безопасной торговле. Они способствуют:

- ♦ предотвращению интродукции и акклиматизации вредных для растений организмов;
- ♦ защите фермерских хозяйств от очагов вредных организмов, приводящих к тяжелым экономическим последствиям;
- ♦ предотвращению ущерба для окружающей среды и защите экосистем;
- ♦ защите отраслей производства и потребителей от расходов на борьбу с вредными организмами или на их ликвидацию;
- ♦ упрощению процедур международной торговли.

Самый прозрачный и беспристрастный процесс разработки и утверждения стандартов

МСФМ разрабатывают международные эксперты, и до утверждения Комиссией по фитосанитарным мерам (КФМ) по ним проводятся консультации.

Процесс разработки и утверждения стандартов курирует Комитет КФМ по стандартам и обеспечивает Группа Секретариата МККЗР по разработке стандартов.



Ценные примеры МСФМ в действии...

КАКИМ ОБРАЗОМ ВЫ ДОКУМЕНТАЛЬНО ПОДТВЕРЖДАЕТЕ, ЧТО РАСТИТЕЛЬНЫЕ ПРОДУКТЫ СООТВЕТСТВУЮТ ТРЕБОВАНИЯМ?

- МСФМ 12 описывает процесс сертификации, при этом электронная фитосанитарная сертификация – это следующий шаг, позволяющий сделать его более эффективным

ГАРМОНИЗИРОВАННЫЕ ПРИНЦИПЫ АНАЛИЗА ФИТОСАНИТАРНОГО РИСКА (АФР)

- В МСФМ 2 приводится структура процесса АФР
- В МСФМ 11 и МСФМ 21 описаны три этапа проведения АФР

НИКАКИХ ЗАСОΡЯЮЩИХ ВРЕДНЫХ ОРГАНИЗМОВ НА ДЕРЕВЯННЫХ ПОДДОНАХ!

- В МСФМ 15 приводятся способы удаления опасных вредных организмов, перемещающихся с древесными упаковочными материалами.



ПРИНИМАЙТЕ УЧАСТИЕ!

- » Принимайте участие в работе редакционных и технических групп экспертов.
- » Взаимодействуйте со своими национальной и региональной организациями по карантину и защите растений.
- » Принимайте участие в работе Комиссии по фитосанитарным мерам.

МЫ ХОТИМ, ЧТОБЫ ВЫ ДАЛИ О СЕБЕ ЗНАТЬ!

- » Предлагайте темы (раз в два года) и фитосанитарные обработки (на постоянной основе).
- » Участвуйте в консультациях по проектам спецификаций к стандартам.
- » Участвуйте в консультациях по проектам стандартов.

ВНЕСИТЕ СВОЙ ВКЛАД!

- » Окажите финансовую поддержку разработке проекта стандарта.
- » Окажите финансовую поддержку работе редакционной группы экспертов.
- » Профинансируйте конкретный проект.
- » Окажите содействие переводу документов на языки ФАО.
- » Предоставьте Секретариату МККЗР людские ресурсы.

СТРАНИЦА, ПОСВЯЩЕННАЯ РАЗРАБОТКЕ СТАНДАРТОВ



СОЦИАЛЬНЫЕ СЕТИ

- » Twitter: @ippcnews
- » Facebook: ippcheadlines
- » LinkedIn: groups/3175642

СВЯЗЬ С НАМИ!

Секретариат МККЗР
Продовольственная
и сельскохозяйственная
организация Объединенных Наций

Viale delle Terme di Caracalla 00153
Rome, Italy

Эл. почта: ippc@fao.org
Сайт: www.ippc.int



Отдел производства стандартов
Секретариата МККЗР

Аветик Нерсисян
Avetik.Nersisyan@fao.org

Адриана Морейра
Adriana.Moreira@fao.org

Артур Шамилов
Artur.Shamilov@fao.org

Ифа Кассин
Aoife.Cassin@fao.org

Янка Киш
Janka.Kiss@fao.org

Эдгар Мушегян
Edgar.Mushegyan@fao.org

Алехандра Табарес
Alejandra.JimenezTabares@fao.org

Аиша Дель Греко
Aixa.DelGreco@fao.org



International Standards for Phytosanitary Measures

PROTECTING PLANTS, PROTECTING LIFE

Did you know that the ISPMs are the only international standards dedicated to plant health?

International Standards for Phytosanitary Measures (ISPMs) are international instruments, recognized by the members of the World Trade Organization (WTO) as international benchmarks for trade in plant commodities. These standards are applied in international trade under the Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures (the SPS Agreement).

The International Plant Protection Convention (IPPC) is the only internationally recognized standard setting convention for plant health.

Standards also contribute to the United Nations (UN) 2030
Agenda for Sustainable Development and the UN Sustainable
Development Goals.



The role of ISPMs

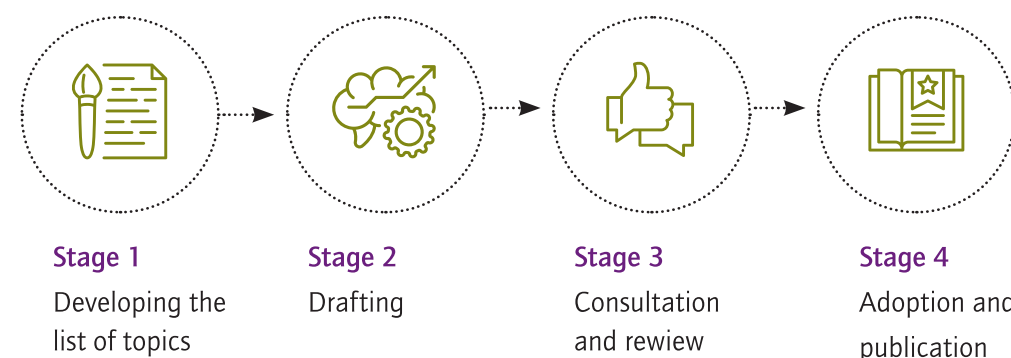
The IPPC and ISPMs are essential in the international harmonization of phytosanitary measures and in the promotion of global cooperation on the facilitation of safe trade. They help to:

- ♦ prevent the introduction and establishment of plant pests;
- ♦ protect farmers from economically devastating pest outbreaks;
- ♦ prevent damage to the environment and protect ecosystems;
- ♦ protect industries and consumers from the costs of pest control or eradication;
- ♦ facilitate international trade.

The most transparent and inclusive standard setting process

ISPMs are drafted by international experts and go through a consultation process before being adopted by the Commission on Phytosanitary Measures (CPM).

The standard setting process is overseen by the CPM Standards Committee and facilitated by the IPPC Secretariat's Standard Setting Unit.



Valuable examples of ISPMs in action...

HOW DO YOU CERTIFY THAT PLANT PRODUCTS COMPLY WITH REQUIREMENTS?

- ISPM 12 describes the certification process and ePhyto is the next step to make it more efficient.

HARMONIZED PRINCIPLES OF PEST RISK ANALYSIS (PRA)

- ISPM 2 provides a framework for the PRA process.
- ISPM 11 and ISPM 21 describe the three stages of conducting PRA.

NO HITCH-HIKERS ON WOOD PALLETS!

- ISPM 15 provides solutions to remove dangerous pests travelling with wood packaging material.

GET INVOLVED!

- » Participate in expert drafting groups and technical panels.
- » Engage with your national and regional plant protection organization.
- » Attend the Commission on Phytosanitary Measures.

WE WANT TO HEAR FROM YOU!

- » Submission of topics (every two years) and treatments continuously.
- » Consultations on draft specifications for standards.
- » Consultations on draft standards.

CONTRIBUTE!

- » Sponsor the development of a draft standard.
- » Sponsor an expert drafting group.
- » Fund a specific project.
- » Contribute to translation of documents into FAO languages.
- » Provide human resources to the IPPC Secretariat.

STANDARD SETTING PAGE



SOCIAL MEDIA

- » Twitter: @ippcnews
- » Facebook: ippcheadlines
- » LinkedIn: groups/3175642

CONTACT US!

IPPC Secretariat
Food and Agriculture
Organization of the
United Nations
Viale delle Terme di Caracalla
00153 Rome, Italy
Email: ippc@fao.org
Website: www.ippc.int



IPPC SECRETARIAT STANDARD SETTING UNIT

Mr Avetik NERSISYAN
Avetik.Nersisyan@fao.org

Ms Adriana G. MOREIRA
Adriana.Moreira@fao.org

Mr Artur SHAMILOV
Artur.Shamilov@fao.org

Ms Aoife CASSIN
Aoife.Cassin@fao.org

Ms Janka KISS
Janka.Kiss@fao.org

Mr Edgar Mushegyan
Edgar.Mushegyan@fao.org

Ms Alejandra JIMENEZ TABARES
Alejandra.JimenezTabares@fao.org

Ms Aixa DEL GRECO
Aixa.DelGreco@fao.org

Карпологические коллекции сорных видов растений: современное состояние и перспективы развития

Ю.Ю. КУЛАКОВА

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия;
e-mail: thymus73@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Карпологические коллекции являются базовым инструментом для ведения полноценных научных исследований по изучению строения плодов и семян растений различных таксономических групп, выявлению диагностических признаков, необходимы в проведении лабораторных герботологических исследований. Правильно организованный сбор семян/плодов в природе и дальнейший учет коллекционных материалов являются залогом выполнения качественной научной и прикладной деятельности по герботологии.

Ключевые слова. Карпология, карпологическая коллекция, плоды, семена, сорные растения, карантинные виды, герботологические исследования, идентификация.

Благодарность. Автор выражает искреннюю признательность Е.А. Сухолозовой, С.Е. Агеевой и О.А. Котовой за значимые замечания и советы, связанные с оценкой засоренности и частотой встречаемости некоторых видов сорных растений в образцах зерна пшеницы; рецензентам Т.В. Эбель и Е.В. Разумовой за конструктивные предложения и ценные дополнения, сделанные в процессе подготовки и редактирования статьи.

Для корреспонденции. Кулакова Юлиана Юрьевна, кандидат биологических наук, начальник – ведущий научный сотрудник научно-методического отдела инвазивных видов растений ФГБУ «ВНИИКР», 140150, Россия, Московская обл., г. Раменское, р. п. Быково, ул. Пограничная, 32, e-mail: thymus73@mail.ru.



Общеизвестно, что плоды цветковых растений чрезвычайно разнообразны по строению, окраске, форме. Все это разнообразие изучает

Carpological Collections of Weed Plants: Modern Status and Development Prospects

Y.Y. KULAKOVA

All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU "VNIICR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia;
e-mail: thymus73@mail.ru

ABSTRACT

Carpological collections are a basic tool for conducting comprehensive research on the structure of fruits and seeds of different taxonomic groups of plants, and for identifying diagnostic characteristics; they are essential for laboratory herbological studies in Plant Quarantine. A properly organized collection of seeds/fruits in nature and a further recording of the collection materials are a cornerstone to quality research and applied activities in herbology.

Keywords. Carpology, carpological collection, fruits, seeds, weed plants, quarantine species, herbological studies, identification.

Acknowledgement. The author expresses sincere gratitude to E.A. Sukholozova, S.E. Ageeva and O.A. Kotova for important comments and advice related to the assessment of infestation and frequency of occurrence of certain weed plant species in wheat grain samples; to the reviewers T.V. Ebel and E.V. Razumova for constructive suggestions and valuable additions made during the preparation and editing of the article.

For correspondence. Yuliana Kulakova, PhD in Biology, Head and Leading Researcher of the Research and Methodology Department of Invasive Plant Species of the FGBU "VNIICR", 140150, Russia, Moscow region, Ramenskoye, Bykovo, Pogranichnaya str. 32, e-mail: thymus73@mail.ru.

Fruits of flowering plants are extremely diverse in structure, colour and shape. Carpology, a special section of botany, studies the diversity of fruits. One of the tasks of carpology

карпология – специальный раздел ботаники. Одной из задач карпологии является изучение особенностей морфологического строения и генезиса плодов и семян различных групп растений [1, 2, 3, 4, 5, 6].

В России карпологическое направление получило развитие в XIX веке на базе Московского университета, где благодаря научной деятельности Г.Ф. Гофмана, Б.М. Козо-Полянского, С.Ю. Липшица, Н.Н. Кадена и многих других ученых были проведены серьезные научные исследования, опубликованы многочисленные труды, руководства, пособия по классификации плодов и семян различных семейств и собраны огромные коллекции образцов со всего мира [7]. Значительная по объему и видовой представленности карпологическая коллекция находится в Ботаническом музее Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (более 36 тыс. образцов). А самая богатая в мире коллекция культурных растений принадлежит Федеральному исследовательскому центру «Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова» (более 250 тыс. образцов).

Всероссийский центр карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР») с момента своего создания и на протяжении десятков лет проводит работы по сбору семян и плодов сорных растений. В фондах института сохранились старейшие коллекции и уникальные образцы семян, которые были получены в ходе обмена опытом с иностранными коллегами и поездок в зарубежные страны.

За последние годы сотрудники ФГБУ «ВНИИКР» участвовали в полевых выездах в различные страны мира: Аргентину, Вьетнам, Индонезию, Китай, Кению, Колумбию, Мексику, Перу, Чили, Узбекистан, Южную Корею, Японию и др.; проводили сборы сорных растений в условиях их естественного ареала или в местах успешной акклиматизации. Собранные образцы растений существенно дополнили коллекционные фонды института. Важным способом получения семян и плодов сорных растений стали поездки по территории Российской Федерации.

Необходимо отметить значительный вклад отдельных сотрудников института в пополнение коллекции: Д.Г. Касаткина, Т.В. Эбель, Д.Л. Белкина, С.Ю. Муханова, К.А. Гребенникова, И.О. Камаева, Е.А. Сухолозовой, Н.М. Атанова, Е.В. Разумовой, Я.Н. Коваленко, Ю.А. Ловцовой, К.П. Корнева и др.

Так, в 2019 г. в коллекцию поступили уникальные образцы растений: гербарий и семена стриги египетской *Striga hermonthica* (Delile) Benth., собранные в Кении (Я. Коваленко, С. Муханов, Н. Цинкевич); семена паслена каролинского *Solanum carolinense* L. (К. Гребенников, С. Муханов); образцы инвазивных видов пасленов подрода *Leptostemonum*, черед и ипомей из Вьетнама и Танзании (Д.Г. Касаткин) (рис. 1–2).

На сегодняшний день карпологическая коллекция аннотированных образцов, созданная в отделе инвазивных видов растений, включает 531 образец. Из них видовая принадлежность установлена для 109 видов, относящихся к 40 родам, 9 семействам цветковых растений (Asteraceae, Poaceae, Solanaceae, Convolvulaceae, Orobanchaceae, Polygonaceae, Euphorbiaceae, Papaveraceae, Malvaceae). Наиболее полно представлены образцами растения, включенные в Единый перечень

is to study the morphological structure and genesis of fruits and seeds of different plant groups [1, 2, 3, 4, 5, 6].

In Russia, carpology developed in the 19th century on the basis of the Moscow State University, where G.F. Goffman, B.M. Kozo-Polianski, S.I. Lipshits, N.N. Kaden and many other researchers carried out important studies, where numerous works, guides, manuals on the classification of fruits and seeds of different families were published, and huge collections of specimens from around the world were collected [7]. A significant carpological collection in terms of volume and species representation is located in the Komarov Botanical Museum of the Botanical Institute of the Russian Academy of Sciences (more than 36,000 specimens). And the richest collection of cultivated plants in the world belongs to the Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources of the Russian Academy of Sciences (over 250,000 specimens).

The All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU "VNIICR") has been collecting seeds and fruits of weeds for decades since its establishment. The institute's funds have preserved the oldest collections and unique seed specimens, which were obtained through the exchange of experience with foreign colleagues and trips to other countries.

In recent years, employees of FGBU "VNIICR" have participated in field trips to various countries: Argentina, Vietnam, Indonesia, China, Kenya, Colombia, Mexico, Peru, Chile, Uzbekistan, South Korea, Japan, etc.; they have collected weed plants in their natural habitat or in places of their successful establishment. The collected plant specimens have greatly enhanced the institute's collection funds. Trips within the Russian Federation have become an important way of obtaining seeds and fruits of weed plants.

The significant contribution of the institute's certain specialists to the collection should be noted: D.G. Kasatkin, T.V. Ebel, D.L. Belkin, S.Yu. Mukhanov, K.A. Grebennikov, I.O. Kamayev, E.A. Sukholozova, N.M. Atanov, E.V. Razumova, Ya.N. Kovalenko, Yu.A. Lovtsova, K.P. Kornev, etc.

In 2019, the collection received some unique plant specimens: a herbarium and the seeds of purple witchweed *Striga hermonthica* (Delile) Benth., collected in Kenya (Ya. Kovalenko, S. Mukhanov, N. Tsinkevich); the seeds of bull nettle *Solanum carolinense* L. (K. Grebennikov, S. Mukhanov); the specimens of invasive solanaceous species of the subgenus *Leptostemonum*, beggarticks and morning glory from Vietnam and Tanzania (D.G. Kasatkin) (Fig. 1–2).

To date, the carpological collection of the mentioned specimens created in the Department of Invasive Plant Species includes 531 specimens. Among others, it consists of 109 identified species belonging to 40 genera and 9 families of flowering plants (Asteraceae, Poaceae, Solanaceae, Convolvulaceae, Orobanchaceae, Polygonaceae, Euphorbiaceae, Papaveraceae and Malvaceae). The most fully represented plants are those included in the Common List of Plant Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union and those belonging to the genera *Cenchrus* spp. (102), *Bidens* spp. (49), *Solanum* spp. (59), *Ipomoea* spp. (32),



Рис. 1. Сбор плодов паслена острейшего в Танзании (старший научный сотрудник Ростовского филиала к. б. н. Д.Г. Касаткин) (фото Д.А. Кулешова)

Fig. 1. Collection of cockroach berry fruits from Tanzania (senior researcher of the Rostov branch D.G. Kasatkin, PhD in Biology) (photo by D.A. Kuleshov)

карантинных объектов ЕАЭС и принадлежащие родам *Cenchrus* spp. (102 образца), *Bidens* spp. (49), *Solanum* spp. (59), *Ipomoea* spp. (32), *Ambrosia* spp. (12). Все образцы регистрируются в базе данных с указанием следующей информации: географических координат места сбора, названия ближайшего населенного пункта или урочища (иногда приводится номер автостреды), даты сбора, фамилии сборщика, формы хранения образца в коллекции (например, пробирка объемом 15 мл) и условий хранения (RT или +4 C°) (рис. 3–4).

В 2017 г. был построен и начал работу карантинный интродукционный участок в Республике Крым (Крымский филиал ФГБУ «ВНИИКР», г. Симферополь), где проводятся исследования по изучению роста и развития чужеродных видов растений, прикладные работы по их размножению, ведется формирование интродукционного гербария и банка семян [8]. Эти материалы регулярно пополняют коллекцию института и используются для проведения туров межлабораторных сличительных испытаний.

Одной из насущных прикладных задач современной карпологии является создание удобной и детализированной научно-прикладной системы для определения плодов и семян сорных растений. Эта система должна обеспечивать наличие детальных описаний, определительных ключей и валидированных диагностических протоколов по сорным видам растений, содержать качественные изображения (фотографии с высоким разрешением и черно-белые рисунки) плодов, семян и их частей, с указанием диагностических признаков,



Рис. 2. Сбор плодов паслена гулявниколистного в Иране (старший научный сотрудник Ростовского филиала к. б. н. Д.Г. Касаткин) (фото С.С. Какунина)

Fig. 2. Collection of dense-thorned bitterapple fruits from Iran (senior researcher of the Rostov branch D.G. Kasatkin, PhD in Biology) (photo by S.S. Kakunin)

Ambrosia spp. (12). All specimens are registered in a database with the following information: geographical coordinates of the collection site, the name of the nearest settlement or landmark (sometimes it is the highway number), the date of collection, the name of the collector, the form of specimen storage in the collection (e. g. 15 ml tube) and storage conditions (RT or +4 C°) (Fig. 3–4).

In 2017, a quarantine introduction site was built and began its operation in the Republic of Crimea (Crimean branch of FGBU «VNIIEKR», Simferopol), where researchers study the growth and development of alien plant species, conduct applied work on their reproduction, and form an introduction herbarium and seed bank [8]. These materials are regularly added to the institute's collection and used for rounds of inter-laboratory comparison tests.

One of the urgent applied tasks of modern carpo-logy is the creation of a convenient and detailed scientific and applied system for the determination of fruits and seeds of weed plants. This system should contain detailed descriptions, identification keys and validated diagnostic protocols for weed plant species, as well as quality images (high-resolution photographs and black-and-white drawings) of fruits, seeds and their parts, with the indication of diagnostic characteristics that make it possible to distinguish morphologically similar species. Such a system will be in great demand

позволяющих отличать морфологически близкие виды. Такая система будет чрезвычайно востребована специалистами испытательных лабораторий в области фитосанитарии и качества зерна и зернопродуктов, агрономами, семеноводами, студентами сельскохозяйственных и биологических специальностей.

В настоящее время существует множество справочных изданий и атласов, позволяющих определять семена сорных растений. В деятельности карантинных лабораторий получили широкое признание и используются следующие издания: справочное пособие В.Н. Доброхотова «Семена сорных растений» [9]; «Атлас плодов и семян сорных и ядовитых растений, засоряющих подкарантинную продукцию» Е.М. Волковой [10]; «Атлас семян и плодов» Г.П. Москаленко, Б.И. Юдина [11], «Сорные растения СССР» [12].

Широкие возможности в определении растений и их семян предоставляют интернет-ресурсы, например: «Информационная система идентификации растительных объектов на основе карпологических, палинологических и анатомических данных МГУ» [13], сайт Канадского агентства продовольственной инспекции [14], «Цифровой атлас семян» [15], интерактивный определитель семян Q-bank [16].

Многие лаборатории используют базовую коллекцию семян сорных растений флоры СССР, включающую 420 видов. В ней достаточно полноценно представлены основные виды сеgetальных растений. И, несмотря на отдельные выявленные случаи пересортицы, она весьма репрезентативна и часто является единственным подспорьем в работе гербологов.

Однако приходится признать, что всего этого уже недостаточно для выполнения гербологических исследований.

В существующей практике специалистов испытательных лабораторий и референтных центров Россельхознадзора видовой состав сорных растений, выявляемых в образцах подкарантинной продукции, достаточно обширен, часто зависит от природно-климатических особенностей региона происхождения продукции, принятой схемы защиты посевов, степени очистки и пр. На современном этапе необходимо



Рис. 3. Коллекция семян сорных видов растений, засоряющих зерно пшеницы (60 ячеек, пробирка Флоринского; коллекция разработана специалистами Ростовского филиала ФГБУ «ВНИИКР») (фото Ю.Ю. Кулаковой)

Fig. 3. Seeds collection of weed plant species contaminating wheat grain (60 slots, Florinsky test tube; the collection was created by the specialists from the Rostov branch of FGBU «VNIIEKR») (photo by Y.Y. Kulakova)

by specialists of testing laboratories in the field of phytosanitary and quality of grain and grain products, agronomists, seed growers and students of agricultural and biological specialties.

At present, there are many reference books and atlases that make it possible to identify weed plant seeds. The following publications are widely recognized and used in the activities of quarantine laboratories: Weed Plant Seeds by V.N. Dobrokhotov [9]; Atlas



Рис. 4. Варианты единиц хранения семян/плодов сорных растений (фото Ю.Ю. Кулаковой)

Fig. 4. Options of storage units for weed plant seeds/fruits (photo by Y.Y. Kulakova)

идентифицировать не только часто встречающиеся в продовольственных и фуражных партиях зерновых и технических культур семена сорной примеси (*Avena fatua* L., *Convolvulus arvensis* L., *Fallopia convolvulus* (L.) Á. Löve, *Galium aparine* L., *Chenopodium album* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Delphinium consolida* L., *Lappula squarrosa* (Retz.) Dumort., *Thlaspi arvense* L., *Euphorbia virgata* Waldst. & Kit., *Setaria pumila* (Poir.) Roem. & Schult., *Polygonum scabrum* Moench, *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch. Bip., *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. и др.), но и менее распространенные виды сорняков, которые периодически обнаруживаются в тех или иных видах зерновой продукции (*Echium vulgare* L., *Fumaria officinalis* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Stachys annua* (L.) L., *Corispermum declinatum* Stephan ex Iljin, *Bifora radians* M. Bieb., *Cichorium intybus* L., *Linaria vulgaris* Mill., *Rumex crispus* L., *Sinapis arvensis* L., *Viola arvensis* Murr., *Arctium lappa* L., *Camelina microcarpa* Andr. ex DC., др.).

Некоторые виды невозможно идентифицировать только по внешнему строению семян, и требуется проведение детальных анатомических исследований. Общеизвестно, что семена пасленов разных видов могут быть очень схожи, но отличимы друг от друга по характеру утолщений стенок эндотесты. Плоды сложноцветных трибы Cynareae (*Cirsium*, *Carduus*, *Onopordum*, etc.) и Cichorieae (*Tragopogon*, *Cichorium*, *Crepis*) содержат видоспецифичные признаки на уровне семенной кожуры, а не околоплодника [17, 18, 19, 20, 21]. Идентификация плодов/семян некоторых злаков, зонтичных, крестоцветных, гречишных часто вызывает определенные затруднения [22].

Более того, выполнение фитосанитарных требований стран – импортеров российской зерновой продукции требует знаний о присутствии тех или иных видов растений на территории нашей страны и, собственно, наличия изображений их семян. Предварительно составленный список сорных растений включает около 60 видов, чье присутствие в составе подкарантинных партий для экспортных целей недопустимо. В этом списке есть растения, которые имеют ограниченное (иногда локальное) распространение на территории РФ, также не всегда являются собственными, или полевыми, сорняками и, если даже присутствуют на полях, очень редко попадают в продукцию, как, например, *Coronopus didymus* (L.) Sm., *Conringia orientalis* (L.) Dumort., *Turgenia latifolia* (L.) Hoffm.

Значительной проблемой при выполнении фитосанитарных требований являются таксономические разногласия в понимании объема одного и того же таксона сорного растения между 2 странами – отправителем и получателем груза,

of Fruits and Seeds of Weed and Poisonous Plants Contaminating Quarantine Products by E.M. Volkova [10]; Atlas of Seeds and Fruits by G.P. Moskalenko, B.I. Iudin [11], Weed Plants of the USSR [12].

Internet resources provide a great opportunity to identify plants and their seeds, for example: an information system for identification of plant objects on the basis of carpological, palynological and anatomical data of the Moscow State University [13], a website of the Canadian Food Inspection Agency [14], Digital Seed Atlas [15], Q-bank interactive seed identifier [16].

