ВНИИКР

ФИТОСАНИТАРИЯ. КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

PLANT HEALTH AND QUARANTINE

Свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС 77-76606
ISSN: 2782-327X

Русско-английский научный журнал Russian-English scientific journal Ноябрь № 4 (25) 2025

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ (РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)

Редакционная коллегия

СПЕЦИАЛЬНОСТИ:

4.1.3 – Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений

4.1.1 – Общее земледелие и растениеводство

4.1.2 – Селекция, семеноводство и биотехнология растений

Editorial board

SPECIALTIES:

4.1.3 – Agrochemistry, agricultural soil science, plant protection and quarantine

4.1.1 – General farming and crop production

4.1.2 – Breeding, seed production and plant biotechnology

Содержание | Content

Журнал «Фитосанитария. Карантин растений» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор), свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77-76606 от 15 августа 2019 года
Фото на обложке: Мелкоплодная яблоня *Malus* sp. (фото Е.В. Каримовой)
Дизайн и верстка: Андрей Воробьев
Учредитель: ФГБУ «ВНИИКР», 140150, Московская область, м. о. Раменский, пгт Быково, ул. Пограничная, д. 32

Издатель: ООО «Вейнард»
Телефон редакции: 8 (495) 925-06-34
Электронная почта: veinardltd@gmail.com
Подписной индекс АО «Почта России» – ПМ 126
Отпечатано в типографии ООО «ГРАН ПРИ», 152900, Ярославская область, г. Рыбинск, ул. Луговая, 7
Тираж 3000 экз.
Подписано в печать: 14.11.2025
Дата выхода в свет: 27.11.2025

The Journal "Plant Health and Quarantine" is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor), Registration Certificate No. FS 77-76606, August 15, 2019
Photo on the cover: Small-fruited apple tree *Malus* sp. (photo by E.V. Karimova)
Design & Composition: Andrey Vorobiev
Establisher: FGBU VNIIKR, 140150, Moskovskaya oblast, Urban district Ramensky, r. p. Bykovo, Pogranichnaya St., 32

Publisher: OOO "Veynard"
Editorial Board Office:
Tel: +7 (495) 925-06-34
E-mail: veinardltd@gmail.com
Subscription index JSC Russian Post – PM 126
Printing house: GRAND PRI, 7 Lugovaya St., Rybinsk, Yaroslavl Oblast, 152900
Circulation: 3000 copies
Approved for print: 14/11/2025
Issue date: 27/11/2025

Дубы *Quercus robur* L. из г. Герники. Связь поколений

Чалкин А.А.[1], Александрова Е.А.[2], Хамаева Б.Б.[3]

[1,3] ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150

[2] Ассоциация «Север – дети войны СССР», Страна Басков, Испания

В январе 2022 г. в адрес Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор) от испанской стороны поступило обращение о намерении ввезти из испанского г. Герники на территорию Российской Федерации саженцы дуба *Quercus robur* L. как живые символы памяти, приурочив их посадку к 80-летию Победы в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг. Участниками российско-испанской ассоциации «Север – дети войны СССР» было принято решение о проведении памятных мероприятий в местах, исторически значимых для России и Испании: в Санкт-Петербурге (на Пискаревском мемориальном кладбище, в Летнем саду (Школьная аллея) и Царском Селе в память об испанцах-блокадниках и защитниках Ленинграда); в Республике Карелии (на мемориале «Алеша», около обелисков, где увековечены испанские добровольцы, погибшие в 1941 г.); в Москве (на Поклонной горе, около памятника-часовни, установленного в память об испанцах-добровольцах – участниках Великой Отечественной войны).

Понимая важность данной миссии, сотрудники Россельхознадзора и ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР») были направлены в государственный питомник