Many laboratories use the basic collection of weed plant seeds of the USSR flora, which includes 420 species. The main species of segetal plants are fairly well-represented in this collection. Despite the individual cases of reclassification that have been identified, it is very representative and is often the only means that supports the work of herbologists.

However, one has to admit that all this is no longer enough to carry out herbological studies.

In the existing practice of Rosselkhoznadzor test laboratories and reference centers, the species composition of weed plants detected in regulated product samples is quite extensive and often depends on the natural and climatic characteristics of the region of origin, the adopted crop protection scheme, the degree of purification, etc. At the present stage, it is necessary to identify not only the seeds of weed impurities frequently encountered in food and forage lots of cereals and technical crops (*Avena fatua* L., *Convolvulus arvensis* L., *Fallopia convolvulus* (L.) Á. Löve, *Galium aparine* L., *Chenopodium album* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Delphinium*



Рис. 5. Проведение геоботанических описаний в агроценозе гречихи в Кормиловском р-не Омской обл. (научный сотрудник Томского филиала Т.В. Эбель) (фото А.Л. Эбеля)

Fig. 5. Geobotanical description in the buckwheat agrocoenosis in Kormilovskiy District of the Omsk Region (researcher of the Tomsk branch T.V. Ebel) (photo by A.L. Ebel)



Рис. 6. Изучение состава сорных видов растений в посевах зерновых культур Пензенской области (научный сотрудник Пензенского филиала к. б. н. Е.А. Сухолозова) (фото Е.А. Сухолозова)

Fig. 6. Study of the weed species composition in cereal crops in the Penza Region (researcher of the Penza branch E.A. Sukholozova, PhD in Biology) (photo by E.A. Sukholozov)

что безусловно приводит к спорным вопросам и нотификациям (например, в случае с бодяком полевым).

Первоочередной задачей для решения сложившейся ситуации, по нашему мнению, является оптимизация действий ботаников научных подразделений и гербологов испытательных лабораторий по актуализации данных о распространении тех или иных видов сорных растений в конкретном регионе, присутствии их на участках производства и в продукции и формирование аннотированных коллекций семян сорных растений с учетом особенностей региональных флор. Мы предлагаем следующее:

1. Усилить экспедиционно-исследовательскую деятельность по сбору гербарных образцов сорных растений. При сборе семян и плодов обязательно собирать гербарный образец растения, чтобы в последующем точно идентифицировать вид. Снабжать образец этикеткой о месте и дате сбора и засоряемой культуре. Идентификацию проводить с привлечением профильных специалистов университетов. Необходимо организовать и вести такую работу в различных регионах страны, особенно в зоне выращивания основных сельскохозяйственных культур.

2. По возможности проводить макрофото-съемку семян и плодов сорных растений, которые прошли окончательную видовую идентификацию; формировать банк изображений с учетом возможного морфологического полиморфизма и гетерокарпии. Уделить наибольшее внимание сложным для идентификации группам растений, а также видам, которые включены в фитосанитарные требования других стран и локально распространены в данном регионе.

3. Специалистам испытательных лабораторий в случае обнаружения семян и плодов растений,

consolida L., *Lappula squarrosa* (Retz.) Dumort., *Thlaspi arvense* L., *Euphorbia virgata* Waldst. & Kit., *Setaria pumila* (Poir.) Roem. & Schult., *Polygonum scabrum* Moench, *Tripleurospermum inodorum* (L.) Sch. Bip., *Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv. and others), but also less common types of weeds that are periodically found in certain grain products (*Echium vulgare* L., *Fumaria officinalis* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Stachys annua* (L.) L., *Corispermum declinatum* Stephan ex Iljin, *Bifora radians* M. Bieb., *Cichorium intybus* L., *Linaria vulgaris* Mill., *Rumex crispus* L., *Sinapis arvensis* L., *Viola arvensis* Murr., *Arctium lappa* L., *Camelina microcarpa* Andr. ex DC. and others).

Some species cannot be identified by their external seed structure alone, and detailed anatomical studies are required. It is well-known that the seeds of different solanaceous species may be very similar, but they differ from each other in the nature of the thickening of the en-

dotesta's walls. The fruits of composite flowers of the tribe Cynareae (*Cirsium*, *Carduus*, *Onopordum*, etc.) and Cichorieae (*Tragopogon*, *Cichorium*, *Crepis*) contain species-specific characteristics on the level of seed peel, and not pericarp [17, 18, 19, 20, 21]. Identification of fruits/seeds of some seeds of Poaceae, Apiaceae, Brassicaceae, and Polygonaceae families is often difficult [22].

Moreover, meeting the phytosanitary requirements of countries that import Russian grain products requires knowledge about the presence of certain plant species in Russia and, in fact, the availability of images of their seeds. The preliminary list of weed plants includes about 60 species whose presence in regulated lots for export purposes is unacceptable. There are plants on this list that have limited (sometimes local) distribution in the Russian Federation, are also not always segetal or field weeds and, even if present in the fields, are very rarely contaminate products such as *Coronopus didymus* (L.) Sm., *Conringia orientalis* (L.) Dumort., *Turgenia latifolia* (L.) Hoffm.

A significant problem in meeting phytosanitary requirements is taxonomic discrepancies in the understanding of the volume of the same weed taxa between the consignor and consignee countries, which certainly leads to controversial questions and notifications (e. g. creeping thistle).

In our opinion, the primary task in resolving this situation is to optimize the actions of botanists from research units and herbologists from test laboratories in order to update data on the distribution of certain species of weeds in a particular region, their presence at production sites and in harvest, and to form annotated



Рис. 7. Сбор гербария сорных растений на территории Южного берега Крыма (сотрудники филиала ФГБУ «ВНИИКР» в Республике Крым) (фото Т. Рыбаревой)

Fig. 7. Herbarium collection of weed plants on the Crimea southern coast (researchers of FGBU “VNIIKR” branch in the Republic of Crimea) (photo by T. Rybariova)

включенных в Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС, по истечении срока хранения образца рекомендовать передавать выявленные семена карантинных объектов во Всероссийский центр карантина растений для выполнения научно-исследовательских работ.

В данную работу уже активно включились научные сотрудники и специалисты филиалов ФГБУ «ВНИИКР» (Томский, Воронежский, Пензенский, Волгоградский, филиал в Республике Крым, Приморский). Исследователи филиалов регулярно организуют экспедиционные выезды в различные агроландшафты, проводят изучение видового состава сорного компонента флоры, делают геоботанические описания сорной растительности, осуществляют сбор гербарных образцов, плодов и семян растений, встречающихся в сельскохозяйственных посевах зерновых и масличных культур, изучают характер засоренности семенных и продовольственных партий подкарантинной продукции (рис. 5–8). Результатами такой работы являются подробные научно-исследовательские отчеты, региональные гербарные и карпологические коллекции. Одним из лидеров этого движения является Томский филиал, который уже в течение нескольких лет осуществляет подобную работу на самом высоком уровне и приступил к созданию фотобанка изображений семян сорных растений. Отчеты и значимые полевые материалы передаются в ФГБУ «ВНИИКР» и используются для пополнения коллекционных фондов, подготовки методических рекомендаций по выявлению и идентификации сорных видов растений, аналитических документов и информационных справоч.

collections of weed plant seeds, taking into account the specifics of the regional flora. The following can be proposed:

1. Increase expeditionary research activities to collect herbarium specimens of weed plants. Collect herbarium specimens of the plant seeds and fruits together to identify the species accurately. Label specimens with the information about the place and date of collection and the contaminated crop. Identification should be carried out with the involvement of relevant university specialists. It is necessary to organize and carry out such work in different regions of the country, especially in the area where the main crops are grown.

2. If possible, take macrophotographs of weed plant seeds and fruits that have passed the final species identification; create an image bank taking into account possible morphological polymorphism and heterocarp. Pay the greatest attention to groups of plants that are difficult to identify as well as to species that are included in phytosanitary requirements of other countries and are locally distributed in the region.

3. In case of detection of seeds and fruits of plants included in the Common List of Plant Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union, the specialists of the testing laboratories should recommend transferring the detected seeds of the quarantine facilities to the All-Russian Plant Quarantine Center for research after the expiration of the storage period of a specimen.

Researchers and specialists from FGBU “VNIIKR” branches (Tomsk, Voronezh, Penza, Volgograd and

Продолжение работы позволит не только собрать репрезентативную карпологическую коллекцию, но и выявить видовой состав сорных растений применительно к определенному региону и засоряемой культуре, что очень важно в принятии конкретных фитосанитарных решений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Каден Н.Н. О некоторых основных вопросах классификации, типологии и номенклатуры плодов // Ботанический журнал. – 1961. – Т. 46, № 4. – С. 496–504.
2. Каден Н.Н. Типы плодов растений средней полосы Европейской части России // Ботанический журнал. – 1965. – Т. 50, № 6. С.775–787.
3. Левина Р.Е. О классификации и номенклатуре плодов // Ботанический журнал. – 1961. – Т. 46, № 4. – С. 488–495.
4. Левина Р.Е. Морфология и экология плодов. – Л.: Наука, 1987. – 160 с.
5. Левина Р.Е. Морфология и типы плодов. – Ульяновск: Ульянов. пед. ин-т, 1974. – 32 с.
6. Тахтаджян А.Л. Основы эволюционной морфологии покрытосеменных. – М. – Л.: Наука, 1964. – 236 с.
7. Девятков А.Г., Калинин И.М. Карпология в Московском университете: от Г.-Ф. Гофмана до Н.Н. Кадена // Ботанический журнал. – 2018. – № 103 (12). – С. 1628–1636.
8. Вандышева Н.В., Цинкевич Н.В., Омеляненко Т.З., Кулаков В.Г., Кулакова Ю.Ю., Мазурин Е.С.



Рис. 8. Сбор семян сорных растений на территории Республики Крым (м. н. с. Н.В. Цинкевич, м. н. с. Т.З. Омеляненко) (фото Т. Рыбаревой)

Fig. 8. Weed plant seeds collection of the Republic of Crimea (junior researcher N.V. Tsinkevich, junior researcher T.Z. Omelianenko) (photo by T. Rybariova)

Primorsky Krai) have already actively participate in this work. Researchers of the branches regularly organize expeditions to various cultivated lands, study the species composition of the weed component of the flora, make geobotanical descriptions of weed vegetation, collect herbarium specimens, fruits and seeds of plants found in agricultural crops of grains and oil-seeds, study the nature of contamination of seed and food lots of regulated products (Fig. 5–8). The results of this work include detailed research reports and regional herbal and carpological collections. One of the leaders of this movement is the Tomsk branch, which has been carrying out such an activity at the highest level for several years now and has started to create an image bank of weed plant seeds. Reports and significant field materials are submitted to FGBU “VNIIKR” and are used to replenish collection funds, prepare methodological recommendations for detecting and identifying weed plant species, analytical documents and reference materials.

Continuous work will allow to collect a representative carpological collection, as well as identify the species composition of weed plants in a particular region and contaminated crop, which is very important in making specific phytosanitary decisions.

REFERENCES

1. Kaden N.N. On some basic issues of classification, typology and nomenclature of fruits [O nekotorykh osnovnykh voprosakh klassifikatsii, tipologii i nomenklatury plodov]. *Botanical Journal*. 1961; 46 (4): 496–504. (In Russian.)
2. Kaden N.N. Types of fruits from plants in the central part of European Russia [Tipy plodov rastenij srednej polosy Evropejskoj chasti Rossii]. *Botanical Journal*. 1965; 50 (6): 775–787. (In Russian.)
3. Levina R.E. On classification and nomenclature of fruits [O klassifikatsii i nomenklature plodov]. *Botanical Journal*. 1961; 46 (4): 488–495. (In Russian.)
4. Levina R.E. Morphology and ecology of fruits [Morfologiya i ekologiya plodov]. L.: Nauka, 1987. 160 p. (In Russian.)
5. Levina R.E. Morphology and types of fruits [Morfologiya i tipy plodov]. Ulyanovsk: Ulyanovsk Pedagogical Institute, 1974. 32 p. (In Russian.)
6. Takhtadzhian A.L. Basics of evolutionary morphology of angiospermous plants [Osnovy evolyucionnoj morfologii pokrytosemennyh]. M. L.: Nauka. 1964. 236 p. (In Russian.)
7. Deviatov A.G., Kalinichenko I.M. Carpology in the Moscow State University: from G.F. Gofman to N.N. Kaden [Karpologiya v Moskovskom universitete: ot G.-F. Gofmana do N.N. Kadena]. *Botanical Journal*. 2018; 103 (12): 1628–1636. (In Russian.)
8. Vandysheva N.V., Tsinkevich N.V., Omelianenko T.Z., Kulakov V.G., Kulakova I.I., Mazurin E.S. Quarantine Introduction Site in Crimea – scientific base of the country’s phytosanitary security. *Plant Quarantine. Research and Practice*. 2018; 1 (23): 24–28. (In Russian.)
9. Dobrokhoto V.N. Seeds of weed plant [Seмена sornykh rastenij]. M.: Selkhozizdat, 1961. 414 p. (In Russian.)

Карантинный интродукционный участок в Крыму – научная база фитосанитарной безопасности страны // Карантин растений. Наука и практика. – 2018. – № 1 (23). С. 24–28.

9. Доброхотов В.Н. Семена сорных растений. – М.: Сельхозиздат, 1961. – 414 с.

10. Волкова Е.М., Данкверт С.А., Маслов М.И., Магомедов У.Ш. Атлас плодов и семян сорных и ядовитых растений, засоряющих подкарантинную продукцию. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. – 301 с.

11. Москаленко Г.П., Юдин Б.И. Атлас семян и плодов сорных растений, встречающихся в подкарантинных грузах и материалах. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 1999. – 264 с.

12. Сорные растения СССР / Под ред. Б.А. Келлера. – Л.: Изд-во Академии наук СССР, 1935. – Т. 1–4.

13. Информационная система идентификации растительных объектов на основе карпологических, палинологических и анатомических данных МГУ. – URL: <http://botany-collection.bio.msu.ru/> (дата обращения: 27.04.2020).

14. Canadian Food Inspection Agency. – URL: <https://www.inspection.gc.ca> (дата обращения: 20.04.2020).

15. Digital Plant Atlas. – URL: <http://www.plantatlas.eu/> (дата обращения: 15.04.2020).

16. Lucidcentral. Identification and Diagnostic Tools. – URL: <https://keys.lucidcentral.org/keys> (дата обращения: 10.04.2020).

17. Бойко Э.В. Новожилова Е.В. Строеие семенной кожуры видов Asteraceae. I. Трибы Arctotideae, Cardueae, Mutisieae, Vernonieae // Turczaninowia. – 2018. – № 21 (4). С. 44–62.

18. Новожилова Е.В., Бойко Э.В. Морфолого-анатомическое строение семян видов рода *Alfredia* (Asteraceae: Cardueae) // Turczaninowia. – 2019. – № 22 (4). – С. 42–56.

19. Dittrich M. Cynareae – systematic review // In: The Biology and Chemistry of the Compositae. Eds. V. H. Heywood, J. B. Harborne, B. L. Turner. – 1977, London. – Vol. 2. – P. 999–1015.

20. Häffner E. On the phylogeny of the subtribe Carduinae (tribe Cardueae, Compositae) // Englera. – 2000. – Vol. 21. – P. 1–208.

21. Zaika M.A., Kilian N., Jones K., Krinitsina A.A., Nilova M.V., Speranskaya A.S., Sukhorukov A.P. *Scorzonera* sensu lato (Asteraceae, Cichorieae) – taxonomic reassessment in the light of new molecular phylogenetic and carpological analyses // PhytoKeys. – 2020. – Vol. 137. – P. 1–85.

22. Тихомиров В.Н. Сравнительная морфология гинецея и плода зонтичных СССР: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1958. – 15 с.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Кулакова Юлиана Юрьевна, кандидат биологических наук, начальник – ведущий научный сотрудник научно-методического отдела инвазивных видов растений ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия.

10. Volkova E.M., Dankvert S.A., Maslov M.I., Magomedov U.S. Atlas of fruits and seeds of weed and poisonous plants that clog quarantine products [Atlas plodov i semyan sornyh i yadovityh rastenij, zasoryayushchih podkarantinnuyu produkciyu]. M.: KMK Publishing House, 2007. 301 p. (In Russian.)

11. Moskalenko G.P., Iudin B.I. Atlas of seeds and fruits of weeds found in regulated cargoes and materials [Atlas semyan i plodov sornyh rastenij, vstrechayushchihsy v podkarantinnyh gruzah i materialah]. M.: KMK Publishing House, 1999. 264 p. (In Russian.)

12. Weed plants of the USSR [Sornye rasteniya SSSR]. Ed. by. B.A. Keller. L.: USSR Academy of Sciences Publishing House, 1935. Vol. 1–4. (In Russian.)

13. Information system for identification of plant objects on the basis of carpological, palynological and anatomical data of the Moscow State University. URL: <http://botany-collection.bio.msu.ru/> (last accessed: 27.04.2020). (In Russian.)

14. Canadian Food Inspection Agency. URL: <https://www.inspection.gc.ca> (last accessed: 20.04.2020).

15. Digital Plant Atlas. URL: <http://www.plantatlas.eu/> (last accessed: 15.04.2020).

16. Lucidcentral. Identification and Diagnostic Tools. URL: <https://keys.lucidcentral.org/keys> (last accessed: 10.04.2020).

17. Boiko E.V., Novozhilova E.V. Structure of seed peel of species Asteraceae. I. Tribes Arctotideae, Cardueae, Mutisieae, Vernonieae [Stroenie semennoj kozhury vidov Asteraceae. I. Triby Arctotideae, Cardueae, Mutisieae, Vernonieae]. *Turczaninowia*. 2018; 21 (4): 44–62. (In Russian.)

18. Novozhilova E.V., Boiko E.V. Morphological and anatomical structure of achenes of the genus *Alfredia* (Asteraceae: Cardueae) [Morfologo-anatomicheskoe stroenie semyanok vidov roda Alfredia (Asteraceae: Cardueae)]. *Turczaninowia*. 2019; 22 (4): 42–56. (In Russian.)

19. Dittrich M. Cynareae – systematic review. In: The Biology and Chemistry of the Compositae. Eds. V. H. Heywood, J. B. Harborne, B. L. Turner. 1977, London. Vol. 2: 999–1015.

20. Häffner E. On the phylogeny of the subtribe Carduinae (tribe Cardueae, Compositae). *Englera*. 2000; 21: 1–208.

21. Zaika M.A., Kilian N., Jones K., Krinitsina A.A., Nilova M.V., Speranskaya A.S., Sukhorukov A.P. *Scorzonera* sensu lato (Asteraceae, Cichorieae) – taxonomic reassessment in the light of new molecular phylogenetic and carpological analyses. *PhytoKeys*. 2020; 137: 1–85.

22. Tikhomirov V.N. Comparative morphology of gynacea and umbrella fetus of the USSR [Sravnitel'naya morfologiya gineceya i ploda zontichnyh SSSR]: Thesis Abstract. ... PhD in Biological Sciences. M., 1958. 15 p. (In Russian.)

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Yuliana Kulakova, PhD in Biology, Head and Leading Researcher of the Research and Methodology Department of Invasive Plant Species of the FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia.

УДК 591.4; 595.2

Новые данные о морфологии суринамского мукоеда *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae)

С.А. КУРБАТОВ
ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0002-9729-5751, e-mail: pselaphidae@yandex.ru

АННОТАЦИЯ

В рамках значительно расширенного описания вида *Oryzaephilus surinamensis* впервые приводится иллюстрированная информация о ранее неизвестных структурах и признаках данного вида, а именно: о строении ротовых частей (мандибул, максилл, нижней губы, подбородка), мезо- и метанотума, метэндостернита, 8-го тергита самца. Приводятся дополнительные данные о строении известных структур – надкрыльев, глаз и стернитов брюшка.

Ключевые слова. Суринамский мукоед, *Oryzaephilus surinamensis*, Coleoptera, Silvanidae, вредители запасов, морфология, микропрепарат.

Благодарность. Автор приносит искреннюю благодарность сотрудникам ФГБУ «ВНИИКР» О.Г. Волкову и Ю.А. Ловцовой за помощь в фотографировании микропрепаратов и последующем компьютерном сшивании фотографических слоев.

Для корреспонденции. Курбатов Сергей Александрович, кандидат биологических наук, начальник научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР», 140150, Россия, Московская обл., г. Раменское, р. п. Быково, ул. Пограничная, 32, e-mail: pselaphidae@yandex.ru.



Суринамский мукоед – *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus, 1758) – широко распространенный в мире вредитель запасов, от зерна и продуктов его переработки до кондитерских изделий. Он не входит в перечни карантинных объектов Российской Федерации и стран – участниц ЕАЭС, однако фигурирует в фитосанитарных требованиях ряда стран – импортеров российского зерна.

Несмотря на важное хозяйственное значение суринамского мукоеда, сведения о морфологии

UDC 591.4; 595.2

New Data on the Morphology of the Saw-Toothed Grain Beetle *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae)

S.A. KURBATOV
All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU “VNIKR”), Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia; ORCID 0000-0002-9729-5751, e-mail: pselaphidae@yandex.ru

ABSTRACT

As part of the vastly expanded description of the *Oryzaephilus surinamensis* species the illustrated information about previously unknown structures and characters of this species is presented for the first time, namely: the structure of the mouthparts (mandibles, maxillae, prementum, postmentum), meso- and meta-notum, metendosternite and the 8th male tergite. Additional data on the known structures – elytrae, eyes, and abdominal sternites are provided.

Keywords. Saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis*, Coleoptera, Silvanidae, storage pests, morphology, slides.

Acknowledgement. The author expresses his sincere gratitude to the staff of FGBU “VNIKR” O.G. Volkov and Yu.A. Lovtsova for their help in photographing slides and the subsequent computer stacking of photography layers.

For correspondence. Sergey Kurbatov, PhD in Biology, Head of Entomological Research and Methodology Department, FGBU “VNIKR”, 140150, Russia, Moscow region, Ramenskoye, Bykovo, Pogranichnaya str. 32, e-mail: pselaphidae@yandex.ru.

The saw-toothed grain beetle, *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus, 1758), is a world widespread storage pest damaging from grain and processed grain products to confectionery. It is not included in the quarantine objects lists of the Russian Federation and the EAEU member states, but it appears in the

этого вредителя (как, впрочем, и в целом рода *Oryzaephilus*) в значительной мере неполны [1, 2, 3, 4]. Даже в последней по времени ревизии рода [5] совершенно отсутствуют данные о строении целого ряда структур, например, таких как ротовые органы, средне- и заднеспинка, метэндостернит, последний (8-й) тергит самца. Детали строения других структур (например, глаза или надкрыльев) описаны неполно. Между тем знание строения всех таких структур важно как для понимания эволюции семейства Silvanidae и выявления филогенетических отношений внутри этой группы, так и в практической работе испытательных лабораторий, осуществляющих лабораторные исследования в области карантина растений, которые могут получать на исследование не целых насекомых, а лишь деформированные образцы или даже отдельные фрагменты их тел.

В процессе нашего исследования мы впервые изучили отдельные склериты и части тела *Oryzaephilus surinamensis*, которые отчленились для этого от насекомого и помещались в препарат. Для приготовления препаратов использовался канадский бальзам. Под микроскопом происходило отделение частей тела и последующее очищение окружающих тканей и мембран. Затем в течение 1–2 ч части тела выдерживались в изопропанол и после этого помещались в бальзам. Для изучения готовых препаратов использовался микроскоп Carl Zeiss Axio Imager A1; послойное фотографирование изучаемых объектов осуществлялось фотоаппаратом Carl Zeiss AxioCam MRc. Сшивание слоев проводилось с помощью компьютерной программы Zerene Stacker. Дальнейшая обработка изображений проходила с использованием программы Adobe Photoshop CC 2018.

В основе приведенного ниже описания *Oryzaephilus surinamensis* лежит описание этого вида, приведенное Halstead [5]. Это несколько модифицированное автором статьи описание значительно дополнено новыми данными о строении не изучавшихся ранее структур: мандибул, максилл, нижней губы, подбородка, мезо- и метанотума, метэндостернита, 8-го тергита самца. Также добавлены новые сведения о строении таких известных

phytosanitary requirements of some Russian grain importing countries.

Despite the important economic significance of the saw-toothed grain beetle, the information regarding its morphology (as well as the *Oryzaephilus* genus) is largely incomplete [1, 2, 3, 4]. Even the most recent revision of the genus [5] includes absolutely no data on the structure of certain body parts, such as mouthparts, meso- and metanotum, metendosternite, the last (8th) male tergite. The details of the other body parts structure (e. g. eyes or elytrae) are described incompletely. Meanwhile, knowing the structure of all such components is important both for understanding the evolution of the Silvanidae and phylogenetic relationships within this group, as well as for the practical work of testing laboratories conducting research in the field of plant quarantine, which can receive deformed samples or even fragments of insects' bodies rather than whole specimens for the study.

During this research, individual sclerites and body parts of *Oryzaephilus surinamensis* have been studied for the first time. For this purpose, they were disarticulated from the insect body and placed on a slide. Canada balsam was used to make the slides. Body parts were separated under the microscope and the surrounding tissues and membranes were subsequently cleansed. Next, the body parts were left in isopropanol for 1–2 hours and then placed in balm. To study the finished slides, the Carl Zeiss Axio Imager A1 microscope was used; the photography layering of the studied objects was carried out with a Carl Zeiss AxioCam MRc camera. The layers were stacked together using the Zerene Stacker software application. Further image processing was carried out using Adobe Photoshop CC 2018.

The *Oryzaephilus surinamensis* description below is based on the description of this species given by Halstead [5]. This slightly modified description is greatly supplemented by new data on the structure of previously unstudied body parts: mandibles, maxillae, prementum, postmentum, meso- and metanotum, metendosternite and the 8th male tergite. New information about the structure of such well-known components as eyes, elytrae, and abdominal sternites has also been added. All of these new data are illustrated. In addition, original illustrations of the male hind legs bearing secondary sex characters and the aedeagus are given.

The body length is from 1.7 to 3.5 mm. The coloration is most often dark brown, sometimes lighter to yellow-brown. The upper body is slightly shiny to matte, the bottom of the body is shiny. The pubescence is short, recumbent, golden (Fig. 1).

The head as long as wide or slightly wider than long, tapering anteriorly, slightly narrower than pronotum. The clypeus is slightly notched. The cheeks are raised. The eyes are relatively small, 2.5–3 times longer than their width when viewed from above, slightly oval when viewed sidewise from the side, consist of 40–50 ommatidia; numerous small spines are located between the ommatidia (Fig. 4a). The temples are long, 2/5 to 1/2 of the eye's length, rounded or slightly angular. The antennae are of medium length, 3–3.5 times shorter than the body's length,

структур, как глаза, надкрылья и стерниты брюшка. Все эти новые данные проиллюстрированы. Кроме того, даны оригинальные иллюстрации задних ног самца, несущих вторичные половые признаки, и эдеагуса.

Длина тела от 1,7 до 3,5 мм. Окраска чаще всего темно-коричневая, иногда более светлая, до желто-коричневой; верх тела от слабо-блестящего до матового, низ тела блестящий. Опушение короткое, прилегающее, золотистое (рис. 1).

Голова длиной с ширину или слегка шире длины, сужается кпереди, незначительно уже переднеспинки. Наличник слабо выемчатый. Щеки приподняты. Глаза относительно некрупные, в 2,5–3 раза длиннее ширины при рассматривании сверху, слегка овальные при рассматривании сбоку, состоят из 40–50 омматидиев, между омматидиями расположены многочисленные мелкие шипики (рис. 4а). Виски длинные, составляют от 2/5 до 1/2 длины глаза, округленные или слабо угловатые. Усики средней длины, в 3–3,5 раза короче длины тела, короче общей длины головы и переднеспинки, 9–10-й членики лишь незначительно шире своей длины. Пунктировка лба и темени состоит из крупных точек, размер большей части которых примерно соответствует размеру омматидиев глаз.

Ротовые органы. Мандибулы (рис. 2 а, б) сильно склеротизованы, с хорошо развитыми молей и простекой, с 1 дополнительным вершинным зубцом на внутреннем крае; внешний край снабжен рядом длинных сенсилл; дорсальная поверхность с отдельными плохо заметными мелкими прилегающими волосками. Максиллы (рис. 2с) разделены на 5 частей: кардо, стипес с причлененным к нему нижнечелюстным щупиком, лацинию и галеа; кардо сильно склеротизован, более или менее треугольной формы, разделен тонким швом на 2 неравные части, каждая из которых на внешнем крае снабжена парой длинных, слегка изогнутых щетинок. Стипес слабее склеротизован, более или менее треугольной формы, к его узкому внешнему краю причленен 4-члениковый нижнечелюстной щупик. 1-й членик щупика длинный и узкий, изогнут в базальной трети, слабо расширяется

shorter than total length of head and pronotum; segments 9–10 only slightly wider than their length. The punctuation of forehead and of vertex consists of large punctures, most of which approximately correspond to the size of eyes ommatidia.

Mouthparts. The mandibles (Fig. 2 а, б) are strongly sclerotized, with the well-developed mola and prostheca, with the 1 additional apical tooth on the inner margin; outer margin have the row of long sensilla; the dorsal surface with separate, poorly visible, small and recumbent hairs. The maxillae (Fig. 2с) are divided into 5 (five) parts: a cardo, stipes with maxillary palp joined to it, a lacinia and a galea; the cardo is strongly sclerotized, more or less triangular, divided by a thin suture into the 2 (two) unequal parts, each of which on the outer edge is equipped with a pair of long, slightly curved bristles. The stipes is less sclerotized, more or less triangular in shape, with a 4-segmented maxillary palp attached to its narrow outer margin. The 1st palpomere is long and narrow, curved in a basal third, slightly widening towards apex; the 2nd palpomere at its widest point is almost twice as wide as the 1st, more or less triangular in shape, widening towards apex; the 3rd palpomere almost square, only slightly longer than its width, slightly wider than the 2nd; the 4th palpomere strongly elongated, more than twice as long as its maximum width, narrowed in apical half, its distal edge forms a rounded membranous sensory surface equipped with several very small elongated processes. The lacinia is a strongly elongated, weakly sclerotized sclerite, the straight inner edge of which is provided with long curved setae in the upper half. The galea is also weakly sclerotized; a row of several long, straight setae is located parallel to its straight outer margin; the rounded anterior margin is provided with a very dense brush of long bristles curved in one general direction, which are more or less integral with similar lacinia bristles. The prementum (Fig. 3а) is more or less trapezium-shaped, its anterior margin is wider than the posterior margin; the anterior angles are rounded; the anterior margin is provided with a number of numerous long bristles; the distal part of the ventral surface is also covered with long bristles, this bristling part has the shape of a triangle. The labial palpi are 3-segmented; their 1st segment

is long and narrow, curved in the basal part; the 2nd segment, elongated, much wider than the 1st, apparently, evolutionarily formed by fusion of two segments, the remnants of the border between which the outer edge of this segment can be seen in the middle; the 3rd segment strongly elongated, more than twice as long as its maximum width, narrowed in the apical half, its distal edge forms a rounded membranous sensory surface, equipped with several very small elongated processes. In general, the general



Рис. 1. Имаго *Oryzaephilus surinamensis* (фото Udo Schmidt [6])

Fig. 1. The *Oryzaephilus surinamensis* imago (photo by Udo Schmidt [6])

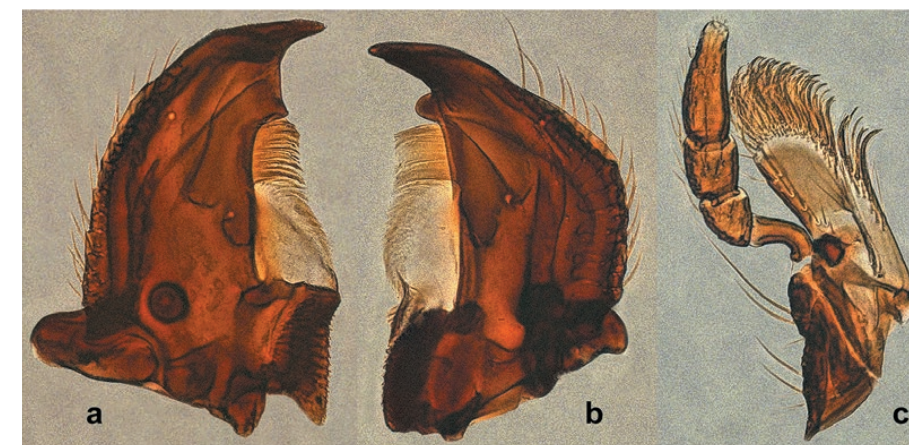


Рис. 2. Детали строения ротовых органов *Oryzaephilus surinamensis*: а – левая мандибула; б – правая мандибула; с – левая максилла (фото С.А. Курбатова)

Fig. 2. The *Oryzaephilus surinamensis* mouthparts structure: а – left mandible; б – right mandible; с – left maxilla (photo by S.A. Kurbatov)

к вершине; 2-й членик в самом широком месте почти вдвое шире 1-го, более или менее треугольной формы, расширяется к вершине; 3-й членик почти квадратный, лишь незначительно длиннее своей ширины, едва шире 2-го; 4-й членик сильно удлинённый, более чем вдвое длиннее своей максимальной ширины, сужен в вершинной половине, его дистальный край образует округлую мембранозную сенсорную поверхность, снабжённую несколькими очень мелкими удлинёнными выростами. Лациния представляет собой сильно удлинённый, слабо склеротизованный склерит, прямой внутренний край которого в верхней половине снабжён длинными изогнутыми щетинками. Галеа также слабо склеротизована; параллельно ее прямому внешнему краю расположен ряд из нескольких длинных, прямых щетинок; округлённый передний край снабжён очень густой щеткой длинных, изогнутых в одном общем направлении щетинок, которые составляют более или менее одно целое с аналогичными щетинками лацинии. Нижняя губа (рис. 3а) более или менее трапециевидной формы, передний край губы шире заднего края; передние углы округлены; передний край снабжён рядом многочисленных длинных щетинок; дистальная часть нижней поверхности также покрыта длинными щетинками, эта занятая щетинками часть имеет форму треугольника. Нижнегубные щупики 3-члениковые; их 1-й членик длинный и узкий, изогнут в базальной части; 2-й членик, удлинённый, гораздо шире 1-го, по-видимому, эволюционно образован путем срастания двух члеников, остатки границы между которыми можно видеть на середине внешнего края этого членика; 3-й членик сильно удлинённый, более чем вдвое длиннее своей максимальной ширины, сужен в апикальной половине, его дистальный край образует округлую мембранозную сенсорную поверхность, снабжённую несколькими очень мелкими удлинёнными выростами. В целом общая форма нижнегубных щупиков вполне соответствует таковой нижнечелюстных щупиков. Подбородок (рис. 3б) имеет форму поперечного шестиугольника; его передний край сильно округло-выемчатый, эта выемка снабжена очень тонкой мембраной; боковые края, примыкающие к основанию подбородка, также сильно выемчатые; вся поверхность, за исключением самого основания, покрыта длинными щетинками, направленными более или менее вперед. Подбородок сильно склеротизован, дополнительно армирован несколькими мощными килевидными образованиями, выступающими из плоскости поверхности подбородка.

Переднеспинка длиннее ширины, ее медиальное продольное килевидное возвышение слабо выражено; боковые килевидные возвышения изогнуты, на середине своей длины ближе к боковому краю

shape of the labial palp is quite consistent with that of the maxillary palp. The postmentum (Fig. 3b) has the shape of a transverse hexagon; its anterior margin is strongly round-notched; this notch is provided with a very thin membrane; the lateral margins adjacent to the base of the postmentum are also strongly notched; the entire surface, with the exception of the base itself, is covered with long bristles directed more or less forward. The postmentum is heavily sclerotized, additionally reinforced with several powerful keel-shaped formations protruding from the plane of the postmentum surface.

The pronotum is longer than the width, its medial longitudinal keeled elevation is weakly expressed; lateral keeled elevations curved, in the middle of their length closer to the lateral edge of the pronotum than to the medial elevation; the apical (1st) tooth of the lateral margin is no more protruding than the basal (6th); the punctation is similar to that of the forehead and the vertex.

The prosternum is densely punctuated, on both sides with a longitudinal epipleural suture, ending in front at the base of the 1st lateral tooth; there is no depression of the prothorax between its anterior margin and the prosternal process.

The elytrae are more than twice as long as the total width, slightly wider than pronotum; the elytral apex without elevation near the suture; the anterior margin of the elytra (excluding the sclerite hidden in the whole insect under the posterior margin of the pronotum), as well as the base of their lateral margin is crenulated.

The mesonotum (Fig. 4d) is small, consists of the scutum hidden under the posterior margin of the pronotum and a scutellum located in the middle of the base of the elytrae; the border between the scutum and the scutellum in the form of a straight line. The scutum has a thin longitudinal medial carina in the anterior two-thirds; the surface of the scutum is covered with an indistinct wavy microsculpture; the anterior margin is angularly notched; the posterior third of the scutum,

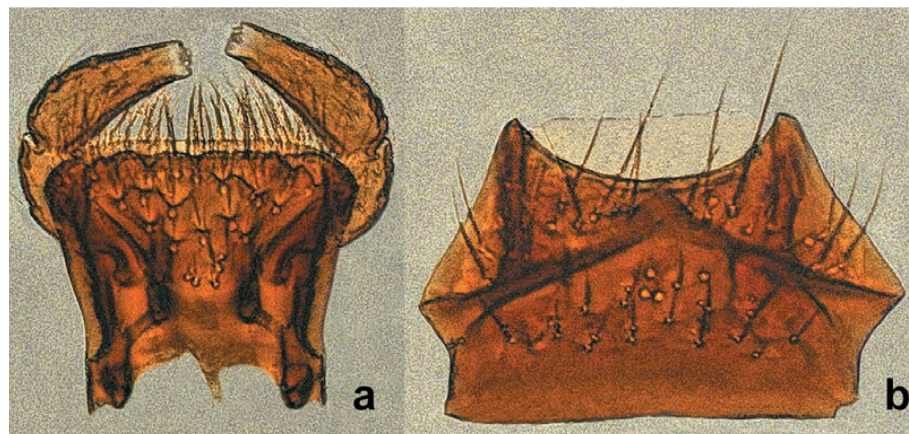


Рис. 3. Детали строения ротовых органов *Oryzaephilus surinamensis*: а – нижняя губа; б – подбородок (фото С.А. Курбатова)

Fig. 3. The *Oryzaephilus surinamensis* mouthparts structure: a – prementum; b – postmentum (photo by S.A. Kurbatov)

переднеспинки, чем к медиальному возвышению; апикальный (1-й) зубец бокового края выступает не сильнее, чем базальный (6-й); пунктировка сходна с таковой лба и темени.

Переднегрудь в густой пунктировке, с обеих сторон с продольным эпиплевральным швом, заканчивающимся впереди у основания 1-го бокового зуба; вдавление переднегруды между ее передним краем и простернальным выростом отсутствует.

Надкрылья более чем в 2 раза длиннее общей ширины, едва шире переднеспинки; вершины надкрыльев без поднятия около шва; передний край надкрыльев (без учета склерита, скрытого у целого насекомого под задним краем переднеспинки), а также основание их бокового края мелко зазубренные.

Среднеспинка (рис. 4d) маленькая, состоит из скрытого под задним краем переднеспинки скутума и расположенного на середине основания надкрыльев скутеллума (щитка); граница между скутумом и скутеллумом в виде прямой линии. Скутум в передних двух третях снабжён тонким продольным медиальным килем; поверхность скутума покрыта неявственной волнистой микроскульптурой; передний край угловато-выемчатый; задняя треть скутума, а также его боковые и передний края склеротизованы более сильно. Скутеллум поперечный, по центру армирован V-образной структурой; задний край скутеллума

as well as its lateral and anterior margins, more strongly sclerotized. The scutellum is transverse, reinforced in the center with a V-shaped structure; the posterior margin of scutellum angularly rounded. In general, the scutellum is more strongly and more uniformly sclerotized than the scutum.

The metanotum (Fig. 4e) is weakly sclerotized, more or less rectangular. The prescutum is transverse, only its narrow anterior margin is sclerotized, the rest of it is membranous. The scutum is large, membranous; as well as scutellum, it is divided lengthwise into 2 parts by 2 sclerotized apophyses. The outer margins of the scutellum are rounded. The postnotum is fragmented into two separate transverse sclerites, attached to the posterior margin of the scutum and the scutellum.

The fused meso- and metasternum are densely punctured with the exception of an almost non-punctured depressed median part of the metathorax. The metendosternite (Fig. 4c) with a wide base and 2 narrow, diverging apophyses, devoid of any additional processes.

The 1st (morphologically 3rd) visible abdominal sternite is the longest; the 2nd and the 3rd visible sternites in the middle of the inner side are reinforced in the form of an irregular discontinuous transverse line (Fig. 4b); punctation of sternites is expressed only laterally; the pubescence is small; hairs are directed backward.

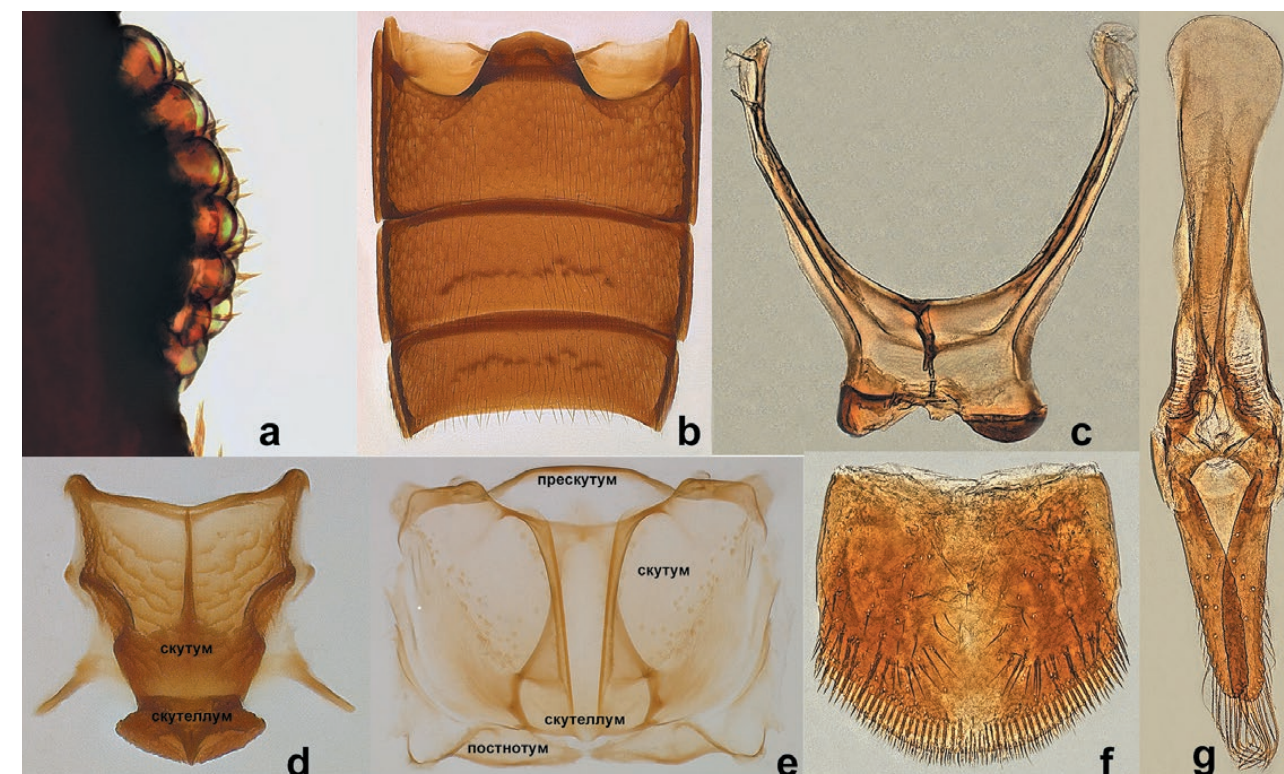


Рис. 4. Детали строения *Oryzaephilus surinamensis*: а – глаз; б – 1–3-й видимые стерниты брюшка; с – метэндостернит; d – среднеспинка; e – заднеспинка; f – 8-й тергит самца; g – генитальный аппарат самца (фото С.А. Курбатова)

Fig. 4. The *Oryzaephilus surinamensis* structure details: a – eye; b – 1–3rd visible abdominal sternites; c – metendosternite; d – mesonotum; e – metanotum; f – 8th male tergite; g – male genital apparatus (photo by S.A. Kurbatov)

угловато-округленный. В целом скутеллум более сильно и более равномерно склеротизован по сравнению со скутумом.

Заднеспинка (рис. 4е) слабо склеротизована, более или менее прямоугольной формы. Прескутум поперечный, склеротизован лишь его узкий передний край, остальная его часть мембранозная. Скутум большой, мембранозный; так же, как и скутеллум, разделен вдоль на 2 части 2 склеротизованными апофизами. Внешние края скутеллума округлены. Постнотум фрагментирован на 2 отдельных поперечных склерита, причлененных к заднему краю скутума и скутеллума.

Сросшиеся средне- и заднегрудь густо пунктированы за исключением почти не пунктированной вдавленной срединной части заднегруды. Метэндо-стернит (рис. 4с) с широким основанием и 2 узкими расходящимися апофизами, лишенными каких-либо дополнительных выростов.

1-й (морфологически 3-й) видимый стернит брюшка самый длинный; 2-й и 3-й видимые стерниты на середине внутренней стороны армированы в виде неровной, прерывистой поперечной линии (рис. 4б); пунктировка стернитов выражена лишь по бокам; опушение мелкое, волоски направлены назад.

1–3-й членики лапок на нижней поверхности снабжены густыми волосками, 4-й членик маленький, плохо заметный, 5-й членик расширяется к вершине, длиной как все предыдущие членики, взятые вместе (рис. 5).

Вторичные половые признаки. Голова самца несколько шире, чем у самки: длиной с ширину или едва шире длины у самца (соотношение длины к ширине 1–1,1), шире длины у самки (соотношение длины к ширине 1,1–1,2). Бока головы впереди глаз у самца иногда (но не всегда) с парой торчащих вверх изогнутых «рогов». Переднеспинка самца в целом несколько длиннее, чем у самки (среднее соотношение длины к ширине – 1,2 у самца, 1,15 у самки).

У самца задние вертлуги снабжены по заднему краю большим тупым зубцом, задние бедра в дистальной трети заднего края с небольшим шипом, задние голени на вершине внутренней стороны с очень маленьким зубчиком (рис. 5а); у самки задние ноги без особых отличий. Последний (8-й) тергит самца (рис. 4ф), полностью скрытый под надкрыльями, снабжен густым рядом щетинок, которые расположены на одинаковом расстоянии от равномерно округленного заднего края тергита.

Эдеагус как на рисунке 4г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варшалович А.А. Карантинные и другие виды жуков-вредителей промышленного сырья и продовольственных запасов // Карантинные

The 1st–3rd tarsal articles on the ventral surface are provided with dense hairs, the 4th article is small, poorly visible, the 5th article expands towards the apex, as long as all the previous segments taken together (Fig. 5).

Secondary sex characters. The head of the male is slightly wider than that of a female: as long as wide or slightly wider than the length in the male (the ratio of length to width is 1–1.1), wider than the length in the female (the ratio of length to width is 1.1–1.2). The sides of the head in front of the male's eyes sometimes (but not always) have a pair of curved “horns” sticking up. The male's pronotum is slightly longer than that of the female (the average ratio of length to width is 1.2 in the male, 1.15 in the female).

The male has the hind trochanters provided along the posterior edge with a large blunt tooth, the hind femurs in the distal third of the posterior edge with a slight spine, the hind tibiae on the apex of their inner side with a very small tooth (Fig. 5a); the female has no special characters in hind legs. The last (8th male tergite (Fig. 4f), completely hidden under the elytrae, has a dense row of bristles, which are located at the same distance from the evenly rounded posterior margin of the tergite.

Aedeagus is as in Fig. 4g.

REFERENCES

1. Varshalovich A.A. Quarantine and other types of pest beetles of industrial raw materials and food supplies [Karantinnyye i drugiye vidy vreditel'ey promyshlennogo syr'ya i pishchevykh produktov]. *Quarantine and other dangerous pests and plant diseases: Collection of scientific papers*. TSNILK. M.: Kolos, 1975. Edition 2: 3–245. (In Russian.)

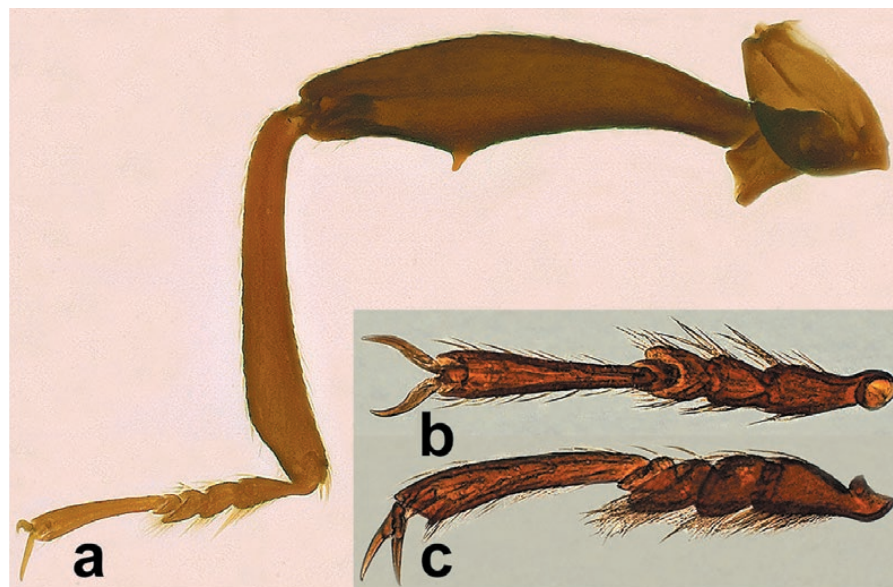


Рис. 5. Строение ног *Oryzaephilus surinamensis*: а – задняя нога самца; б – лапка средней ноги, дорсально; в – лапка средней ноги, латерально (фото С.А. Курбатова)

Fig. 5. The *Oryzaephilus surinamensis* leg structure: a – the male hind leg; b – the tarsus of the middle leg, dorsally; c – the tarsus of the middle leg, laterally (photo by S.A. Kurbatov)

и другие опасные вредители и болезни растений: Сборник науч. трудов / ЦНИЛК. – М.: Колос, 1975. – Вып. 2. – С. 3–245.

2. Ковалев А.В. Silvanidae Сильваниды // Справочник по чужеродным жесткокрылым европейской части России / Орлова-Беньковская М.Я. (сост.). – Ливны: изд. Мухаметов Г.В., 2019. – С. 450–463.

3. Мордкович Я.Б., Соколов Е.А. Справочник – определитель карантинных и других опасных вредителей сырья, продуктов запаса и посевного материала. – М.: Колос, 1999. – 384 с.

4. Friedman A.-L.-L. The Silvanidae of Israel (Coleoptera: Cucujoidea) // Israel Journal of Entomology. – 2015. – Vol. 44–45. – P. 75–98.

5. Halstead D.G.H. A revision of the genus *Oryzaephilus* Ganglbauer, including descriptions of related genera (Coleoptera: Silvanidae) // Zoological Journal of the Linnaean Society. – 1980. – Vol. 69. – P. 271–374.

6. Udo Schmidt. *Oryzaephilus surinamensis* (Linne, 1758). URL: <http://flickr.com/photos/coleoptera-us/14438947353/in/photostream/lightbox/> (дата обращения: 12.09.2020).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Курбатов Сергей Александрович, кандидат биологических наук, начальник научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия.

2. Kovalev A.V. Silvanidae Silvanids. Handbook on Alien Coleoptera of the European Part of Russia [Spravochnik po chuzherodnym zhestkokrylym yevropeyskoy chasti Rossii]. *Orlova-Benkovskaya M.Ya. (comp.)*. Livny: ed. Mukhametov G.V., 2019: 450–463. (In Russian.)

3. Mordkovich Ya.B., Sokolov E.A. Handbook – a determinant of quarantine and other dangerous pests of raw materials, stock products and seed [Spravochnik – opredelitel' karantinnykh i drugikh opasnykh vreditel'ey syr'ya, iskhodnoy produktsii i semyan]. M.: Kolos, 1999. 384 p. (In Russian.)

4. Friedman A.-L.-L. The Silvanidae of Israel (Coleoptera: Cucujoidea). *Israel Journal of Entomology*. 2015; 44–45: 75–98.

5. Halstead D.G.H. A revision of the genus *Oryzaephilus* Ganglbauer, including descriptions of related genera (Coleoptera: Silvanidae). *Zoological Journal of the Linnaean Society*. 1980; 69: 271–374.

6. Udo Schmidt. *Oryzaephilus surinamensis* (Linne, 1758). URL: <http://flickr.com/photos/coleoptera-us/14438947353/in/photostream/lightbox/> (last accessed: 09.12.2020).

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Sergey Kurbatov, PhD in Biology, Head of Entomological Research and Methodology Department, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia.

Оптимизированный подход к выявлению нематод рода *Heterodera* и карантинного вида *Heterodera glycines*

А.В. ИВАНОВ¹, С.В. СУДАРИКОВА²,
Е.А. ХУДЯКОВА³
ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»
(ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское,
Московская обл., Россия
¹ e-mail: tonijons8@mail.ru
² e-mail: sudarikovah@mail.ru
³ e-mail: fer59@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Проведены апробирование и оптимизация тестов на основе полимеразной цепной реакции с использованием коммерческих наборов реагентов российского производства для выделения и амплификации ДНК соевой цистообразующей нематоды *Heterodera glycines* Ichinohe в формате классической ПЦР. Подтверждена пригодность отечественных коммерческих наборов для данного исследования.
Ключевые слова. Карантин растений, соевая цистообразующая нематода *Heterodera glycines* Ichinohe, морфологические признаки, морфометрия, молекулярно-генетические методы, полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование.
Для корреспонденции. Иванов Антон Владиславович, младший научный сотрудник лаборатории гельминтологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР», 140150, Россия, Московская обл., г. Раменское, р. п. Быково, ул. Пограничная, 32, e-mail: tonijons8@mail.ru.



ВВЕДЕНИЕ

оя является ценным ингредиентом пищевых продуктов и кормов, важнейшим компонентом многих фармацевтических препаратов и косметических средств. Популярность этой культуры связана в первую очередь с высокой концентрацией белка, который содержится в бобах (в среднем около 40% от массы семени), и достаточно высокой урожайностью. Общая площадь под соей в мире в 2019 г. составила 122 млн га, мировое производство достигло 336 млн тонн. Более 80% мирового производства сои приходится на 3 страны: США, Бразилию и Аргентину.

Optimized Approach for the Detection of *Heterodera* spp. and the Quarantine Species *Heterodera glycines*

A.V. IVANOV¹, S.V. SUDARIKOVA²,
E.A. KHUDYAKOVA³
All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU “VNIICR”),
Bykovo, Ramenskoye,
Moscow region, Russia
¹ e-mail: tonijons8@mail.ru
² e-mail: sudarikovah@mail.ru
³ e-mail: fer59@mail.ru

ABSTRACT

The approbation and optimization of PCR tests using Russian commercial reagents kits for the DNA extraction and amplification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* Ichinohe in classic PCR format has been carried out. The suitability of Russian commercial kits for this study has been confirmed.
Key words. Plant quarantine, soybean cyst nematode *Heterodera glycines* Ichinohe, morphological characteristics, morphometry, molecular genetic methods, polymerase chain reaction (PCR), sequencing.
For correspondence. Anton Ivanov, Junior Researcher of Helminthology Laboratory of FGBU “VNIICR” Test Laboratory Center, 140150, Russia, Moscow region, Ramenskoye, Bykovo, Pogranichnaya str. 32, e-mail: tonijons8@mail.ru.

INTRODUCTION

Soy is a valuable ingredient of food and forage, a major component of many pharmaceuticals and cosmetics. This culture's popularity is mainly accounted for by high protein concentration in beans (about 40% of the seed mass on average), and a fairly high yield. The total area of soybeans cultivation in the world in 2019 amounted to 122 million hectares, the world production reached 336 million tons. Over 80% of the

На долю России в мировом производстве сои в 2019 г. приходилось около 1,3%. Россия обладает существенными возможностями для развития соевой отрасли: располагает агроклиматическими, земельными, водными ресурсами, уникальным сортовым потенциалом и многолетним опытом возделывания сои.
Ведущая роль в производстве сои в Российской Федерации принадлежит Дальневосточному федеральному округу (Приморский, Хабаровский края, Амурская область), где размещается более 88% посевов сои и производится более 86% ее валового сбора в стране.
Heterodera glycines Ichinohe – соевая цистообразующая нематода, которая наносит огромный ущерб урожаю сои и других бобовых культур. Впервые была обнаружена в Японии и Корее в 1915 г. В 1952 г. нематода была описана исследователем Ichinohe на острове Хоккайдо [1, 2]. *H. glycines* широко распространена в большинстве стран, где производство сои является основой сельскохозяйственной деятельности, особенно в странах Азии.
В мире 10% сельскохозяйственной продукции сои теряется из-за повреждений соевой нематодой, что составляет 1/3 потерь от вредителей и болезней [3, 4]. В 2014 г. *H. glycines* была включена в Перечень карантинных объектов Российской Федерации и затем, в 2016 г., внесена в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза [5, 6]. В настоящее время соевая нематода ограничено присутствует на территории России в Дальневосточном федеральном округе. С целью пополнения научной коллекции нематод, изучения объекта и разработки методов его идентификации в 2016–2019 гг. состоялись научно-исследовательские экспедиции Всероссийского центра карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР») на Дальний Восток России.
Симптомы поражения растений соевой цистообразующей нематодой на надземной части неспецифичны, их можно спутать с дефицитом питательных веществ (особенно с дефицитом железа), стрессом от засухи или другими заболеваниями. Они проявляются в замедлении и отставании в росте растений, пожелтении листьев, снижении урожайности семян. Подобные симптомы наблюдали во время экспедиции на посевах сои (рис. 1). На корнях таких растений было отмечено образование самок с яйцевыми мешками, а также снижение количества клубеньков и появление дополнительных корешков (рис. 2, 3).
Внешние признаки угнетения на отдельных растениях сои и появление очагов пожелтевших растений могут быть основанием для проведения обследований на наличие нематоды. Иногда такие участки пораженных растений были расположены по краю поля, часто в местах, где заезжала техника. Наиболее сильно страдали растения в центре пораженного участка.
Исходя из биологии объекта, оптимальным представляется обследование на присутствие соевой нематоды в период вегетации с отбором растений сои с корневой системой для дальнейшего анализа.
Цикл развития *H. glycines* типичен для всех видов цистообразующих нематод. Для соевой нематоды характерен половой диморфизм: самки лимоновидные, белого цвета, самцы прозрачные

world soybeans production is concentrated in 3 countries: the USA, Brazil and Argentina.
In 2019, Russia's proportion of the soybean production in the world accounted for about 1.3%. Russia has significant opportunities for the soybean industry development: agroclimatic, land, water resources, unique variety potential and many years of experience in soybean cultivation.
The leader of the soybeans production in the Russian Federation is the Far Eastern Federal District (Primorsky Krai, Khabarovsk Krai, Amur Region), where more than 88% of soybean crops are located and more than 86% of its gross harvest in the country is produced.
Heterodera glycines Ichinohe, 1952, is the soybean cyst nematode, which causes great damage to the soybean and other Fabaceae crops. It was first detected in Japan and Korea in 1915. In 1952 the nematode was described on the island of Hokkaido by the researcher Ichinohe [1, 2]. *H. glycines* is widespread in most countries where soybean production is the basis of agricultural activity, especially in Asia.
10% of the world's agricultural soybean production is lost because of the soybean cyst nematode, which amounts to 1/3 of the losses caused by pests and diseases [3, 4]. In 2014, *H. glycines* was included in the Quarantine Pest List of the Russian Federation and then in 2016 it was included in the Common List of Plant Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union [5, 6]. At present, soybean cyst nematode is limitedly present in Russia's Far Eastern Federal District. To develop the scientific nematode collection, study the object and develop methods for its identification, in 2016–2019 All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU “VNIICR”) sent scientific expeditions to Russia's Far East.
The symptoms of plants' damage by soybean cyst nematode on the aerial parts are non-specific, they can be confused with nutritional deficiencies (especially iron deficiency), drought stress, or other diseases. They manifest themselves in slow and irregular plant growth, yellowing of leaves, and a decrease in seed yield. Such symptoms were observed during an expedition to soybean crops (Fig. 1). On the roots of such plants, the formation of females with egg sacs was noted, as well as a decrease in the number of tubercles and the appearance of additional roots (Fig. 2, 3).
External signs of inhibition on individual soybean plants and the appearance of yellowed plants foci may be the basis for surveys for the nematode presence. Sometimes such areas of infected plants were located at the edge of the field, often in places where vehicles entered. Plants in the center of the affected area were infected the most.
According to the biology of the object, the best option is to conduct the examination for the soybean nematodes presence during the growing season selecting soybean plants with root systems for the further studies.
The development cycle of *H. glycines* is common for all cyst nematode species. Soybean nematode is characterized by sexual dimorphism: females are lemon-shaped, white, males are transparent and vermiform. The nematode remains in the stage of eggs and larvae



Рис. 1. Очаги поражения сои нематодой *Heterodera glycines* на Дальнем Востоке России (Приморский край) (фото А.В. Иванова)

Fig. 1. The foci of soybean syst nematode *Heterodera glycines* infection in the Far East of Russia (Primorsky Krai) (photo by A.V. Ivanov)

и червеобразные. Нематода сохраняется в стадии яиц и личинок, находящихся в цистах. Весной личинки инвазируют молодые корни, питаются и превращаются в самок и самцов. Самки остаются в корне, а самцы выходят в почву, оплодотворяют самок и погибают. Самки откладывают яйца в яйцевой мешок или внутри тела (рис. 2, 3). Внутренние органы самок после вызревания внутри них яиц отмирают, кутикула самки утолщается, затвердевает и приобретает коричневый цвет (рис. 4). Такие отмершие самки с яйцами внутри называются цистами. Цисты являются источником инфекции. За вегетационный период может развиваться от 3 до 5 поколений соевой нематоды. Признаки поражения соевой нематодой появляются примерно через 2 месяца после посева [7].

Диагностика *H. glycines* основывается на морфологическом и молекулярном методах. Постоянное совершенствование молекулярных методов требует новых подходов к разработке диагностических протоколов по выявлению и идентификации. Для диагностики цистообразующих нематод рода *Heterodera* используются те же молекулярные методы, что и для большинства других видов нематод, включая полиморфизм длин рестрикционных фрагментов ПЦР-ПДРФ (PCR-RFLP), ПЦР с видоспецифическими праймерами, ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR), а также методы частичного секвенирования (определение нуклеотидной последовательности) ДНК.

В настоящее время молекулярные методы приобретают особое значение, так как в подкарантинной продукции достаточно часто выявляются цисты нематод рода *Heterodera*, которые морфологически очень схожи между собой, например нематоды одной группы. Проведение исследований морфологическим методом в этом случае бывает затруднительно.

Целью исследования являлось испытание и оптимизация способов подготовки проб и тестов

in cysts. In spring, larvae invade young roots, feed and develop to females and males. Females remain in the root, while the males go out into the soil, fertilize the females and die. Females lay eggs in an egg sac or inside the body (Fig. 2, 3). The internal organs of females die off after the eggs inside them mature, the female's cuticle thickens, hardens and turns brown (Fig. 4). Such dead females with eggs inside are called cysts. Cysts are the source of infection. During the growing season, 3 to 5 generations of soybean cyst nematodes can develop. The signs of soybean cyst nematode infection appear approximately 2 months after planting [7].

The diagnosis of *H. glycines* is based on morphological and molecular methods. The constant improvement of molecular methods requires new approaches



Рис. 2. Самки соевой нематоды *Heterodera glycines* на корнях сои (фото А.В. Иванова)

Fig. 2. Female of soybean cyst nematode *Heterodera glycines* on soybean roots (photo by A.V. Ivanov)



Рис. 3. Циста соевой нематоды *Heterodera glycines* с яйцевым мешком на корнях сои (фото А.В. Иванова)

Fig. 3. Cyst of soybean cyst nematode *Heterodera glycines* with an egg sac on soybean roots (photo by A.V. Ivanov)

классической ПЦР с доступными отечественными коммерческими наборами для эффективной идентификации соевой цистообразующей нематоды, в том числе с использованием специфических праймеров. В настоящее время российские компании предлагают широкий набор реагентов для выделения ДНК и амплификации. В частности, ООО «Синтол» (Россия) предлагает набор для выделения нуклеиновых кислот из тканей животных «ДНК-Экстран-2». Базовые комплекты для проведения амплификации, содержащие все необходимые компоненты, за исключением видоспецифических олигонуклеотидов, предлагают ООО «Синтол», ЗАО «Евроген» (Россия), ООО «АгроДиагностика» (Россия), ЗАО «Диалат Лтд.» (Россия) [8, 9, 10, 11]. Видоспецифические олигонуклеотиды изготавливает ООО «Биотехиндустрия» (Lumiprobe), ЗАО «Евроген», ООО «Синтол».

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оптимизировать тесты на основе классической ПЦР с праймерами, разработанными Hu et al. (2002) и Subbotin et al. (2001) [12, 13]. В рамках этой задачи провести тестирование нематод группы *Schachtii*, сходных между собой морфологически.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в лаборатории гельминтологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР». При проведении исследований использовали цисты *H. glycines* в количестве 10 штук, собранные во время экспедиции на Дальний Восток России с растений сои (рис. 5), а также цисты свекловичной *Heterodera schachtii* и люцерновой *Heterodera medicaginis* цистообразующих нематод, полученные из лабораторной коллекции. Перед выделением ДНК провели идентификацию используемых для исследования нематод морфологическим методом согласно МР ВНИИКР № 32-2015 «Методические

to the development of diagnostic protocols for detection and identification. *Heterodera* spp. cyst nematodes diagnosis involves the same molecular methods as those used for many other nematode species, including restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), PCR with species-specific primers, real-time PCR (R-T PCR), as well as methods of DNA partial sequencing (determination of the nucleotide sequence).

Molecular methods are becoming more important as *Heterodera* spp. nematode cysts are quite often detected on regulated products. Morphologically they are quite similar, e. g. nematodes belonging to one group. In this case, conducting research by the morphological method can be difficult.

The aim of the research was testing and optimizing sample preparation methods and classic PCR methods with available Russian commercial kits for the effective identification of soybean cyst nematode, including the use of specific primers. Currently, Russian companies offer a wide range of reagents for DNA extraction and amplification. For example, Syntol (Russia) offers a kit for the isolation of nucleic acids from animal tissues "DNA-Extran-2". Basic kits for carrying out amplification, containing all the necessary components, with the exception of species-specific oligonucleotides, are offered by Syntol, Evrogen (Russia), Agro-Diagnostica (Russia), Dialat Ltd. (Russia) [8, 9, 10, 11]. Species-specific oligonucleotides are produced by Biotechindustria (Lumiprobe), Evrogen and Syntol.

OBJECTIVES OF THE RESEARCH

Optimize tests based on classical PCR with primers designed by Hu et al. (2002) and Subbotin et al. (2001) [12, 13]. As part of this task, test morphologically similar *Schachtii* spp. nematodes.

MATERIALS AND METHODS

The work was carried out in Helminthology Laboratory of FGBU "VNIICR" Testing Laboratory Center. The research involved 10 cysts of *H. glycines* collected during an expedition to the Russian Far East from soybean plants (Fig. 5), as well as the cysts of beet cyst nematode



Рис. 4. Циста соевой нематоды *Heterodera glycines* с яйцевым мешком и самка (фото С.В. Судариковой)

Fig. 4. Cyst of soybean cyst nematode *Heterodera glycines* with an egg sac and a female (photo by S.V. Sudarikova)

рекомендации по выявлению и идентификации соевой нематоды *Heterodera glycines* (Ichinohe)» [14].

MORFOЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРЕД ВЫДЕЛЕНИЕМ ДНК

Каждую цисту разрезали, вычищали содержимое в каплю воды и определяли под микроскопом жизнеспособность. Для проведения морфологического анализа изготавливали препараты анально-вulварных пластинок, а оставшуюся половинку цисты помещали в пробирку для последующего молекулярного анализа.

Для анализа молекулярными методами отбирали цисты *H. glycines*, содержащие жизнеспособные яйца и личинки, так как это гарантирует достоверный результат. Жизнеспособные личинки имели типичную червеобразную форму тела и ненарушенную структуру внутренних органов.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Для проведения тестов классической ПЦР использовали коммерческий набор 5x ScreenMix производства ЗАО «Евроген» (окрашенная смесь для постановки амплификации с последующим внесением продуктов в гель) и олигонуклеотиды, изготовленные по заказу в ЗАО «Евроген».

Тестирование молекулярными методами проводили по Hu et al. (2002) и Subbotin et al. (2001) [12, 13].

В качестве положительного контроля использовали ДНК *H. glycines* из лабораторной коллекции.

ПОДГОТОВКА ПРОБ И ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК НЕМАТОДЫ

Выделение ДНК из образцов цист гомогенизацией и нагреванием до температуры денатурации белка в ТЕ-буфере проводили согласно СТО ВНИИКР 6.001-2010 для FLASH-PCR [15]. Гомогенизацию цист с помощью встряхивателя MagNa Lyser (ROCHE, Швейцария) в ТЕ-буфере проводили способом, отработанным в лаборатории гельминтологии и опубликованным ранее: объем боросиликатных шариков – 0,5 мл, объем раствора – 110 мл, режим встряхивания – 60 сек при скорости 3000 об/мин [16].

Выделение ДНК коммерческим набором «ДНК-Экстран-2» (ООО «Синтол») проводили согласно инструкции производителя. Цисты гомогенизировали пестиком в микропробирке объемом 1,5 мл в лизирующем растворе объемом 300 мкл [8].

ИССЛЕДОВАНИЕ ДНК НЕМАТОДЫ МЕТОДОМ КЛАССИЧЕСКОЙ ПЦР ПО HU ET AL., 2002 [12]

При проведении исследований использовали следующие праймеры: прямой универсальный праймер JB3 (5’ – TTTTGTGGGCATCCTGAGTTTAT – 3’) и обратный универсальный праймер JB5 (5’ – AGCASCATAAACTTAAACATAATGAAAATG – 3’), которые амплифицируют фрагмент 400 bp, характерный для всех видов нематод рода *Heterodera*. Данный метод использовали для сравнения способов выделения ДНК.

Состав рабочей смеси в ходе исследования был оптимизирован: увеличен объем праймеров и totalной ДНК по сравнению с рекомендуемым



Рис. 5. Цисты и самки Heterodera glycines, отобранные для анализа (фото А.В. Иванова, С.В. Судариковой)

Heterodera schachtii and alfalfa cyst nematode *Heterodera medicaginis* obtained from the laboratory collection. Before DNA extraction, the nematodes used for the study were identified by the morphological method according to MR VNIKR № 32-2015 “Methodological recommendations for the detection and identification of soybean cyst nematode *Heterodera glycines* Ichinohe” [14].

MORPHOLOGICAL EXAMINATION PRIOR TO DNA EXTRACTION

Each cyst was cut open, the contents were cleaned out in a drop of water and the viability was determined under the microscope. For morphological analysis, slides with vulval-anal plates were made, and the remaining half of the cyst was placed in a test tube for further molecular analysis.

H. glycines cysts containing viable eggs and larvae were selected for the analysis by molecular methods as this guarantees a reliable result. Viable larvae had a typical vermiform body shape and an intact structure of internal organs.

MOLECULAR GENETIC STUDY

For classic PCR tests, a commercial kit 5x ScreenMix by Evrogen (colored mixture for setting amplification followed by adding products to the gel) and oligonucleotides custom made by Evrogen were used.

Molecular testing was carried out according to Hu et al. (2002) and Subbotin et al. (2001) [12, 13].

H. glycines DNA from the laboratory collection was used as a positive control.

SAMPLE PREPARATION AND EXTRACTION OF NEMATODE DNA

DNA extraction from cyst samples by homogenization and heating to the protein denaturation temperature in TE buffer was done according to STO VNIKR 6.001-2010 for FLASH-PCR [15]. Homogenization of cysts with MagNa Lyser (ROCHE, Switzerland) in TE buffer was carried out by the method previously tested in the helminthology laboratory: borosilicate beads volume – 0.5 µl, solution volume – 110 µl, shaking mode – 60 sec at a speed of 3000 rpm [16].

Таблица Морфометрические характеристики исследуемых цист (мкм)

Шифр образца	Цисты		
	Длина фенестры	Ширина фенестры	Длина вульварной щели
1	56,0	24,0	46,0
2	49,1	32,8	48,8
3	42,0	30,2	48,5
4	47,3	29,0	46,1
5	49,0	28,0	47,5
6	52,0	27,3	47,3
7	49,8	29,7	48,4
8	51,1	26,2	46,2
9	49,6	30,4	47,2
10	47,9	31,6	46,9
Среднее значение	49,4 ± 3,6 (42,0–56,0)	28,9 ± 2,6 (24,0–32,8)	47,3 ± 1,0 (46,0–48,8)

авторами: 5x ScreenMix – 5 мкл, JB3 – 1 мкл, JB5 – 1 мкл, H₂O – 14 мкл, образец ДНК (исследуемый образец) – 4 мкл. Всего 25 мкл.

Режим амплификации: 15 мин при 95 °С, 40 циклов (по 1 мин при 95 °С, по 1,5 мин при 41 °С, по 2 мин при 72 °С), окончательная элонгация – 10 мин при 72 °С. Амплификацию проводили в амплификаторе CFX96 Bio-Rad.

Анализ фрагментов ДНК проводили с помощью метода горизонтального электрофореза в 1,5%-м агарозном геле.

ИССЛЕДОВАНИЕ ДНК НЕМАТОДЫ МЕТОДОМ КЛАССИЧЕСКОЙ ПЦР ПО SUBBOTIN ET AL., 2001 [13]

При проведении исследований использовали следующие праймеры: прямой видоспецифичный праймер GlyF1 (5’ – TTACGGACCGTAACTCAA – 3’) и обратный универсальный праймер rDNA2 (5’ – TTTCACTCGCCGTTACTAAGG – 3’), амплифицирующие фрагмент 181 bp, что соответствует виду *H. glycines*. С целью проверки специфичности праймеров тестировали следующие виды, близкие между собой морфологически и относящиеся к одной группе *Schachtii*: *H. glycines*, *H. schachtii*, *H. medicaginis*.

Состав рабочей смеси в ходе исследования был оптимизирован: увеличен объем праймеров и totalной ДНК по сравнению с рекомендуемой авторами: 5x ScreenMix – 5 мкл, GlyF1 – 1 мкл, rDNA2 – 1 мкл, H₂O – 14 мкл, образец ДНК (исследуемый образец) – 4 мкл. Всего 25 мкл.

Режим амплификации: 4 мин при 94 °С, 35 циклов (по 30 сек при 94 °С, по 30 сек при 55 °С, по 1,5 мин при 72 °С), окончательная элонгация – 10 мин при 72 °С. Амплификацию проводили в амплификаторе CFX96 Bio-Rad.

DNA extraction with the commercial kit “DNA-Extran-2” (Syntol) was carried out according to the producer’s instructions. Cysts were homogenized with a pestle in a 1.5 ml microtube in a lysis solution with a volume of 300 µl [8].

STUDY OF NEMATODE DNA BY CLASSICAL PCR ACCORDING TO HU ET AL., 2002 [12]

The following primers were used in the studies: forward universal primer JB3 (5’ – TTTTGTGGGCATCCTGAGTTTAT – 3’) and reverse universal primer JB5 (5’ – AGCACCTAAACTTAAACATAATGAAAATG – 3’) which amplify the fragment 400 bp typical of all *Heterodera* spp. nematodes. This method was used to compare methods of DNA extraction.

The composition of the PCR mix during the study was optimized: the volume of primers and total DNA increased in comparison with that recommended by the authors: 5x ScreenMix – 5 µl, JB3 – 1 µl, JB5 – 1 µl, H₂O – 14 µl, DNA sample (studied sample) – 4 µl. In total – 25 µl.

Amplification mode: 15 min at 95 °C, 40 cycles (1 min at 95 °C, 1.5 min at 41 °C, 2 min at 72 °C), final elongation – 10 min at 72 °C. Amplification was carried out in the amplifier CFX96 Bio-Rad.

The analysis of DNA fragments was carried out using the method of horizontal electrophoresis in 1.5% agarose gel.

STUDY OF NEMATODE DNA BY CLASSICAL PCR ACCORDING TO SUBBOTIN ET AL., 2001 [13]

The following primers were used in the studies: forward species-specific primer GlyF1 (5’ – TTACG-GACCGTAACTCAA – 3’) and reverse universal primer rDNA2 (5’ – TTTCACTCGCCGTTACTAAGG – 3’)

Table Morphometric characteristics of the studied cysts (µm)

Sample code	Cysts		
	Fenestra length	Fenestra width	Length of vulval slit
1	56.0	24.0	46.0
2	49.1	32.8	48.8
3	42.0	30.2	48.5
4	47.3	29.0	46.1
5	49.0	28.0	47.5
6	52.0	27.3	47.3
7	49.8	29.7	48.4
8	51.1	26.2	46.2
9	49.6	30.4	47.2
10	47.9	31.6	46.9
Average number	49.4 ± 3.6 (42.0–56.0)	28.9 ± 2.6 (24.0–32.8)	47.3 ± 1.0 (46.0–48.8)

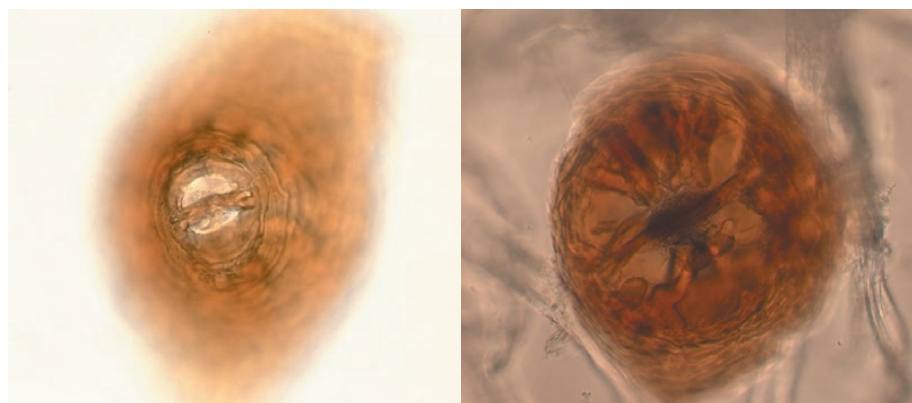


Рис. 6. Анально-вulварная пластинка цисты *Heterodera glycines* (фото А.В. Иванова)

Fig. 6. *Heterodera glycines* cyst vulval-anal plate (photo by A.V. Ivanov)

Анализ фрагментов ДНК проводили с помощью метода горизонтального электрофореза в 1,5%-м агарозном геле.

После проведения электрофорезов проводили секвенирование и биоинформационный анализ фрагментов ДНК. Проверку, выравнивание и редактирование последовательностей выполняли с помощью программного обеспечения BioEdit v.7.0.5.3. Сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с последовательностями базы данных BLAST NCBI [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. На основании проведенных исследований был сделан вывод, что морфологические и морфометрические характеристики исследуемых цист полностью соответствовали виду *Heterodera glycines* (рис. 6, 7; таблица).

Тело личинки червеобразное, с кольчатой кутикулой. Длина личинки около 400 мкм; длина стилета – 21,0–22,8 мкм. Вулварная пластинка амбифенестрального типа. Длина фенестры – $49,4 \pm 3,6$ мкм; длина вулварной щели – $47,3 \pm 1,0$ мкм. Буллы хорошо наблюдаются, они расположены вокруг заднего моста. Форма булл – от круглых до пальцеобразных, различной длины и ширины. Задний мост развит хорошо (рис. 6).

Heterodera glycines входит в группу *Schachtii* и отличается от близких видов по комбинации морфологических и морфометрических признаков. Так, от *H. schachtii* она отличается формой головок стилета инвазионной личинки (слегка выпуклые, против умеренно или сильно вогнутых), более коротким стилетом личинки (21–23 мкм, против 22–26 мкм) и более длинной фенестрой у цист (34–58 мкм, против 32–38 мкм). От *H. medicaginis* отличается более коротким стилетом (21–23 мкм, против 25 мкм) и хвостом (39–51 мкм, против 52 мкм) у личинок второго возраста.

2. Исследование с универсальными праймерами JB3/JB5 показало, что способ выделения ДНК с помощью набора «ДНК-Экстран-2» (ООО «Синтол») (образцы 1–5) лучше по сравнению со способом выделения в ТЕ-буфере (образцы 6–10). Интенсивность свечения образцов 1–5 на фореграмме выше.

Результаты электрофореза показали, что исследуемые объекты являются нематодами рода *Heterodera*, размер ампликона – 400 bp (рис. 8).

sample (studied sample) – 4 µl. In total – 25 µl.

Amplification mode: 4 min at 94 °C, 35 cycles (30 sec at 94 °C, 30 sec at 55 °C, 1.5 min at 72 °C), final elongation – 10 min at 72 °C. Amplification was carried out in the amplifier CFX96 Bio-Rad.

The analysis of DNA fragments was carried out using the method of horizontal electrophoresis in 1.5% agarose gel.

After electrophoresis, sequencing and bioinformatic analysis of DNA fragments were performed. Validation, alignment and editing of sequences was performed using the software BioEdit v.7.0.5.3. The comparative analysis of the obtained sequences was carried out with the sequences of the database BLAST NCBI [17].

RESULTS AND DISCUSSION

1. The conducted research has led to the conclusion that the morphological and morphometric characteristics of the studied cysts totally corresponded to the species *Heterodera glycines* (Fig. 6, 7; Table).

The larva body is vermiform, with ringed cuticle. Larva length about 400 µm; stylet length – 21.0–22.8 µm. Vulval region ambiphenestral. Fenestra length – 49.4 ± 3.6 µm; vulval slit length – 47.3 ± 1.0 µm.

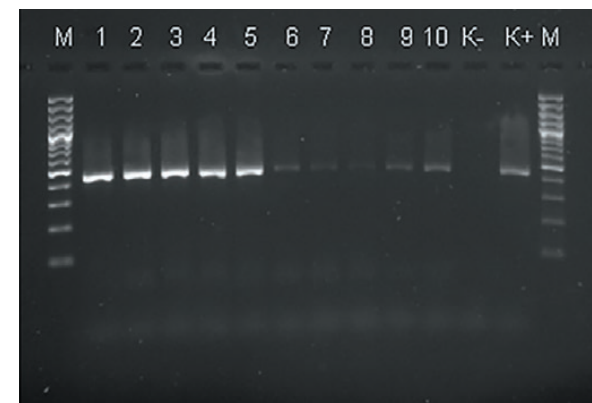


Рис. 7. Головная (передняя) часть личинки *Heterodera glycines* (фото С.В. Судариковой)

Fig. 7. The head (anterior) part of the *Heterodera glycines* larva (photo by S.V. Sudarikova)

which amplify the fragment 181 bp, which corresponds to the species *H. glycines*. In order to check the specificity of primers, the following species, morphologically close to each other and belonging to the same group *Schachtii*: *H. glycines*, *H. schachtii*, *H. medicaginis*, were tested.

The composition of the PCR mix during the study was optimized: the volume of primers and total DNA increased in comparison with that recommended by the authors: 5x ScreenMix – 5 µl, GlyF1 – 1 µl, rDNA2 – 1 µl, H₂O – 14 µl, DNA



Способы выделения ДНК: 1–5 – при помощи набора «ДНК-Экстран-2»; 6–10 – в ТЕ-буфере. М – маркер; К⁻ – отрицательный контроль (дистиллированная вода); К⁺ – контроль *H. glycines*

Рис. 8. Результаты ПЦР с универсальными праймерами JB3/JB5 и разными способами пробоподготовки

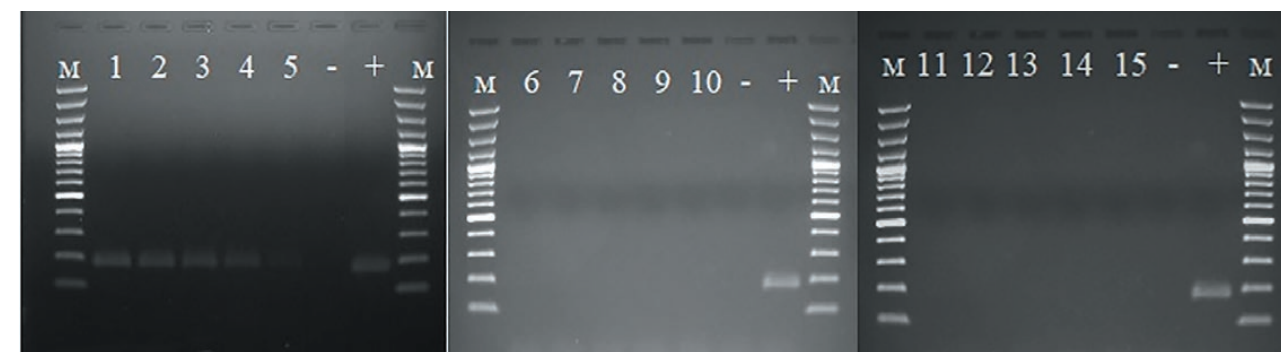
DNA extraction methods: 1–5 – using the kit “DNA-Extran-2”; 6–10 – in TE buffer. M – marker; K⁻ – negative control (distilled water);

K⁺ – control of *H. glycines*

Fig. 8. PCR results with universal primers JB3/JB5 and different methods of sample preparation

Результаты классической ПЦР были дополнительно подтверждены методом секвенирования. Во всех исследуемых образцах – соевая цистообразующая нематода *H. glycines*, процент покрытия и идентичности составляет 99–100%.

3. Исследование пары праймеров – универсального rDNA2 и видоспецифичного для *H. glycines* GlyF1 – на 3 видах нематод рода *Heterodera* дало положительный результат. Амплификация прошла только в образцах *H. glycines* (181 bp), что подтверждает специфичность праймеров. Однако, интенсивность свечения на фореграмме образцов *H. glycines* невысокая. В образцах близких видов *H. schachtii* и *H. medicaginis* амплификации не наблюдалось (рис. 9).



Образцы 1–5 – *Heterodera glycines*; 6–10 – *Heterodera schachtii*; 11–15 – *Heterodera medicaginis*. «-» – отрицательный контроль (дистиллированная вода); «+» – положительный контроль *H. glycines*

Рис. 9. Результаты ПЦР с праймерами GlyF1/rDNA2

Bullae are clearly seen; they are placed around the vulval bridge. Bullae shape – from round to finger-shaped, of various lengths and widths. Vulval bridge is well-developed (Fig. 6).

Heterodera glycines belongs to *Schachtii* and differs from close species by a combination of morphological and morphometric characters. Thus, it differs from *H. schachtii* by the shape of the stylet heads of the invasive larva (weakly convex against moderately or strongly concave), a larva's shorter stylet (21–23 µm, against 22–26 µm) and a longer fenestra in cysts (34–58 µm, against 32–38 µm). It differs from *H. medicaginis* by a shorter stylet (21–23 µm, against 25 µm) and a tail (39–51 µm, against 52 µm) in second instar larvae.

2. The study with universal primers JB3/JB5 showed that the DNA extraction method using the “DNA-Extran-2” kit (Syntol) (samples 1–5) is better compared to the extraction method in TE buffer (samples 6–10). The luminescence intensity of samples 1–5 on the foregram is higher.

The electrophoresis results showed that the studied objects are *Heterodera* spp. nematodes, amplicon size – 400 bp (Fig. 8).

The results of classical PCR were additionally confirmed by sequencing. All the studied samples were the soybean cyst nematode *H. glycines*, the percentage of coverage and identity is 99–100%.

3. Study of a pair of primers – universal rDNA2 and species-specific for *H. glycines* GlyF1 – on 3 *Heterodera* species nematodes gave a positive result. Amplification took place only in samples *H. glycines* (181 bp), which confirms the specificity of the primers. However, the luminescence intensity on the foregram of the *H. glycines* samples is not high. In close species *H. schachtii* and *H. medicaginis* samples there was no amplification (Fig. 9).

The research results show that the method Subbotin et al. (2001) [13] after adjusting it to increase the glow intensity and validate it, can be used to identify the quarantine species *Heterodera glycines* and can be included in the new Methodological recommendations for the detection and identification of *Heterodera glycines*.

Результаты исследования показывают, что метод Subbotin et al. (2001) [13], после его корректировки с целью увеличения интенсивности свечения и его валидации, возможно применять при идентификации карантинного вида *Heterodera glycines* и включить в новые Методические рекомендации по выявлению и идентификации *Heterodera glycines*.

ВЫВОДЫ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований был сделан вывод, что морфологические и морфометрические характеристики исследуемых цист полностью соответствовали виду *Heterodera glycines*. Все способы выделения ДНК, описанные в работе, подходят для классического метода ПЦР. Наиболее эффективным для выделения ДНК соевой цистообразующей нематоды *Heterodera glycines* признан набор «ДНК-Экстран-2» (ООО «Синтол»). Метод классической ПЦР Subbotin et al. (2001) с применением готовых отечественных коммерческих наборов 5x ScreenMix ЗАО «Евроген» и праймеров GlyF1 и rDNA2 можно использовать при проведении лабораторных исследований. Предложенный состав рабочей смеси пригоден для использования описанным методом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. EPPO Global Database, 2020. – URL: <https://gd.eppo.int> (дата обращения: 01.09.2020).
 2. Ichinohe M. 1952. On the soy bean nematode, *Heterodera glycines* n. sp., from Japan // *Oyo-Dobutsugaku-Zasshi*. – Vol. 17, No. 1–2. – P. 1–4.
 3. Волкова Т.В. Соевая нематода (Tylenchida: Heteroderidae: *Heterodera glycines*) в Приморском крае. – Владивосток: Дальнаука, 2003. – 91 с.
 4. Qing Yu. Soybean Cyst Nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe) // In: Soybean Physiology and Biochemistry / Prof. Hany El-Shemy (Ed.). – InTech, 2011. – 488 p.
 5. Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза, утвержденный Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 30.11.2016 № 158. С изменениями и дополнениями от 30.03.2018 (изменения от 02.05.2018 – Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 30.03.2018 № 25). – 2018.
 6. Перечень карантинных объектов, утвержденный приказом Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 15.12.2014 № 501.
 7. Буторина Н.Н., Зиновьева С.В., Кулинич О.А. и др. Прикладная нематология / Ин-т паразитологии РАН. – Москва: Наука, 2006. – 350 с.
 8. Официальный сайт компании «Синтол». – URL: <https://www.syntol.ru> (дата обращения: 03.09.2020).
 9. Официальный сайт компании «Евроген». – URL: <http://evrogen.ru> (дата обращения: 03.09.2020).
 10. Официальный сайт компании «АгроДиагностика». – URL: <https://www.agrodiagnostica.ru> (дата обращения: 03.09.2020).
 11. Официальный сайт компании «Диалат Лтд.». – URL: <http://dialat.ru> (дата обращения: 03.09.2020).
 12. Hu M., Hoglund J. Mutation scanning analysis of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 reveals limited gene flow among bovine lungworm subpopulations in Sweden // *Electrophoresis*. – 2002. – Vol. 23, No. 19. – P. 3357–3363.

CONCLUSION

The conducted research has led to the conclusion that the morphological and morphometric characteristics of the studied cysts totally corresponded to the species *Heterodera glycines*. All the methods of DNA extraction described in the work are suitable for the classical PCR method. The kit “DNA-Extran-2” (Syntol) was the most effective for the DNA extraction of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. The classic PCR method by Subbotin et al. (2001) using the ready-made Russian commercial kits 5x ScreenMix (Evrogen) and primers GlyF1 and rDNA2 can be applied for laboratory research. The proposed composition of the PCR mix is suitable for use by the described method.

REFERENCES

1. EPPO Global Database, 2020. URL: <https://gd.eppo.int> (last accessed: 01.09.2020).
 2. Ichinohe M. On the soy bean nematode, *Heterodera glycines* n. sp., from Japan. *Oyo-Dobutsugaku-Zasshi*. 1952; 17 (1–2): 1–4.
 3. Volkova T.V. Soybean nematode (Tylenchida: Heteroderidae: *Heterodera glycines*) in the Primorsky Krai [Soyevaya nematoda (Tylenchida: Heteroderidae: *Heterodera glycines*) v Primorskom Krae]. Vladivostok: Dalnauka, 2003. 91 pp. (In Russian.)
 4. Qing Yu. Soybean Cyst Nematode (*Heterodera glycines* Ichinohe). In: Soybean Physiology and Biochemistry. Prof. Hany El-Shemy (Ed.). InTech, 2011. 488 p.
 5. Common List of Plant Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union approved by the Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission as of 30.11.2016 № 158. As amended and supplemented from 03/30/2018 (changes from 05/02/2018 – Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission from 03/30/2018, No. 25). 2018. (In Russian.)
 6. The List of Quarantine Objects approved by order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation dated December 15, 2014, № 501. (In Russian.)
 7. Butorina N.N., Zinovieva S.V., Kulinich O.A. et al. Applied Nematology [Prikladnaya nematologiya]. RAS Institute of Parasitology. Moscow: Nauka, 2006. 350 p. (In Russian.)
 8. Syntol company official website. URL: <https://www.syntol.ru> (last accessed: 03.09.2020). (In Russian.)
 9. Evrogen company official website. URL: <http://evrogen.ru> (last accessed: 03.09.2020). (In Russian.)
 10. AgroDiagnostica company official website. URL: <https://www.agrodiagnostica.ru> (last accessed: 03.09.2020). (In Russian.)
 11. Dialat Ltd. company official website. URL: <http://dialat.ru> (last accessed: 03.09.2020). (In Russian.)
 12. Hu M., Hoglund J. Mutation scanning analysis of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 reveals limited gene flow among bovine lungworm subpopulations in Sweden. *Electrophoresis*. 2002; 23 (19): 3357–3363.
 13. Subbotin S., Peng D., Moens M. A rapid method for the identification of the soybean cyst nematode

13. Subbotin S., Peng D., Moens M. A rapid method for the identification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* using duplex PCR // *Nematology*. – 2001. – Vol. 3, No. 4. – P. 365–371.
 14. МР ВНИИКР № 32-2015 «Методические рекомендации по выявлению и идентификации соевой цистообразующей нематоды *Heterodera glycines* (Ichinohe)».
 15. СТО ВНИИКР 6.001-2010 «Картофельные цистообразующие нематоды *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens и *Globodera pallida* (Stone) Behrens. Методы выявления и идентификации».
 16. Сударикова С.В., Иванов А.В., Худякова Е.А. Совершенствование ПЦР-диагностики золотистой картофельной цистообразующей нематоды *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Skarbilovich // Карантин растений. Наука и практика. – 2019. № 4 (30). – С. 9–22.
 17. Basic Local Alignment Search Tool / NCBI. – URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 03.09.2020).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Иванов Антон Владиславович, младший научный сотрудник лаборатории гельминтологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия.

Сударикова Стелла Валериевна, старший научный сотрудник лаборатории гельминтологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия.

Худякова Елена Анатольевна, заведующая лабораторией гельминтологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР», старший научный сотрудник, р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия.

Heterodera glycines using duplex PCR. *Nematology*. 2001; 3 (4): 365–371.

14. MR VNIIKR № 32-2015 “Methodological recommendations on the detection and identification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* (Ichinohe)”. (In Russian.)

15. STO VNIIKR 6.001-2010 “Potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens and *Globodera pallida* (Stone) Behrens. Detection and identification methods”. (In Russian.)

16. Sudarikova S.V., Ivanov A.V., Khudiakova E.A. PCR Diagnostics to Enhance Detection of *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Skarbilovich [Sovershenstvovanie PCR-dagnostiki zolotistoy kartofelnoy tsistoobrazuyushey nematody *Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Skarbilovich]. *Plant Health. Research and Practice*. 2019; 4 (30): 9–22. (In Russian.)

17. Basic Local Alignment Search Tool. NCBI. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (last accessed: 03.09.2020).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anton Ivanov, Junior Researcher of Helminthology Laboratory of FGBU “VNIIKR” Testing Laboratory Center, Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia.

Stella Sudarikova, Senior Researcher of Helminthology Laboratory of FGBU “VNIIKR” Testing Laboratory Center, Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia.

Elena Khudyakova, Head of Helminthology Laboratory of FGBU “VNIIKR” Testing Laboratory Center, Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia.

Головневые грибы рода *Tilletia* в фитосанитарных требованиях стран – импортеров российского зерна

Д.А. УВАРОВА¹, Т.А. СУРИНА²

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

¹ e-mail: darya.uvarova.93@mail.ru

² e-mail: t.a.surina@yandex.ru

АННОТАЦИЯ

В статье представлены общие сведения о головневых грибах рода *Tilletia*: распространение, симптомы, морфологические признаки, цикл развития. Головневые грибы являются вредоносными возбудителями болезней зерновых культур, наносящих существенные потери урожаю. Для борьбы с данными фитопатогенами и уточнения их видового состава проводят ежегодные мониторинги, в которых принимают участие сотрудники Всероссийского центра карантина растений (ФГБУ «ВНИИКР»).

Ключевые слова. Головневые грибы, *Tilletia*, экспорт, фитосанитарные требования, мониторинг, пшеница, ячмень, фитопатоген, телиоспоры, сорус.

Для корреспонденции. Уварова Дарья Анатольевна, младший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР», 140150, Россия, Московская обл., г. Раменское, р. п. Быково, ул. Пограничная, 32, e-mail: darya.uvarova.93@mail.ru.



По статистическим данным, Российская Федерация занимает 1-е место в мире по экспорту зерна. Согласно информации International Trade Centre (ITC), в 2018 г. российские предприятия поставили на мировой рынок пшеницы на сумму 8,4 млрд \$, что на 2,6 млрд \$ больше, чем годом ранее. Доходы России от экспорта всех зерновых культур в 2018 г. возросли по сравнению с предыдущим годом [1].

В 2018 г. Россия собрала 113,3 млн тонн зерна, в том числе 72 млн тонн пшеницы. По данным Минсельхоза России, экспорт зерновых в 2017–2018 сельскохозяйственном году превысил 53,4 млн т, включая 40,5 млн т пшеницы, а за 2019 г. и начало 2020 г. экспорт зерна составил 50,5 млн т. Судя

Smut Fungi of the Genus *Tilletia* in Phytosanitary Requirements of Russian Grain Importing Countries

D.A. UVAROVA¹, T.A. SURINA²

All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU "VNIICR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia

¹ e-mail: darya.uvarova.93@mail.ru

² e-mail: t.a.surina@yandex.ru

ABSTRACT

The article provides general information about the smut fungi of the genus *Tilletia*: spread, symptoms, morphological characters and the development cycle. Smut fungi are serious agents of grain crop diseases causing considerable crop losses. To control these phytopathogens and update the list of their species, annual phytosanitary monitoring is carried out, where specialists of the All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU "VNIICR") take part.

Key words. Smut fungi, *Tilletia*, export, phytosanitary requirements, inspection, wheat, barley, phytopathogen, teliospores, sorus.

For correspondence. Daria Uvarova, Junior Researcher of Molecular and Genetic Diagnostic Methods Department of FGBU "VNIICR", 140150, Russia, Moscow region, Ramenskoye, Bykovo, Pogranichnaya str. 32, e-mail: darya.uvarova.93@mail.ru.

According to statistics, the Russian Federation ranks first in the world in grain exports. According to International Trade Centre (ITC), in 2018 the amount of wheat supplied to the world market by Russian enterprises was estimated at \$ 8.4 billion, which is \$ 2.6 billion more than the previous year. Russia's incomes from the export of all grain crops in 2018 increased compared to the previous year [1].

In 2018, Russia harvested 113.3 million tons of grain, including 72 million tons of wheat. According

по данным таможенной статистики ИТС, зерновые в 2018 г. переместились с 6-го на 3-е место главных экспортных товаров России (на первых двух – энергоресурсы и металлургическая продукция). Российское зерно поставляется в 132 страны мира, главными его получателями являются Египет (экспортировано на 1,9 млрд \$), Турция (1,3 млрд \$) и Иран (0,5 млрд \$) [2].

В фитосанитарные требования, которые предъявляют страны-импортеры, входят головневые грибы рода *Tilletia* – наиболее опасные возбудители болезней пшеницы. Возбудитель карликовой головни пшеницы (*Tilletia controversa* Kühn) является карантинным видом для Республики Албания, Азербайджанской Республики, Королевства Бахрейн, Федеративной Республики Бразилия, Арабской Республики Египет, Государства Израиль, Канады, Китайской Народной Республики, Корейской Народно-Демократической Республики, Королевства Марокко, Мексиканских Соединенных Штатов, Республики Мозамбик, Республики Мадагаскар, Монголии, Новой Зеландии, Султаната Оман, Республики Парагвай, Республики Перу, Республики Филиппины, Республики Чили, Демократической Социалистической Республики Шри-Ланка, Южно-Африканской Республики [3]. В 2019 году возбудитель карликовой головни был включен в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза как ограниченно распространенный организм для Российской Федерации. Возбудитель твердой головни пшеницы (*Tilletia caries* (DC.) Tul. & C. Tul.) является карантинным видом для Египта и Мексики, а возбудитель вонючей головни пшеницы (*Tilletia laevis* J.G. Kühn) – для Бразилии [4].

Данные фитопатогены кроме прямых потерь урожая зерна вызывают скрытые, общий ущерб от которых оценивается в 4–5 раз выше. Возбудители головни имеют способность заражения большого числа растений, поэтому в ряде регионов наблюдается поражение посевов на значительных площадях. Грибы рода *Tilletia* в первые годы не дают вспышки заболевания, инфекция накапливается несколько лет, и при благоприятных условиях болезнь достигает максимального развития [5].

Возбудители головневых заболеваний широко распространены по всему миру. В России проводятся фитосанитарные мониторинги на выявление 3 возбудителей головневых заболеваний. Возбудитель твердой головни (*T. caries*) пшеницы имеет широкий ареал: Северо-Запад и Нечерноземную зону России, Урал, Сибирь, Дальний Восток, Казахстан. В южных регионах России *T. caries* замещает близкий вид – *T. laevis*. В Центрально-Черноземном районе вредят оба вида – *T. caries* и *T. laevis* [6].

Вонючая головня (*T. laevis*) поражает пшеницу во всех районах ее возделывания, хотя распространение этого фитопатогена более ограничено, чем *T. caries*. Все же *T. laevis* встречается чаще, чем это обычно регистрируют. Раньше вонючую головню обнаруживали преимущественно в южных регионах (Ростовской, Астраханской, Волгоградской областях, Краснодарском крае, Средней Азии, Сибири), где она замещает *T. caries*. Лишь в Центрально-Черноземном районе оба вида встречаются одновременно [7]. Указанные выше ареалы *T. caries* и *T. laevis* довольно стабильны, поскольку



Рис. 1. Симптомы головневых заболеваний на колосьях пшеницы, отобранных на территории Ставропольского края (фото Д.А. Уваровой)

Fig. 1. Blunt symptoms on wheat ears collected in Stavropol Krai (photo by D.A. Uvarova)

to the Ministry of Agriculture of Russia, grain exports in the 2017–2018 agricultural year exceeded 53.4 million tons, including 40.5 million tons of wheat, and in 2019 and the beginning of 2020, grain exports reached 50.5 million tons. According to ITC customs statistics, grains in 2018 moved from 6th to 3rd place as Russia's main export goods (the first two are energy resources and metallurgical products). Russian grain is exported to 132 countries, its main recipients being Egypt (exported to \$ 1.9 billion), Turkey (\$ 1.3 billion) and Iran (\$ 0.5 billion) [2].

The phytosanitary requirements of the importing countries include the smut fungi of the genus *Tilletia* – the most serious agents of wheat diseases. The agent of dwarf bunt of wheat (*Tilletia controversa* Kühn) is a quarantine species for the Republic of Albania, the Republic of Azerbaijan, the Kingdom of Bahrain, the Federal Republic of Brazil, the Arab Republic of Egypt, the State of Israel, Canada, the People's Republic of China, the Democratic People's Republic of Korea, the Kingdom of Morocco, the United Mexican States, the Republic of Mozambique, the Republic of Madagascar, Mongolia, New Zealand, the Sultanate of Oman, the Republic of Paraguay, the Republic of Peru, the Republic of the Philippines, the Republic of Chile, the Democratic Socialist Republic of Sri Lanka, the Republic of South Africa [3]. In 2019, the dwarf bunt of wheat agent



Рис. 2. Зерновки пшеницы: слева – пораженные твердой головней, справа – здоровые [9]

неоднократные случаи заносов возбудителей в не-свойственные им зоны не приводили к обширному и длительному развитию их в этих зонах [6].

А вот ареал карликовой головни пшеницы на-много меньше. В последние десятилетия на терри-тории Российской Федерации случаи выявления данного фитопатогена зарегистрированы в Юж-ном федеральном округе (в предгорных районах Краснодарского края и в Республике Крым), а также в Северо-Кавказском федеральном округе (в пред-горных районах Ставропольского края (рис. 1)) [6].

Заболевания, вызываемые грибами рода *Tilletia*, проявляются в начале фазы молочной спелости зер-на. Инфицированные растения отличаются низким ростом, а также зараженные колосья несколько сплюснуты и имеют интенсивную сине-зеленую окраску. По мере созревания колосьев эта окраска постепенно утрачивается. При надавливании на зараженные зерновки, находящиеся в фазе молоч-ной спелости, из них выделяется сероватая жид-кость с запахом триметиламина (запах гнилой се-ледки). Пораженные колосья более плотные, слегка

Рис. 3. Биологический и инфекционный цикл развития головневых грибов рода *Tilletia*: 1 и 2 – больной и здоровый колосья; 3 – разрушенный головневый мешочек, наполненный спорами; 4 – зерновка пшеницы, загрязненная спорами; 5 – телиоспоры на прорастающем зерне пшеницы; 6 – проросшая в базидию телиоспора на зерновке; 7 – споры твердой головни пшеницы [10]

was included in the Common List of Quarantine Ob-jects of the Eurasian Economic Union as a limitedly spread organism for the Russian Federation. The agent of common bunt of wheat (*Tilletia caries* (DC.) Tul. & C. Tul.) is a quarantine species for Egypt and Mexico, and the agent of stinking smut of wheat (*Tilletia laevis* J.G. Kühn) – for Brazil [4].

Apart from direct crop losses, these phytopatho-gens cause indirect ones, the total damage from which is estimated 4–5 times higher. The bunt agents are capable of infecting a large number of plants, there-fore, crop damage is observed in significant areas in a number of regions. The *Tilletia* genus fungi do not lead to an outbreak of the disease in the first years, the infection accumulates for several years, and under favorable conditions the disease development reach-es its peak [5].

The blunt agents are widely spread around the world. Russia performs phytosanitary inspections to detect three blunt agents. The agent of common bunt of wheat (*T. caries*) has an extensive area: North-West and Nonchernozem belt of Russia, Ural, Siberia, Far East, Kazakhstan. In Russia’s southern regions *T. caries* sub-stitutes for *T. laevis*. In Central Black Belt Region da-mage is caused by both *T. caries* and *T. laevis* [6].

The stinking smut of wheat (*T. laevis*) damages wheat in all areas of its cultivation, though this phyto-pathogen is spread more limitedly than *T. caries*. How-ever, *T. laevis* is detected more often than it is usually registered. The stinking smut of wheat used to be de-tected mainly in southern regions (Rostov, Astrakhan, Volgograd Regions, Krasnodar Krai, Central Asia, Sibe-ria), where it substitutes for *T. caries*. Only in Central Black Belt Region both species can be seen at the same time [7]. The stated above areas of *T. caries* and *T. laevis* are quite stable, because numerous cases of the pests’ introduction in the areas unusual for them did not lead to their extensive and long development there [6].

The area of dwarf bunt of wheat, though, is much smaller. In the Rus-sian Federation, this phytopathogen has been detected in the Southern Federal District (in the foothill territo-ries of the Krasnodar Krai and in the Republic of Crimea), as well as in the North Caucasian Federal District (in the foothill territories of the Stavropol Krai in recent decades (Fig. 1)) [6].

The diseases caused by *Tilletia* spp. can be noted at the beginning of grain milky stage. Infected plants are short, and infected ears are slightly flattened and have an intense blue-green coloration. As the ears ripen, this color gradually fades away. When pressed, infected caryopses, which are in the milky stage phase, release a grayish liquid with the smell of trimethylamine (smell of rotten her-ring). Affected ears are denser, slight-ly shortened and sometimes do not

Фитосанитария. Карантин растений 42

укорочены и иногда не выходят из пазух верхних ли-стьев или остаются прикрытыми наполовину вплоть до полного созревания. Ости заметно редуцированы. Перед фазой восковой спелости в зараженном коло-се вместо зерен образуются головневые мешочки, то есть сорусы гриба с телиоспорами. Сорусы име-ют овальную форму и на вершине немного заостре-ны. В самих зернах вместо эндосперма развивается темная масса спор. Зерновки, содержащие споры, укорачиваются в длину, вздуваются, приобрета-ют более шаровидную по сравнению со здоровыми форму (рис. 2). Веса́т они значительно меньше, чем здоровые зерновки, в связи с чем к моменту оконча-тельного созревания пораженные колосья остаются прямыми, тогда как здоровые под тяжестью наклоняются. В период уборки зерновых сорусы раз-рушаются, при этом споры заражают зерна [8].

Телиоспоры гриба зимуют на зерне. При про-растании растения-хозяина трогается в рост и те-лиоспора. Формируется базидия с базидиоспо-рами. Базидиоспоры копулируют друг с другом, и образовавшаяся двухъядерная клетка внедряется в молодые ткани проростка. Двухъядерная клетка превращается в дикарионный мицелий, который по стеблю достигает соцветия злака и его цветка. В завязи цветка мицелий разрастается и распа-дается на телиоспоры. Околоплодник зерновки

protrude from the axils of the upper leaves or remain half-covered until fully ripe. The awns are conside-rably reduced. Before the waxy ripeness phase, smut bags are formed in the infected ear instead of grains, i. e. the fungus sori with teliospores. Sori are oval and slightly pointed at the top. In the grains themselves, a dark mass of spores develops instead of the endo-sperm. Caryopses containing spores are shorter in length, swollen, and acquire a more spherical shape compared to healthy ones (Fig. 2). They weigh much less than healthy grains, and therefore, by the time of final ripening, the affected ears remain erect, while healthy ears bend under their weight. During the har-vesting period, the sori are destroyed, with the spores infecting the grains [8].

Teliospores of the fungi overwinter on grain. When the host plant germinates, the teliospore starts to grow. Basidium with basidiospores is formed. Basidio-spores copulate with each other, and the resulting bi-nucleated cell is introduced into the young tissues of the seedling. The binucleated cell turns into a dicaryon mycelium, which reaches the inflorescence of the cere-al and its flower along the stem. In the ovary of a flower, the mycelium grows and breaks down into teliospores. The pericarp of the caryopsis remains intact; therefore, the caryopsis appears to be non-infected. During the threshing, the pericarp is destroyed, the teliospores

Таблица
 Морфологические признаки телиоспор некоторых видов грибов рода *Tilletia*, поражающих пшеницу [10, 11]

Возбудитель	Форма телиоспор и окраска оболочки	Размер телиоспор, мкм	Инкрустация и другие признаки
1. <i>T. caries</i> (DC.) Tul. & C. Tul. Syn. <i>T. tritici</i> (Bjerk.) R. Wolff.	Шаровидная или почти шаровидная. Светло- или темно-коричневая	14–25 x 12,6–21 (чаще 18,9 x 18)	Сетчатая, ячейки чаще 5-угольные, с ребрами (шипами) высотой 1,4–2,1 мкм. Без ослизняющего слоя. Бесцветные клетки отсутствуют
2. <i>T. laevis</i> J.G. Kühn Syn. <i>T. foetida</i> (Bauer) Liro	Эллипсоидальная или сферическая, продолговатая. Светло- или темно-оливково-коричневая	13,5–22,5 x 12,6–18 (чаще 17 x 14)	Гладкая. Ослизняющий слой. Стерильные клетки отсутствуют
3. <i>T. controversa</i> Kühn Syn. <i>T. brevifaciens</i> G.W. Fischer, <i>T. nanifica</i> (Wagner) Savul.	Шаровидная, реже продолговатая или эллипсоидальная. Светло- или темно-коричневая	19–24 x 16–25 (чаще 24,3)	С очень хорошо выраженной сетчатостью, ячейки неправильные, их ширина – 3–5 мкм и высота ребра – до 4,0 мкм. С ослизняющим бесцветным слоем на поверхности спор. Стерильные бесцветные, или слабо-зеленоватые, или коричневые клетки (16–20 мкм в диам.), шарообразной формы, с гладкой, реже с сетчатой оболочкой

Table
Teliospores morphological characteristics of some *Tilletia* species infecting wheat [10, 11]

Pathogen	Teliospore shape and color of the cover	Teliospore size, µm	Incrustation and other characteristics
1. <i>T. caries</i> (DC.) Tul. & C. Tul. Syn. <i>T. tritici</i> (Bjerk.) R. Wolff. 	Spherical or nearly spherical. Light or dark brown	14–25 x 12,6–21 (more often 18,9 x 18)	Reticulate, cells are usually 5-sided, with ribs (spines) 1.4–2.1 µm in height. No sliming layer. No colorless cells
2. <i>T. laevis</i> J.G. Kühn Syn. <i>T. foetida</i> (Bauer) Liro 	Ellipsoidal or spherical, oblong. Light or dark olive brown	13,5–22,5 x 12,6–18 (more often 17 x 14)	Smooth. Slime layer. Sterile cells are missing
3. <i>T. controversa</i> Kühn Syn. <i>T. brevifaciens</i> G.W. Fischer, <i>T. nanifica</i> (Wagner) Savul. 	Spherical, less often oblong or ellipsoidal. Light or dark brown	19–24 x 16–25 (more often 24,3)	With a very well-defined reticulate, cells are irregular, their width is 3–5 µm and rib height is up to 4.0 µm. With a slimy colorless layer on the spores surface. Sterile, colorless, or slightly greenish, or brown cells (16–20 µm in diameter), spherical, with a smooth, less often with a reticular membrane

остается целым, поэтому внешне зерновка напоминает здоровую. Во время обмолота околоплодник разрушается, телиоспоры высыпаются и прилипают к здоровым семенам и так зимуют. Максимальное заражение зерновых патогенами данного рода происходит при 8–9 °С и относительной влажности воздуха более 50%. На рисунке 3 представлен цикл развития головневых грибов рода *Tilletia* [10].

Диагностику возбудителей головневых заболеваний зерновых проводят традиционными методами – визуальным, методом смыва и центрифугирования с последующим микроскопированием и морфометрией. Визуальный осмотр образцов пшеницы проводится с целью выявления пораженных сорусов с последующим микроскопированием спор для определения вида гриба. Для этого часть головневого мешочка (пылящей массы) соскабливают в каплю воды на предметное стекло и осторожно накрывают его покровным стеклом. Готовый препарат просматривают под микроскопом начиная с малого увеличения (10 x 10) и далее – при большом увеличении (10 x 20 и 10 x 40) в светлом поле и в фазовом контрасте. Для точной идентификации возбудителя анализируют комплекс морфологических признаков (см. таблицу) телиоспор гриба.

Если при визуальном просмотре пшеницы не будет выявлено заражения, то данный образец проверяют с помощью метода смыва и центрифугирования. Подробно этот метод описан в методических рекомендациях, написанных на базе ФГБУ «ВНИИКР» (Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя карликовой головни пшеницы, УДК 57 (094); Методические рекомендации по

drop and stick to healthy seeds and overwinter this way. The maximum infection of grain crops with this kind of pathogens occurs at 8–9 °C and a relative humidity of more than 50%. The Fig. 3 shows the development cycle of *Tilletia* spp. [10].

The agents of blunt diseases are diagnosed by traditional methods – visually, by washing and centrifuging followed by microscopy and morphometry. Visual inspection of wheat samples is carried out in order to identify infected sori followed by spore microscopy to identify the fungus species. To do this, a part of the smut bag (dusting mass) is scraped into a drop of water on a slide and carefully covered with a cover slip. The obtained slide is studied under the microscope starting at low magnification (10 x 10) and then at high magnification (10 x 20 and 10 x 40) in a bright field and in phase contrast. A complex of morphological characteristics of fungal teliospores is analyzed for precise pathogen identification (see Table).

If no infection is detected by visual investigation of wheat, then this sample is checked using the washing and centrifugation method. This technique is described in detail in the recommendations by FGBU “VNIIKR” (Methodological recommendations for the detection and identification of dwarf bunt of wheat, UDC 57 (094); Methodological recommendations for the detection and identification of smut fungi in grain crops, UDC 57 (094)).

выявлению и идентификации головневых грибов в зерновых культурах, УДК 57 (094)).

Стоить отметить, что морфологические признаки некоторых видов головневых грибов схожи, например *T. controversa* и *T. caries*. Точность идентификации зависит от квалификации специалиста и используемой оптики. И в настоящее время актуальной задачей является разработка молекулярных методов диагностики для этих видов (*T. caries*, *T. laevis* и *T. controversa*) головневых грибов.

На базе ФГБУ «ВНИИКР» ведется работа по усовершенствованию выявления и идентификации головневых заболеваний пшеницы. Проведена апробация и оптимизация полимеразной цепной реакции (ПЦР) для диагностики карликовой головни. В настоящее время ведутся исследования по разработке специфичных праймеров и зондов для диагностики возбудителей головневых заболеваний методом ПЦР в реальном времени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. International Trade Centre. URL: <https://www.intracen.org> (дата обращения: 23.08.2020).
2. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. – URL: <http://mcx.ru> (дата обращения: 23.08.2020).
3. EPPO Global Database. – URL: <http://gd.eppo.int> (дата обращения: 28.08.2020).
4. Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries. – URL: <http://www.agroatlas.ru> (дата обращения: 28.08.2020).
5. Лукомский А.В., Мартыненко В.П. Микология и альгология. Краткий курс. – Витебск: Изд-во УО «ВГУ им. П. М. Машерова», 2003. – 97 с.
6. Пересыпкин В.Ф. Бolestи зерновых культур. – М.: Колос, 1979. – 279 с.
7. Игнатавичюте М.К. Головневые грибы Прибалтики. – Вильнюс: Минтис, 1975. – 278 с.
8. Каратыгин И.В. Возбудители головни зерновых культур. – Л.: Наука, 1986. – 108 с.
9. Компания «Химагромаркетинг». – URL: <http://himagromarketing.ru/ru> (дата обращения: 03.09.2020).
10. Калашников К.Я. Головня зерновых культур. – Л.: Колос, 1971. – 87 с.
11. Азбукина З.М., Каратыгин И.В. Опредетель грибов России. Порядок Головневые. Вып. 2. – СПб.: Наука, 1995. – 203 с.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Уварова Дарья Анатольевна, младший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия.

Сурина Татьяна Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия.

It should be noted that morphological characteristics of some smut fungi are similar, e. g. *T. controversa* and *T. caries*. The identification accuracy depends on the specialist’s qualifications and the optics used. At present, the development of molecular diagnostic methods for these smut fungi species (*T. caries*, *T. laevis* и *T. controversa*) is a priority.

FGBU “VNIIKR” conducts work to improve the detection and identification of wheat blunt diseases. The polymerase chain reaction (PCR) for diagnostics of dwarf bunt of wheat has been approbated and optimized. Nowadays, research is done to develop specific primers and fluorescent reporter probes for the diagnosis of blunt pathogens by RT-PCR.

REFERENCES

1. International Trade Centre. URL: <https://www.intracen.org> (last accessed: 23.08.2020).
2. Ministry of Agriculture of the Russian Federation. URL: <http://mcx.ru> (last accessed: 23.08.2020). (In Russian.)
3. EPPO Global Database. URL: <http://gd.eppo.int> (last accessed: 28.08.2020).
4. Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries. URL: <http://www.agroatlas.ru> (last accessed: 28.08.2020). (In Russian.)
5. Lukomsky A.V., Martynenko V.P. Mycology and Algology. Short course [Mikologiya i algologiya. Kratky kurs]. Vitebsk: Publishing house Educational Institution “P. M. Masherov Vitebsk State University”, 2003. 97 p. (In Russian.)
6. Peresyepkin V.F. Diseases of cereals [Bolezni zernovykh kultur]. M.: Kolos, 1979. 279 p. (In Russian.)
7. Ignatavichyute M.K. Smut fungi of the Baltic states [Golovnyovye griby Pribaltiki]. Vilnius: Minthis, 1975. 278 p. (In Russian.)
8. Karatygin I.V. Pathogens of grain crop smut [Vozbuditeli golovni zernovykh kultur]. L.: Nauka, 1986. 108 p. (In Russian.)
9. Company “Himagromarketing”. URL: <http://himagromarketing.ru/ru> (last accessed: 03.09.2020). (In Russian.)
10. Kalashnikov K.Y. Grain crop blunt [Golovnya zernovykh kultur]. L.: Kolos, 1971. 87 p. (In Russian.)
11. Azbukina Z.M., Karatygin I.V. Keys to the fungi of Russia. Smut fungi. Issue 2 [Opredelitel gribov Ros-sii. Poryadok golovnyovye. Vyp. 2]. SPb.: Nauka, 1995. 203 p. (In Russian.)

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Daria Uvarova, Junior Researcher of Molecular and Genetic Diagnostic Methods Department of FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia.

Tatyana Surina, PhD in Biology, Senior Researcher of Molecular and Genetic Diagnostic Methods Department of FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow region, Russia.

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

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

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

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

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

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

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

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

² e-mail: affut24@rambler.ru

³ e-mail: anzhela.vrn@gmail.com

⁴ e-mail: vniikr-vrn.dir@yandex.ru

⁵ e-mail: penzavniikr@mail.ru

⁶ e-mail: ank-077@mail.ru

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

АННОТАЦИЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

² e-mail: affut24@rambler.ru

³ e-mail: anzhela.vrn@gmail.com

⁴ e-mail: vniikr-vrn.dir@yandex.ru

⁵ e-mail: penzavniikr@mail.ru

⁶ e-mail: ank-077@mail.ru

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

ABSTRACT

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

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

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

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

ВВЕДЕНИЕ

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

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

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

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

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

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

В Российской Федерации неоднократно были опубликованы сообщения о выявлении

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 1

Сведения об образцах из Воронежской, Пензенской областей и Ставропольского края

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

* – площадь очага или буферной зоны.

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

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

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

Table 1

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

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

* – focus area or buffer zone.

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

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

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

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

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

Пробы фотографировали, отбирали растительный материал в пластиковые стаканчики,

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

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

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

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



Рис. 1. Основные типы поражений исследованных генеративных органов рябины:
a–d – мумификация плодовых веточек;
e–g – увядание, мумификация, некроз, отставание в росте завязей и плодов

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESULTS AND DISCUSSION

The detection of fire blight agent in samples

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

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

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

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление возбудителя бактериального ожога в образцах

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

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

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

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

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

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

pathogen concentration increased by 1–2 orders of magnitude.

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

Seasonal dynamics of the infection of mountain-ash organs

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

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

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

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

Сезонная динамика зараженности различных частей рябины

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ВЫВОДЫ

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

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

CONCLUSION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

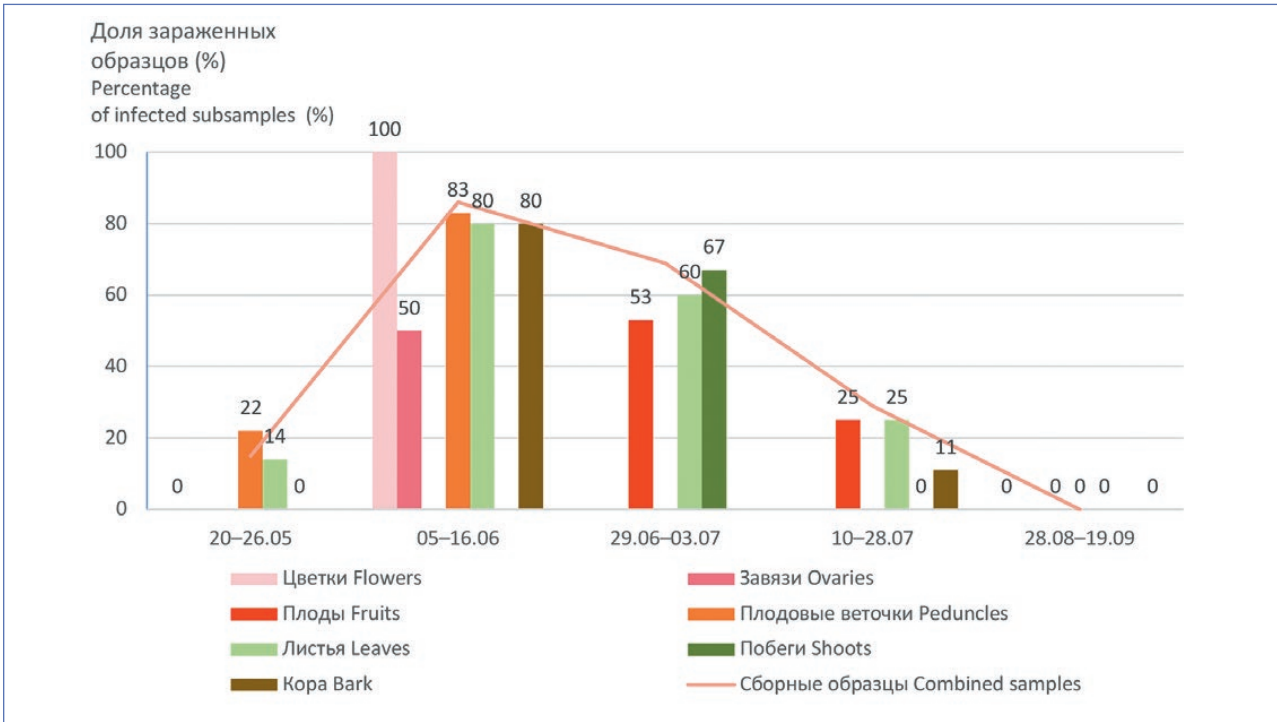


Рис. 3. Динамика зараженности различных частей растений рябины возбудителем бактериального ожога

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

REFERENCES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Дренова Наталия Васильевна, началь-
ник – старший научный сотрудник научно-мето-
дического отдела вирусологии и бактериологии
ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Мос-
ковская обл., Россия.

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

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

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

Сухолюзова Екатерина Александровна, млад-
ший научный сотрудник исследовательской лабо-
ратории Пензенского филиала ФГБУ «ВНИИКР»,
г. Пенза, Россия.

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

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

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

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nataliya Drenova, Head and Senior Researcher
of Virology and Bacteriology Research and Methodolo-
gy Department, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye,
Moscow region, Russia.

Maksim Kondratyev, Junior Researcher, Virology
and Bacteriology Research and Methodology Depart-
ment, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow
region, Russia.

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

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

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

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

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

УДК 632.3.01/.08

Использование
ПЦР-систем
для диагностики
возбудителей
бактериоза черная
ножка картофеля

А.И. УСКОВ¹, И.В. ШМЫГЛЯ²,
А.А. СТАХЕЕВ³, С.К. ЗАВРИЕВ⁴, Ю.А. ВАРИЦЕВ⁵,
П.А. ГАЛУШКА⁶, Н.В. СУСЛОВА⁷

^{1,2,5,6,7} ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, п. Красково,
г/о Люберцы, Московская область, Россия
^{3,4} ФГБУН Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, г. Москва, Россия

¹ ORCID 0000-0003-1596-8359, e-mail: korenevo2000@mail.ru

² ORCID 0000-0002-4727-7141, e-mail: i.shmyglya@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-0732-5321, e-mail: stakheev.aa@gmail.com

⁴ ORCID 0000-0002-6741-8175, e-mail: szavriev@ibch.ru

⁵ ORCID 0000-0002-2329-7965, e-mail: varyuriy@yandex.ru

⁶ ORCID 0000-0003-4680-9684,
e-mail: pavel_galushka@mail.ru

⁷ ORCID 0000-0002-9864-9945, e-mail: susli4ik@yandex.ru

АННОТАЦИЯ

Черная ножка картофеля – повсеместно распро-
страненный в Российской Федерации бактериоз,
вызываемый пектолитическими бактериями рода
Pectobacterium из семейства Enterobacteriaceae.
В 2009 г. на территории России были идентици-
рованы возбудители черной ножки картофеля, от-
носящиеся к роду *Dickeya*: *Dickeya dianthicola* и *Dickeya*
solani. Ежегодный недобор урожая из-за данной бо-
лезни может составлять от 1–2 до 50–70%. Основ-
ной путь распространения патогенных бактерий
связан с перемещением семенного материала.
Для выявления и идентификации фитопатогенов,
вызывающих черную ножку картофеля, необходи-
ма разработка и оптимизация для практического
использования высокочувствительных лабора-
торных методов. В 2019 г. в рамках Федеральной
научно-технической программы (ФНТП) разви-
тия сельского хозяйства на 2017–2025 гг. Инсти-
тутом биоорганической химии имени академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и Феде-
ральным исследовательским центром картофеля
имени А.Г. Лорха (ФИЦ картофеля) были разрабо-
таны новые тест-системы в формате полимеразной
цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) для
диагностики бактерий, вызывающих черную нож-
ку картофеля, с аналитической чувствительностью
выявления ДНК патогенов на уровне 10–50 копий
плазмиды, содержащей специфический ПЦР-про-
дукт, на реакцию. В статье представлены резуль-
таты сравнительных испытаний новых тест-сис-
тем для диагностики бактерий *Pectobacterium*

UDC 632.3.01/.08

Using PCR Systems
for the Diagnosis
of Potato Blackleg
Agents

A.I. USKOV¹, I.V. SHMYGLYA²,
A.A. STAKHEEV³, S.K. ZAVRIYEV⁴, Y.A. VARITSEV⁵,
P.A. GALUSHKA⁶, N.V. SUSLOVA⁷

^{1,2,5,6,7} A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research
Center, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russia
^{3,4} RAS Shemyakin and Ovchinnikov Institute
of Bioorganic Chemistry,
Moscow, Russia

¹ ORCID 0000-0003-1596-8359, e-mail: korenevo2000@mail.ru

² ORCID 0000-0002-4727-7141, e-mail: i.shmyglya@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-0732-5321, e-mail: stakheev.aa@gmail.com

⁴ ORCID 0000-0002-6741-8175, e-mail: szavriev@ibch.ru

⁵ ORCID 0000-0002-2329-7965, e-mail: varyuriy@yandex.ru

⁶ ORCID 0000-0003-4680-9684,
e-mail: pavel_galushka@mail.ru

⁷ ORCID 0000-0002-9864-9945, e-mail: susli4ik@yandex.ru

ABSTRACT

Blackleg of potato is a bacteriosis widespread in the
Russian Federation caused by pectolytic bacteria of
the genus *Pectobacterium*, Enterobacteriaceae fami-
ly. In 2009, *Dickeya* spp. agents of potato blackleg were
identified in Russia: *Dickeya dianthicola* and *Dickeya so-
lani*. The annual yield shortfall due to this disease can
reach from 1–2 to 50–70%. The main pathway for the
pathogen bacteria is connected to seed material move-
ment. The detection and identification of plant patho-
gens causing potato blackleg require the design and op-
timization of highly sensitive laboratory methods for
practical use. In 2019, within the framework of the Fe-
deral Scientific and Technical Program (FSTP) of agri-
culture development for 2017–2025, the RAS Shemya-
kin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry
and A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center
designed new test systems in real-time PCR (RT-PCR)
for the diagnosis of bacteria causing potato blackleg,
with analytical sensitivity for detecting the pathogen
DNA at the level of 10–50 copies of plasmids, contain-
ing a specific PCR product, per reaction. The article
presents the results of comparative testing of the new
test systems for the diagnosis of the bacteria *Pectobac-
terium atrosepticum*, *Dickeya dianthicola* and *Dickeya sola-
ni*. When testing 20 varieties of seed potatoes delivered
to the Testing Laboratory of A.G. Lorkh Russian Potato

atrosepticum, *Dickeya dianthicola* и *Dickeya solani*. При тестировании 20 сортообразцов семенного картофеля, поступивших в Испытательную лабораторию ФИЦ картофеля от производителей из 4 регионов Российской Федерации, в 15 случаях показано полное совпадение результатов анализа при использовании рутинных и новых испытываемых тест-систем.

Ключевые слова. Черная ножка картофеля, ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), диагностика, тест-система.

Благодарность. Статья подготовлена в рамках ФНТП развития сельского хозяйства на 2017–2025 гг. (подпрограмма «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации»).

Для корреспонденции. Усков Александр Ири-нархович, доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник, заведующий отделом ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, 140051, Россия, Московская область, г/о Люберцы, п. Красково, ул. Лорха, 23, литера В, e-mail: korenevo2000@mail.ru.



ВВЕДЕНИЕ

Черная ножка картофеля – широко распространенный в Российской Федерации бактериоз, вызываемый пектолитическими бактериями рода *Pectobacterium* из семейства Enterobacteriaceae. Болезнь поражает картофель как во время вегетации, так и при хранении клубней [1].

Вредоносность черной ножки проявляется в изреживании посадок картофеля, снижении продуктивности растений, ухудшении семенных и товарных качеств, развитии мокрых гнилей клубней в период хранения. Недобор урожая из-за данной болезни в России составляет от 1–2 до 50–70% [2].

В 2009 г. на территории России были идентифицированы возбудители черной ножки картофеля, относящиеся к роду *Dickeya*: *Dickeya dianthicola* и *Dickeya solani* [3, 4]. В настоящее время патогены рода *Dickeya* обнаружены во многих регионах РФ [5]. Симптомы проявления болезни на растениях и клубнях картофеля, вызываемой бактериями рода *Dickeya*, аналогичны симптомам, вызываемым бактериями рода *Pectobacterium*. В то же время виды *Dickeya* spp. более агрессивны и могут вызывать водянистую гниль стеблей и более активную форму мокрой гнили клубней по сравнению с *Pectobacterium atrosepticum* [6]. Для видов рода *Dickeya* характерно распространение в регионах с жарким климатом. Однако в последнее время отмечено интенсивное продвижение *Dickeya* spp. в регионы с умеренным климатом, благоприятные для производства картофеля [7, 8].

Основной путь распространения патогенных бактерий, вызывающих бактериоз черная ножка картофеля, связан с перемещением семенного материала [9, 10]. При этом нередко инфекция может находиться в скрытом (латентном) состоянии, не вызывая внешних признаков проявления болезни [11, 12]. В соответствии с действующим в настоящее время Межгосударственным стандартом

Federal Research Center by manufacturers from 4 regions of the Russian Federation, in 15 cases, complete coincidence of the analysis results was shown when using routine and new test systems.

Key words. Blackleg of potato, real-time PCR (RT-PCR), diagnosis, test system.

Acknowledgement. The article has been written within the FSTP of agriculture development for 2017–2025 (subprogram “Development of potato and seed production in the Russian Federation”).

For correspondence. Aleksandr Uskov, Doctor of Agriculture, Leading Researcher and Head of Department, A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center, 140051, Russia, Moscow region, Lyubertsy, Kraskovo, Lorkha str. 23-B, e-mail: korenevo2000@mail.ru.

INTRODUCTION

Blackleg of potato is a bacteriosis widespread in the Russian Federation caused by pectolytic bacteria of the genus *Pectobacterium*, Enterobacteriaceae family. The disease affects potatoes both during the growing season and tubers storage [1].

The damage caused by potato blackleg is manifested in the thinning of potato plantings, a decrease in plant productivity, reducing seed and commercial qualities and the development of soft rot of tubers during storage. The annual yield shortfall due to this disease can reach from 1–2 to 50–70% [2].

In 2009, *Dickeya* spp. agents of potato blackleg were identified in Russia: *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani* [3, 4]. At present, *Dickeya* spp. pathogens have been detected in many Russian regions [5]. The disease symptoms on potato plants and tubers caused by *Dickeya* genus bacteria are similar to those brought about by *Pectobacterium* genus bacteria. At the same time, *Dickeya* spp. are more aggressive and can lead to stem soft rot and a more active form of tubers soft rot compared to *Pectobacterium atrosepticum* [6]. *Dickeya* spp. usually spread in regions with hot climate. However, *Dickeya* spp. have been recently noted to actively spread into regions with temperate climate, favourable for potato production [7, 8].

The main pathway for the pathogen bacteria causing potato blackleg is connected to seed material movement [9, 10]. It should be noted that the infection can often be in a latent state without causing external signs of the disease manifestation [11, 12]. According to the current interstate standard GOST 33996-2016 “Seed potatoes. Technical conditions and methods of determining the quality”, the presence of bacteriosis agents including potato blackleg in the initial material as well as super-super elite (or ‘S’ for EU) is not allowed [13].

ГОСТ 33996-2016 «Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества» наличие в исходном материале, а также в супер-суперэлите возбудителей бактериозов, в том числе черной ножки картофеля, не допускается [13].

Для выявления фитопатогенов, вызывающих черную ножку картофеля, необходима разработка и оптимизация для практического использования высокочувствительных лабораторных методов. Данные методы должны позволять эффективно контролировать возбудителей бактериоза на ранних и последующих стадиях семеноводства, обеспечивая производство высококачественного семенного материала.

Применение иммуноферментного анализа (ИФА) и иммунохроматографических тест-систем в схемах контроля качества семенного картофеля позволяет эффективно выявлять зараженность тестируемого материала скрытой формой наиболее вредоносных бактериальных заболеваний [14, 15, 16, 17]. Вместе с тем у возбудителей бактериозов картофеля *Pectobacterium* spp. и *Dickeya* spp. наблюдаются большие штаммовые различия в составе поверхностных клеточных антигенов, что затрудняет их идентификацию и количественное определение иммунологическими методами [18].

Полногеномное секвенирование ДНК изолятов бактериальных патогенов, вызывающих черную ножку картофеля, открыло новые возможности для молекулярной диагностики возбудителей болезни [19, 20]. Использование высокочувствительного метода ПЦР помимо выявления минимальных количеств патогенов позволяет проводить видовую идентификацию бактерий [21]. Так, с использованием специфических праймеров было показано широкое распространение вида *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* на посадках картофеля в России осенью 2017 г. [22].

В 2019 г. в рамках ФНТП развития сельского хозяйства на 2017–2025 гг. Институтом биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и Федеральным исследовательским центром картофеля имени А.Г. Лорха были разработаны новые тест-системы в формате ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) для диагностики бактерий *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dianthicola* и *Dickeya solani*, вызывающих черную ножку картофеля. Подробное описание параметров и характеристик разработанных систем приведено в работе Стахеева и др., 2020 [23]. Разработанные тест-системы при испытаниях показали высокую специфичность и аналитическую чувствительность выявления ДНК патогенов на уровне 10–50 копий плазмиды, содержащей специфический ПЦР-продукт, на реакцию [23].

Для дальнейшей адаптации разработанных тест-систем в практической работе диагностических лабораторий необходимо проведение их апробации в производственных условиях на материале разных категорий и классов, выращенном в различных регионах Российской Федерации. В этой связи целью настоящей работы является изучение возможности применения новых ПЦР-РВ-систем для идентификации возбудителей черной ножки картофеля при тестировании семенного материала, поступающего в аккредитованные испытательные лаборатории для контроля качества

The detection of plant pathogens causing potato blackleg requires the design and optimization of highly sensitive laboratory methods for practical use. These methods should allow to control effectively the bacteriosis agents in the early and subsequent stages of seed production, ensuring the production of high-quality seed.

Using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunochromatographic test systems in quality control schemes for seed potatoes allows to effectively detect the contamination of the test material with a latent form of the most harmful bacterial diseases [14, 15, 16, 17]. At the same time, the pathogens of potato bacteriosis *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. show great strain differences in the composition of cell surface antigens, which makes it difficult to identify and quantify them by immunological methods [18].

The whole genome sequencing of bacterial pathogens isolates causing potato blackleg opened up new possibilities for molecular diagnosis of pathogens [19, 20]. Apart from detecting minimal quantities of pathogens, using a highly sensitive PCR method allows to identify bacteria species [21]. Thus, using specific primers showed a wide spread of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* on potato plantings in Russia in autumn 2017 [22].

In 2019, within the framework of the Federal Scientific and Technical Program (FSTP) of agriculture development for 2017–2025, the RAS Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry and A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center designed new test systems in real-time PCR (RT-PCR) for the diagnosis of bacteria *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani* causing the blackleg of potato. A detailed description of the parameters and characteristics of the developed systems is given in the work of Stakheev et al., 2020 [23]. During testing, the developed test systems showed high specificity and analytical sensitivity for detecting the pathogen DNA at the level of 10–50 copies of plasmids, containing a specific PCR product, per reaction [23].

For further adaptation of the developed test systems in the practical work of diagnostic laboratories, it is necessary to test them in production conditions on material of different categories and classes grown in various regions of the Russian Federation. In this respect, the aim of the present work is studying the possibilities of using the new RT-PCR systems for the identification of potato blackleg agents when testing the seed material submitted to accredited testing laboratories for quality control and certification carried out in accordance with the existing standard protocol.

MATERIALS AND METHODS

During the research, 20 variety samples were analyzed delivered to the Testing Laboratory of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center by manufacturers from 4 regions of the Russian Federation: Moscow, Tula, Voronezh Regions and the Republic of Tatarstan. Each variety sample contained 200 tubers belonging to different categories and classes of seed potato (7 samples of the 1st field generation from mini-tubers, 3 samples

и сертификации, осуществляемых в соответствии с существующим стандартным протоколом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В процессе исследований анализировали 20 сортообразцов, поступивших в Испытательную лабораторию ФИЦ картофеля от производителей из 4 регионов Российской Федерации: Московской, Тульской, Воронежской областей и Республики Татарстан. Каждый сортобразец состоял из 200 клубней, относящихся к различным категориям и классам семенного картофеля (к 1-му полевому поколению из мини-клубней (ПП-1) относились 7 образцов, супер-суперэлите (ССЭ) – 3 образца, суперэлите (СЭ) – 2 образца, элите (Э) – 3 образца, 1-й репродукции элиты (РС-1) – 1 образец и 2-й репродукции элиты (РС-2) – 4 образца).

Для экстрагирования бактерий в 0,05 М калий-фосфатном буфере рН 7,0 использовали сегменты клубней из столонной части с захватом сосудистого кольца размером 1 x 1 см. Средние пробы образцов готовили в соответствии со СТО ВНИИКР 4.009-2013 [24]. Тотальную ДНК средних образцов выделяли с использованием комплектов реактивов «Проба-ГС» (для ДНК) (ООО «АгроДиагностика», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Каждый из образцов ДНК был протестирован в 3 повторностях. ПЦР-РВ проводили в амплификаторе ДТ-96 (ООО «ДНК-Технология», Россия) в соответствии с программами амплификации, приведенными в статье Стахеева и др., 2020 [23]. Анализ полученных результатов проводили с использованием порогового метода [25].

Для сравнительной оценки полученных результатов исследуемые образцы параллельно тестировали с использованием коммерческих наборов для ИФА (ФИЦ картофеля¹) и ПЦР-РВ (ООО «Синтол»), применяемых в Испытательной лаборатории ФИЦ картофеля для рутинных анализов образцов на наличие бактерий, вызывающих черную ножку картофеля: *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dianthicola*, *Dickeya solani* (ИФА) и *Pectobacterium* spp., *Dickeya* spp. (ПЦР-РВ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Поскольку в исходном и оригинальном семенном картофеле не допускается присутствие возбудителей бактериозов, в том числе вызывающих черную ножку картофеля (ГОСТ 33996-2016), контроль распространения фитобактерий на ранних стадиях семеноводства при выращивании оригинального семенного материала имеет первостепенное значение.

В наших исследованиях при тестировании 7 образцов исходного материала и 3 образцов супер-суперэлиты из различных регионов РФ с использованием тест-систем, применяемых в Испытательной лаборатории ФИЦ картофеля для рутинных анализов (ИФА ФИЦ картофеля² и ПЦР-РВ ООО «Синтол»), не были выявлены возбудители черной ножки картофеля. В то же время тестирование образцов с использованием новых тест-систем ПЦР-РВ позволило выделить дополнительно в 1-м полевом поколении из мини-клубней 2 сортообразца из Московской области и Республики Татарстан

of the super-super elite (S), 2 samples of the superelite (SE), 3 samples of the elite (E), 1 sample of the 1st elite reproduction (A1), and 4 samples of the 2nd elite reproduction (A2)).

To extract bacteria in 0.05 M potassium phosphate buffer pH 7.0 segments of tubers from the stolon part with a capture of the vascular ring measuring 1 x 1 cm were used. Average samples were prepared in accordance with STO VNIKR 4.009-2013 [24]. The total DNA of average samples was isolated using reagent kits “PREP-GS” (for DNA) (AgroDiagnostika, Russia) in accordance with the manufacturer’s protocol. Each of the DNA samples was tested in 3 replications. RT-PCR was performed in the DT-96 detection amplifier (DNA-Technology, Russia) in accordance with the amplification programs given in the article by Stakheev et al., 2020 [23]. The analysis of the obtained results was carried out using the threshold method [25].

For a comparative assessment of the results obtained, the studied samples were tested in parallel using commercial kits for ELISA (A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center¹) and RT-PCR (Syntol) used in the Testing Laboratory of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center for routine tests of samples for bacteria causing potato blackleg: *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya dianthicola*, *Dickeya solani* (ELISA) and *Pectobacterium* spp., *Dickeya* spp. (RT-PCR).

RESEARCH RESULTS

Since the presence of bacteriosis agents is not allowed in the initial and original potato seeds, including those causing potato blackleg (GOST 33996-2016), controlling the spread of phyto­bacteria in the early stages of seed production when growing original seed material is of paramount importance.

In this research, no agents of potato blackleg were detected when testing 7 samples of the initial material and 3 samples of super-super elite from different Russian regions with test systems used in the Testing Laboratory of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center for routine tests (ELISA, A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center² and RT-PCR, Syntol). At the same time, testing the samples with new RT-PCR test systems allowed to select additionally in the 1st field generation from mini tubers 2 variety samples from Moscow Region and the Republic of Tatarstan with a positive reaction to *Pectobacterium* respectively at the cycles of 28.4 and 26.4 and identify the pest as *Pectobacterium atrosepticum* (Table 1).

Amplification of the internal control was noted in all samples, which indicates the absence of the reaction inhibition and the correctness of the results. The graphs of the increasing fluorescent signal when testing the samples with primers for the detection of *P. atrosepticum* for specificity and internal control are shown in Fig. 1.

According to GOST 33996-2016, the potato bacteriosis identification including potato blackleg in elite

^{1,2} This method was developed earlier by VNIKH, which became A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center – since August 31, 2019.

Таблица 1

Результаты тестирования образцов оригинального материала семенного картофеля (ПП-1 и ССЭ)

(в графе с данными ПЦР-РВ в скобках приведены средние значения пороговых циклов по 3 повторностям)

№ п.п. Образец	Результаты тестирования							
	ИФА (оптическая плотность)		ПЦР-РВ (C _q ср.)					
	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>	<i>P. spp.</i>	<i>D. spp.</i>	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>
1. Невский (ПП-1) Р. Татарстан	–	–	–	–	–	+	–	–
						(26,4)		
2. Гала (ПП-1) Р. Татарстан	–	–	–	–	–	–	–	–
3. Импала (ПП-1) Московская область	–	–	–	–	–	–	–	–
4. Фиолетовый (ПП-1) Московская область	–	–	–	–	–	+	–	–
						(28,4)		
5. Дезире (ПП-1) Московская область	–	–	–	–	–	–	–	–
6. Ред Скарлетт (ПП-1) Воронежская область	–	–	–	–	–	–	–	–
7. Жуковский р. (ПП-1) Тульская область	–	–	–	–	–	–	–	–
8. Ред Скарлетт (ССЭ) Воронежская область	–	–	–	–	–	–	–	–
9. Ред Скарлетт (ССЭ) Тульская область	–	–	–	–	–	–	–	–
10. Удача (ССЭ) Тульская область	–	–	–	–	–	–	–	–

P. atro – *Pectobacterium atrosepticum*

D. dian – *Dickeya dianthicola*

P. spp. – *Pectobacterium* spp.

D. spp. – *Dickeya* spp.

D. sol – *Dickeya solani*

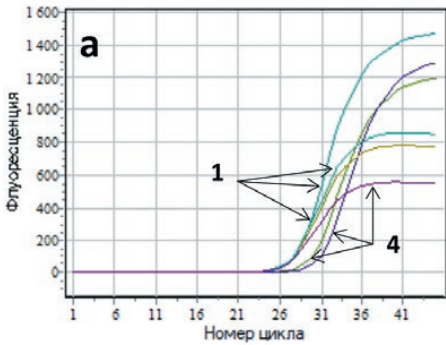


Рис. 1. Графики разгорания флуоресцентного сигнала при тестировании образцов оригинального материала семенного картофеля с праймерами к *P. atrosepticum*: а – специфика; б – внутренний контроль. 1 – образец 1; 4 – образец 4 (см. табл. 1) (3 повторности)

с положительной реакцией на *Pectobacterium* соответственно на 28,4 и 26,4 цикле и идентифицировать возбудителя как *Pectobacterium atrosepticum* (табл. 1).

Амплификация внутреннего контроля была отмечена во всех образцах, что свидетельствует об отсутствии ингибирования реакции и о корректности

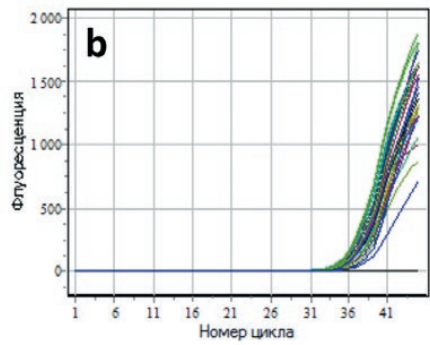


Рис. 1. The graphs of increasing fluorescent signal when testing samples of original seed potato material with primers for *P. atrosepticum*: а – specific sample; б – internal control. 1 – sample 1; 4 – sample 4 (see Table 1) (3 replications)

al test system (Table 2). A total coincidence was noted in 7 cases by 4 negative and 3 positive reactions by all

^{1,2} Данный метод был разработан ранее ВНИИХ, который стал ФИЦ картофеля – с 31 августа 2019 г.

Table 1
Test results of original potato seed material samples (1st field generation and super-super elite)
 (in the column with RT-PCR data in brackets are the average values of the threshold cycles for 3 replications)

№ Sample	Test results							
	ELISA (optical density)			RT-PCR (C _q cp.)				
	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>	<i>P. spp.</i>	<i>D. spp.</i>	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>
1. Nevsky (A1*) Republic of Tatarstan	–	–	–	–	–	+	–	–
						(26.4)		
2. Gala (A1) Republic of Tatarstan	–	–	–	–	–	–	–	–
3. Impala (A1) Moscow region	–	–	–	–	–	–	–	–
4. Purple (A1) Moscow region	–	–	–	–	–	+	–	–
						(28.4)		
5. Desire (A1) Moscow region	–	–	–	–	–	–	–	–
6. Red Scarlett (A1) Voronezh region	–	–	–	–	–	–	–	–
7. Zhukovsky (A1) Tula region	–	–	–	–	–	–	–	–
8. Red Scarlett (super-super elite) Voronezh region	–	–	–	–	–	–	–	–
9. Red Scarlett (super-super elite) Tula region	–	–	–	–	–	–	–	–
10. Udacha (super-super elite) Tula region	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>P. atro</i> – <i>Pectobacterium atrosepticum</i>		<i>P. spp.</i> – <i>Pectobacterium</i> spp.			<i>D. sol</i> – <i>Dickeya solani</i>			
<i>D. dian</i> – <i>Dickeya dianthicola</i>		<i>D. spp.</i> – <i>Dickeya</i> spp.			* – see ‘Materials and Methods’			

полученных результатов. Графики разгорания флуоресцентного сигнала при тестировании образцов с праймерами для детекции *P. atrosepticum* для спецификации и внутреннего контроля приведены на рисунке 1.

В соответствии с ГОСТ 33996-2016 идентификация бактериозов картофеля, в том числе черной ножки, в элитном и репродукционном семеноводстве картофеля осуществляется визуальными методами как на вегетирующих растениях во время полевых инспекций, так и на клубнях с использованием клубневого анализа материала. В то же время, с учетом возможного латентного характера инфекции, лабораторный контроль за распространением возбудителей болезни в процессе размножения элитного и репродукционного семенного картофеля является важным элементом контроля качества материала.

В наших исследованиях при сравнительном тестировании 10 сортообразцов элитного и репродукционного семенного картофеля 3 тест-системами было выявлено значительное совпадение результатов, полученных с использованием 2 рутинных и испытуемой тест-системы (табл. 2). В 7 случаях было выявлено полное совпадение по 4 отрицательным и 3 положительным реакциям всеми 3 тест-системами. Так, при тестировании образца элиты с. Гала, произведенного в Московской

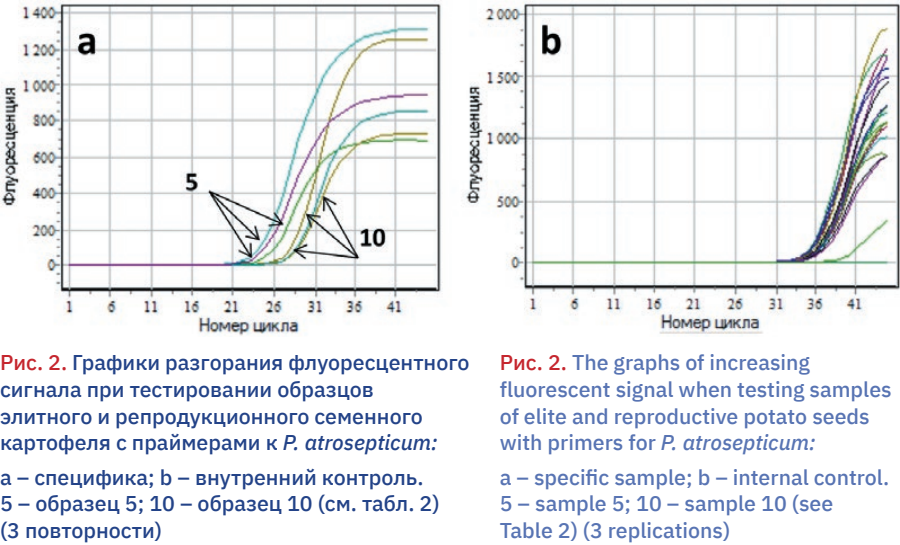
3 test systems. Thus, testing a sample of the elite variety Gala produced in Moscow Region and reproduction material of the variety Picasso (A2) from Voronezh Region showed positive reactions for the presence of *Pectobacterium atrosepticum* in the material by ELISA (optical density – 2.15 and 0.16), *Pectobacterium* spp. by RT-PCR (Syntol) at the cycles of 26.7 and 35.1 and *Pectobacterium atrosepticum* using the new test system of RT-PCR at the cycles of 26.0 and 28.3 respectively. The graphs of fluorescent signal increase when testing the samples with primers for the detection of *P. atrosepticum* are given in Fig. 2.

The presence of the bacterium *Dickeya solani* was also unambiguously detected in the sample of the variety Sifra (A2) from Voronezh Region by ELISA (optical density – 2.28), *Dickeya* spp. by RT-PCR (Syntol) at the cycle of 35.2 and *Dickeya solani* using the new test system RT-PCR at the cycle of 29.7.

The testing of two elite samples from Moscow Region (Queen Anna and Colombo) and the sample of the variety Gala (elite reproduction-1) from Voronezh Region showed positive reactions for the bacteria *Pectobacterium* spp. by RT-PCR (Syntol) (average numbers

Таблица 2
Результаты тестирования образцов элитного и репродукционного семенного картофеля
 (в графе с данными ПЦР-РВ в скобках приведены средние значения пороговых циклов по 3 повторностям)

№ п.п. Сортообразец	Результаты тестирования							
	ИФА (оптическая плотность)			ПЦР-РВ (C _q ср.)				
	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>	<i>P. spp.</i>	<i>D. spp.</i>	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>
1. Ред Скарлетт (СЭ) Московская область	–	–	–	–	–	–	–	–
2. Удача (СЭ) Московская область	–	–	–	–	–	–	–	–
3. Королева Анна (Э) Московская область	–	–	–	+	–	–	–	–
				(31,1)				
4. Коломбо (Э) Московская область	–	–	–	+	–	–	–	–
				(33,1)				
5. Гала (Э) Московская область	+	–	–	+	–	+	–	–
	(2,15)			(26,7)		(26,0)		
6. Гала (РС-1) Воронежская область	–	–	–	+	–	–	–	–
				(34,3)				
7. Сифра (РС-2) Воронежская область	–	–	+	–	+	–	–	+
			(2,28)		(35,2)			(29,7)
8. Гала (РС-2) Воронежская область	–	–	–	–	–	–	–	–
9. Эволюшн (РС-2) Воронежская область	–	–	–	–	–	–	–	–
10. Пикассо (РС-2) Воронежская область	+/-	–	–	+	–	+	–	–
	(0,16)			(35,1)		(28,3)		
<i>P. atro</i> – <i>Pectobacterium atrosepticum</i>		<i>P. spp.</i> – <i>Pectobacterium</i> spp.			<i>D. sol</i> – <i>Dickeya solani</i>			
<i>D. dian</i> – <i>Dickeya dianthicola</i>		<i>D. spp.</i> – <i>Dickeya</i> spp.						



области, и репродукционного материала с. Пикассо (РС-2) из Воронежской области были получены положительные реакции на присутствие в материале *Pectobacterium atrosepticum* методом ИФА (оптическая плотность – 2,15 и 0,16), *Pectobacterium* spp. методом ПЦР-РВ (ООО «Синтол») на 26,7 и 35,1 циклах и *Pectobacterium atrosepticum* с использованием новой

of the threshold cycles: 31.1, 33.1 and 34.3 respectively). Also, when using ELISA and the new RT-PCR test systems for the testing no blackleg of potato agents were detected in these samples.

CONCLUSION

The comparative testing of 20 variety samples of potato seeds received by the Testing Laboratory of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center from producers from 4 Russian regions showed in 15 cases a full coincidence of the analysis results using 2 routine and 1 trial test system (12 negative and 3 positive reactions). Using the new RT-PCR test system in the early stages of seed production to test original potato seeds

Table 2
Results of testing samples of elite and reproductive potato seeds
 (in the column with RT-PCR data in brackets are the average values of the threshold cycles for 3 replications)

№ Variety sample	Test results							
	ELISA (optical density)			RT-PCR (C _q ср.)				
	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>	<i>P. spp.</i>	<i>D. spp.</i>	<i>P. atro</i>	<i>D. dian</i>	<i>D. sol</i>
1. Red Scarlett (super elite) Moscow region	–	–	–	–	–	–	–	–
2. Udacha (super elite) Moscow region	–	–	–	–	–	–	–	–
3. Queen Anna (elite) Moscow region	–	–	–	+	–	–	–	–
				(31.1)				
4. Colombo (elite) Moscow region	–	–	–	+	–	–	–	–
				(33.1)				
5. Gala (elite) Moscow region	+	–	–	+	–	+	–	–
	(2.15)			(26.7)		(26.0)		
6. Gala (A1) Voronezh region	–	–	–	+	–	–	–	–
				(34.3)				
7. Sifra (A2) Voronezh region	–	–	+	–	+	–	–	+
			(2.28)		(35.2)			(29.7)
8. Gala (A2) Voronezh region	–	–	–	–	–	–	–	–
9. Evolution (A2) Voronezh region	–	–	–	–	–	–	–	–
10. Picasso (A2) Voronezh region	+/-	–	–	+	–	+	–	–
	(0.16)			(35.1)		(28.3)		

P. atro – *Pectobacterium atrosepticum*
D. dian – *Dickeya dianthicola*

P. spp. – *Pectobacterium* spp.
D. spp. – *Dickeya* spp.

D. sol – *Dickeya solani*

тест-системы ПЦР-РВ на 26,0 и 28,3 циклах соответственно. Графики разгорания флуоресценции при анализе образцов с праймерами к *P. atrosepticum* приведены на рисунке 2.

Также однозначно выявляли присутствие в образце с. Сифра (РС-2) из Воронежской области бактерии *Dickeya solani* методом ИФА (оптическая плотность – 2,28), *Dickeya* spp. методом ПЦР-РВ (ООО «Синтол») на 35,2 цикле и *Dickeya solani* с использованием новой тест-системы ПЦР-РВ на 29,7 цикле.

При тестировании 2 образцов элиты из Московской области (Королева Анна и Коломбо) и образца с. Гала (РС-1), поступившего из Воронежской области, были получены положительные реакции на бактерии *Pectobacterium* spp. методом ПЦР-РВ (ООО «Синтол») (средние значения пороговых циклов: 31,1, 33,1 и 34,3 соответственно). Вместе с тем при использовании для тестирования метода ИФА и новых тест-систем ПЦР-РВ в данных образцах не было выявлено присутствие возбудителей черной ножки картофеля.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При сравнительном тестировании 20 сортообразцов семенного картофеля, поступивших в Испытательную лабораторию Федерального исследовательского центра картофеля имени А.Г. Лорха от производителей из 4 регионов Российской Федерации, в 15 случаях показано полное совпадение

allowed to detect additionally 2 samples with a positive reaction to *Pectobacterium atrosepticum*. The conducted research has shown the possibility of using the test systems developed within the Federal Scientific and Technical Program of agriculture development for 2017–2025 (subprogram “Development of potato and seed production in the Russian Federation”) for the detection and identification of potato blackleg agents.

REFERENCES

- Ivanyuk V.G., Banadysev S.A., Zhuromsky G.K. Protecting potatoes from diseases, pests and weeds [Zashita kartofelya ot bolezney, vreditely i sornyakov]. Minsk: Belprint, 2005. 696 p. (In Russian.)
- Zeyruk V.N., Zhevora S.V., Vasilyeva S.V., Belov G.L., Dolzhenko V.I., Kuznetsova M.A., Anisimov B.V., Elansky S.N. Potato diseases, pests, weeds and measures to control them [Bolezni, vrediteli, sornyaki kartofelya i meropriyatiya po borbe s nimi]. M.: FSUE “Publishing house “Nauka”, 2020. 332 p. (In Russian.)
- Karlov A.N., Zotov V.S., Pekhtereva E.S., Matveeva E.V., Dzhililov F.S., Fesenko I.A., Karlov G.I., Ignatov A.N. *Dickeya dianthicola* – new for Russia bacterial pathogen of potatoes [*Dickeya dianthicola* – novy dlya

результатов анализа при использовании 2 рутинных и 1 испытуемой тест-системы (12 отрицательных и 3 положительные реакции). Использование новой тест-системы ПЦР-РВ на ранних этапах семеноводства для тестирования оригинального семенного картофеля позволило выделить дополнительно 2 образца с положительной реакцией на *Pectobacterium atrosepticum*. Проведенными исследованиями показана возможность использования разработанных в рамках ФНТП развития сельского хозяйства на 2017–2025 гг. (подпрограмма «Развитие селекции и семеноводства картофеля в Российской Федерации») тест-систем для выявления и идентификации возбудителей черной ножки картофеля.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / В.Г. Иванюк, С.А. Банадысев, Г.К. Журомский. – Минск: Белпринт, 2005. – 696 с.
- Болезни, вредители, сорняки картофеля и мероприятия по борьбе с ними / В.Н. Зейрук, С.В. Жевора, С.В. Васильева, Г.Л. Белов, В.И. Долженко, М.А. Кузнецова, Б.В. Анисимов, С.Н. Еланский. – М.: ФГУП «Издательство «Наука», 2020. – 332 с.
- Карлов А.Н., Зотов В.С., Пехтерева Э.Ш., Матвеева Е.В., Джалилов Ф.С., Фесенко И.А., Карлов Г.И., Игнатов А.Н. *Dickeya dianthicola* – новый для России бактериальный патоген картофеля // Известия ТСХА. – 2010. – № 3. – С. 134–141.
- Карлов А.Н., Игнатов А.Н., Карлов Г.И., Пехтерева Э.Ш., Матвеева Е.В., Шаад Н.В., Варицев Ю.А., Джалилов Ф.С. Диагностика бактериального патогена картофеля *Dickeya dianthicola* // Известия ТСХА. – 2011. – № 3. – С. 38–48.
- Игнатов А.Н., Лазарев А.М., Панычева Ю.С., Проворов Н.А., Чеботарь В.К. Бактериальные патогены картофеля рода *Dickeya*: мини-обзор по систематике и этиологии заболеваний // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53, № 1. – С. 123–131.
- Toth I.K., van der Wolf J.M., Saddler G., Lojkwoska E., Hélias V., Pirhonen M., Tsrör L., Eiphinstone J.G. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe // Plant Pathology. – 2011. – Vol. 60. – P. 385–399.
- Игнатов А.Н., Карлов А.Н., Джалилов Ф.С., Карандашов А.Е., Князькина М.С., Корнев К.П., Пехтерева Э.Ш. Распространение в России черной ножки картофеля, вызываемой бактериями р. *Dickeya* // Защита и карантин растений. 2014. – № 11. – С. 41–43.
- Ареалы и зоны вредоносности основных бактериозов растений на территории России и сопредельных стран / А.М. Лазарев, Е.Н. Мыслик, Ю.А. Варицев, И.А. Зайцев, А.П. Кожемяков, Ф.А. Попов, С.А. Волгарев, В.К. Чеботарь. – Санкт-Петербург: ВИЗР, 2017. – 136 с.
- Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / Б.В. Анисимов, Г.Л. Белов, Ю.А. Варицев, С.Н. Еланский, Г.К. Журомский, С.К. Завриев, В.Н. Зейрук, В.Г. Иванюк, М.А. Кузнецова, М.П. Пляхневич, К.А. Пшеченков, Е.А. Симаков, Н.П. Склорова, З. Сташевски, А.И. Усков, И.М. Яшина. – М.: Картофелевод, 2009. – 272 с.
- Надточий И.Н., Лазарев А.М., Зайцев И.А., Варицев Ю.А. К вопросу распространенности

Rosii bakterialny patogen kartofelya]. *Izvestiya TSKhA*. 2010; 3: 134–141. (In Russian.)

4. Karlov A.N, Ignatov A.N, Karlov G.I, Pekhtereva E.S., Matveeva E.V, Shaad N.V, Varitsev Y.A., Jalilov F.S. Diagnosis of the potato bacterial pathogen *Dickeya dianthicola* [Diagnostika bakterialnogo patogena kartofelya *Dickeya dianthicola*]. *Izvestiya TSKhA*. 2011; 3: 38–48. (In Russian.)

5. Ignatov A.N., Lazarev A.M., Panycheva Yu.S., Provorov N.A., Chebotar V.K. Potato bacterial pathogens of the genus: mini-review on the taxonomy and etiology of diseases [Bakterialnye patogeny kartofelya roda *Dickeya*: mini-obzor po sistematike i etilologii zabolevaniy]. *Agricultural Biology*. 2018; 53 (1): 123–131. (In Russian.)

6. Toth I.K., van der Wolf J.M., Saddler G., Lojkwoska E., Hélias V., Pirhonen M., Tsrör L., Eiphinstone J.G. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*. 2011; 60: 385–399.

7. Ignatov A.N., Karlov A.N., Jalilov F.S., Karandashov A.E., Knyazkina M.S., Kornev K.P., Pekhtereva E.S. The spreading in Russia of potato blackleg caused by *Dickeya* spp. [Rasprostranenie v Rossii chernoy nozhki kartofelya vyzyvaemoy bakteriyami roda *Dickeya*]. *Plant protection and quarantine*. 2014; 11: 41–43. (In Russian.)

8. Lazarev A.M., Mysnik E.N., Varitsev Y.A., Zaitsev I.A., Kozhemyakov A.P., Popov F.A., Volgarev S.A., Chebotar V.K. Areas and zones of harmfulness of the main plant bacterioses on the territory of Russia and neighboring countries [Arealy i zony vredonosnostu osnovnykh bakteriozov rasteniy na territorii Rossii i sopredelnykh stran]. St. Petersburg: VIZR, 2017. 136 p. (In Russian.)

9. Anisimov B.V., Belov G.L., Varitsev Y.A., Elansky S.N., Zhuromsky G.K., Zavriev S.K., Zeyruk V.N., Ivanyuk V.G., Kuznetsova M.A., Plyakhnevich M.P., Pshechenkov K.A., Simakov E.A., Sklyarova N.P., Stashevsky Z., Uskov A.I., Yashina I.M. Protecting potatoes from diseases, pests and weeds [Zashita kartofelya ot bolezney, vreditely i sornyakov]. M.: Kartofelevod, 2009. 272 p. (In Russian.)

10. Nadtochiy I.N., Lazarev A.M., Zaitsev I.A., Varitsev Y.A. On the prevalence and harmfulness of blackleg of potato caused by bacteria of the genus *Pectobacterium* [K voprosu o rasprostranennosti i vredonosnosti chernoy nozhki kartofelya, vyzyvayemoy bakteriyami roda *Pectobacterium*]. Potato growing. Collection of scientific papers. Materials of the international scientific and practical conference: “Methods of biotechnology in breeding and seed production of potatoes.” M.: GNU VNIKH Russian Agricultural Academy, 2014: 225–230. (In Russian.)

11. Ignatov A.N. It is necessary to increase the control of potato bacteriosis [Neobhodimo usilit borbu s bakteriozami kartofelya]. *Potatoes and vegetables*. 2011; 5: 28–29. (In Russian.)

12. Zaitsev I.A., Varitseva Yu.A., Lazarev A.M., Galushka P.A., Varitseva G.P. Monitoring of latent forms of spread of potato black leg and ring rot pathogens in the Russian Federation [Monitoring skrytykh (latentnykh) form rasprostraneniya vzbuditeley chernoy nozhki i koltsevoy gnili kartofelya v Rossiyskoy Federatsii]. Collection of scientific papers on the results of the

и вредоносности черной ножки картофеля, вызываемой бактериями рода *Pectobacterium* // В кн.: Картофелеводство. Сборник научных трудов. Материалы международной научно-практической конференции: «Методы биотехнологии в селекции и семеноводстве картофеля». – М.: ГНУ ВНИИКХ Россельхозакадемии, 2014. – С. 225–230.

11. Игнатов А.Н. Необходимо усилить борьбу с бактериозами картофеля // Картофель и овощи. – 2011. – № 5. – С. 28–29.

12. Зайцев И.А., Варицев Ю.А., Лазарев А.М., Галушка П.А., Варицева Г.П. Мониторинг скрытых (латентных) форм распространения возбудителей черной ножки и кольцевой гнили картофеля в Российской Федерации // В кн.: Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции «Сельскохозяйственные науки: научные приоритеты ученых» (г. Пермь, 25 ноября 2016 г.). – Пермь, 2016. – № 1. – С. 39–56.

13. Межгосударственный стандарт ГОСТ 33996-2016 «Картофель семенной. Технические условия и методы определения качества». – М.: Стандартинформ, 2017. – 31 с.

14. Усков А.И., Варицев Ю.А., Варицева Г.П., Галушка П.А., Ускова Л.Б., Анисимов Б.В. Современные тест-системы для лабораторной диагностики вирусных и бактериальных патогенов картофеля // В кн.: Селекция и семеноводство картофеля // Монография / Кол. авт. под ред. С.В.Жеворы, Е.А. Симаква, Б.В. Анисимова. – Чебоксары, 2020. – С. 131–138.

15. Варицев Ю.А., Зайцев И.А., Карлов А.Н., Варицева Г.П., Усков А.И. Иммуноферментный анализ возбудителей черной ножки картофеля // Картофель и овощи. – 2014. – № 6. – С. 28–29.

16. Safenkova I.V., Zaitsev I.A., Varitsev Yu.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Lateral flow immunoassay for rapid diagnosis of potato blackleg caused by *Pectobacterium atrosepticum* // Biosciences Biotechnology Research Asia. – 2015. – Vol. 12, № 3. – P. 1937–1945.

17. Safenkova I.V., Zaitsev I.A., Varitsev Yu.A., Byzova N.A., Drenova N.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of a lateral flow immunoassay for rapid diagnosis of potato blackleg caused by *Dickeya* species // Analytical and Bioanalytical Chemistry, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 2017. – Vol. 409. – P. 1915–1927.

18. Методические указания по диагностике возбудителей черной ножки и кольцевой гнили картофеля методами иммуноферментного анализа, иммунофлуоресцентной микроскопии и полимеразной цепной реакции / Варицев Ю.А., Усков А.И., Белов Г.Л., Варицева Г.П., Завриев С.К., Аршава Н.В., Зайцев В.В. – М.: ВНИИКХ, 2003. – 30 с.

19. Khayi S., Blin P., Chong T.M., Chan K.G., Faure D. Complete genome anatomy of the emerging potato pathogen *Dickeya solani* type strain IPO 2222 (T) // Standards in Genomic Sciences. – 2016. – Vol. 11. – P. 87. – URL: <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0208-0>.

20. Shneider M.M., Kabanova A.P., Korzhnikov A.A., Miroshnikov K.K., Thi N.H.V., Toshchakov S.V., Miroshnikov K.A., Ignatov A.N. Draft genome sequence of *Pectobacterium atrosepticum* PB72 and complete genome sequence of the specific bacteriophage PP90 // Genome Announcements. – 2018. – Vol. 6: e00473-18. – URL: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00473-18>.

international scientific and practical conference “Agricultural Sciences: Scientific Priorities of Scientists” (Perm, November 25, 2016). Perm, 2016. No. 1: 39–56. (In Russian.)

13. Interstate standard GOST 33996-2016 “Seed potatoes. Technical conditions and methods for determining quality” [Kartofel semennoy. Tehnicheskiye usloviya i metody opredeleniya kachestva]. M.: Standartinform, 2017. 31 p. (In Russian.)

14. Uskov A.I., Varitsev Yu.A., Varitseva G.P., Galushka P.A., Uskova L.B., Anisimov B.V. Modern test systems for laboratory diagnostics of viral and bacterial pathogens of potatoes [Sovremennyye test-sistemy dlya laboratornoy diagnostiki virusnykh i bakterialnykh patogenov kartofelya]. Potato breeding and seed production. Monograph. Col. ed. S.V. Zhevory, E.A. Simakova, B.V. Anisimova. Cheboksary, 2020: 131–138. (In Russian.)

15. Varitsev Yu.A., Zaitsev I.A., Karlov A.N., Varitseva G.P., Uskov A.I. Enzyme-linked immunosorbent assay of the potato blackleg agents [Immunifermentny analiz vozbuditeley chernoy nozhki kartofelya]. *Potatoes and vegetables*. 2014; 6: 28–29. (In Russian.)

16. Safenkova I.V., Zaitsev I.A., Varitsev Yu.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Lateral flow immunoassay for rapid diagnosis of potato blackleg caused by *Pectobacterium atrosepticum* // *Biosciences Biotechnology Research Asia*. 2015; 12 (3): 1937–1945.

17. Safenkova I.V., Zaitsev I.A., Varitsev Yu.A., Byzova N.A., Drenova N.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of a lateral flow immunoassay for rapid diagnosis of potato blackleg caused by *Dickeya* species. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2017; 409: 1915–1927.

18. Varitsev Yu.A., Uskov A.I., Belov G.L., Varitseva G.P., Zavriev S.K., Arshava N.V., Zaitsev V.V. Methodology guidelines for the diagnosis of potato black leg and ring rot causative agents by enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescence microscopy and polymerase chain reaction [Metodicheskiye ukazaniya po diagnostike vozbuditeley chernoy nozhki i koltsevoy gnili kartofelya metodami immunofermentnogo analiza, immunofluorestsentnoy mikroskopii i polimeraznoy tsepnoy reaktsii]. M.: VNIKH, 2003. 30 p. (In Russian.)

19. Khayi S., Blin P., Chong T.M., Chan K.G., Faure D. Complete genome anatomy of the emerging potato pathogen *Dickeya solani* type strain IPO 2222 (T). *Standards in Genomic Sciences*. 2016; 11: 87. URL: <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0208-0>.

20. Shneider M.M., Kabanova A.P., Korzhnikov A.A., Miroshnikov K.K., Thi N.H.V., Toshchakov S.V., Miroshnikov K.A., Ignatov A.N. Draft genome sequence of *Pectobacterium atrosepticum* PB72 and complete genome sequence of the specific bacteriophage PP90. *Genome Announcements*. 2018; 6: e00473-18. URL: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00473-18>.

21. Voronina M.V., Kabanova A.P., Shneider M.M., Korzhnikov A.A., Toshchakov S.V., Miroshnikov K.K., Miroshnikov K.A., Ignatov A.N. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing blackleg and stem rot disease of potato in Russia. *Plant Disease*. 2019; 103 (2): 364.

21. Voronina M.V., Kabanova A.P., Shneider M.M., Korzhnikov A.A., Toshchakov S.V., Miroshnikov K.K., Miroshnikov K.A., Ignatov A.N. First report of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* causing blackleg and stem rot disease of potato in Russia // Plant Disease. – 2019. – V. 103, No. 2. – P. 364.

22. Карандашов В. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* – основной бактериальный патоген картофеля осенью 2017 г. – Москва, 2017. – 8 с. URL: <https://docplayer.ru/140501832-Pectobacterium-carotovorum-subsp-brasiliensis-osnovnoy-bakterialnyy-patogen-kartofelya-osenyu-2017-g.html> (дата обращения: 29.06.2020).

23. Стахеев А.А., Чigareva М.С., Усков А.И., Шмыгля И.В., Варицев Ю.А., Галушка П.А., Завриев С.К. Разработка новых систем ПЦР-идентификации некарантинных патогенов картофеля (*Solanum tuberosum* L.), распространенных на территории России // Сельскохозяйственная биология. – 2020. – Т. 55, № 1. – С. 77–86.

24. СТО ВНИИР 4.009-2013 «Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Методы выявления и идентификации» / п. Быково, Московская обл.: ФГБУ «ВНИИР», 2013. – 69 с.

25. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR // Clinical Chemistry. – 2009. – Vol. 55, No. 4. – P. 611–622. – URL: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Усков Александр Ириархович, доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник, заведующий отделом ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, п. Красково, г/о Люберцы, Московская область, Россия.

Шмыгля Ирина Валентиновна, старший научный сотрудник ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, п. Красково, г/о Люберцы, Московская область, Россия.

Стахеев Александр Александрович, кандидат биологических наук, научный сотрудник ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия.

Завриев Сергей Кириакович, доктор биологических наук, чл.-корреспондент РАН, заведующий отделом ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, Россия.

Варицев Юрий Алексеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, п. Красково, г/о Люберцы, Московская область, Россия.

Галушка Павел Андреевич, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, п. Красково, г/о Люберцы, Московская область, Россия.

Сулова Нора Владимировна, младший научный сотрудник ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха, п. Красково, г/о Люберцы, Московская область, Россия.

22. Karandashov V. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* – major bacterial pathogen of potatoes in autumn 2017 [*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* – osnovnoy bakterialny patogen kartofelya osenyu 2017]. Moscow, 2017. 8 p. URL: <https://docplayer.ru/140501832-Pectobacterium-carotovorum-subsp-brasiliensis-osnovnoy-bakterialnyy-patogen-kartofelya-osenyu-2017-g.html> (last accessed: 29.06.2020). (In Russian.)

23. Stakheev A.A., Chigareva M.S., Uskov A.I., Shmyglya I.V., Varitsev Yu.A., Galushka P.A., Zavriev S.K. Development of new PCR systems for identification of non-quarantine potato pathogens (*Solanum tuberosum* L.) widespread in Russia [Razrabotka novykh system PCR-identifikatsii nekarantinnykh patogenov kartofelya (*Solanum tuberosum* L.), rasprostranennykh na territorii Rossii]. *Agricultural biology*. 2020; 55 (1): 77–86. (In Russian.)

24. STO VNIIR 4.009-2013 “Potato brown rot agent *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Detection and identification methods” [Vozbuditel buroy bakterialnoy gnili kartofelya *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Metody vyavleniya i identifikatsii]. Bykovo, Moscow region: FGBU “VNIIR”, 2013. 69 p. (In Russian.)

25. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR. *Clinical Chemistry*. 2009. 55 (4): 611–622. URL: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Aleksandr Uskov, Doctor of Agriculture, Leading Researcher and Head of Department, A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russia.

Irina Shmyglya, Senior Researcher of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russia.

Aleksandr Stakheev, PhD in Biology, Researcher of RAS Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia.

Sergey Zavriyev, Doctor of Biology, Corresponding Member of Russian Academy of Sciences, Head of Department, RAS Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia.

Yury Varitsev, PhD in Biology, Leading Researcher of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russia.

Pavel Galushka, PhD in Agriculture, Senior Researcher of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russia.

Nora Suslova, Junior Researcher of A.G. Lorkh Russian Potato Federal Research Center, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow region, Russia.

В ноябре 2020 года закончила свою трудовую деятельность заведующая лабораторией Приморского филиала ФГБУ «ВНИИКР» Тамара Яковлевна Фрейман.

Тамара Яковлевна более 50 лет проработала в сфере карантина растений. В 1967 году она была принята на работу в Государственную пограничную инспекцию по карантину растений по Приморскому краю и прошла трудовой путь от техника до специалиста. В должности агронома-энтомолога Тамара Яковлевна занималась выявлением карантинных организмов на территории Приморского края, изучением их биологии. С 1991 года она являлась координатором работ по программе мониторинга лимантриид, проводимой совместно со специалистами карантинной и лесной службы США в 11 портах Дальнего Востока России. Тамара Яковлевна пользовалась заслуженным уважением и авторитетом у зарубежных коллег.

В 1995 году Тамара Яковлевна возглавила лабораторию Госинспекции, а с 2006 года работала в должности заведующей лабораторией Приморского филиала ФГБУ «ВНИИКР».

Благодаря профессионализму и высокой коммуникативности Тамара Яковлевна установила тесные контакты с коллегами из других филиалов. Как человек, увлеченный своей профессиональной деятельностью, глубоко преданный выбранной работе, она грамотно, с полной отдачей своих знаний и сил, руководила лабораторией, внедряла новые методы работы, которые обеспечивали качество работы специалистов.

Под ее руководством лаборатория была оснащена новым оборудованием, подготовлены квалифицированные кадры, что и позволило проводить фитосанитарные исследования, применяя новые методы диагностики: иммуноферментный, иммунофлуоресцентный анализы и ПЦР.

На базе лаборатории Тамара Яковлевна Фрейман организовала курсы повышения квалификации по карантину растений по программе, утвержденной Россельхознадзором. В октябре 2015 года Приморская испытательная лаборатория одной из первых была аккредитована на техническую компетентность и независимость.



Не оставалась Тамара Яковлевна равнодушной и к проблемам карантина растений, регулярно освещала в средствах массовой информации актуальные вопросы выявления карантинных объектов на территории Приморского края.

За добросовестность и многолетний труд Тамаре Яковлевне Фрейман присвоено звание «Ветеран труда», она награждена серебряной медалью Минсельхоза за заслуги в агропромышленном комплексе и активную общественную работу.

Пожелаем Тамаре Яковлевне бодрости, крепкого здоровья, благополучия, ярких событий и удачи в жизни!

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 5 (при полуторном интервале и размере шрифта 14). Оптимальный объем статьи: до 20 тыс. знаков (включая пробелы).

СТРУКТУРА ПРЕДОСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ*

1. Название статьи, УДК.
2. Имя, отчество, фамилия автора.
3. Место работы автора, должность, ученая степень, адрес электронной почты.
4. Аннотация (краткое точное изложение содержания статьи, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): около 7–8 строк (300–500 знаков с пробелами).
5. Ключевые слова (5–6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи.
6. Материалы и методы.
7. Результаты и обсуждения.
8. Выводы и заключение.
9. Список литературы (т. е. список всей использованной литературы, ссылки на которую даются в самом тексте статьи): правила составления указаны в ГОСТ Р 7.05-2008.
10. 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).
11. В редакцию необходимо предоставить две рецензии на статью («внешнюю» и «внутреннюю»).

* В таком же порядке и структуре предоставляется англоязычный перевод статьи.

Работа должна быть предоставлена в редакторе WORD, формат DOC, шрифт Times New Roman, размер шрифта – 14, межстрочный интервал – полуторный, 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 EUPHRESKO 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
- 22 филиала 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>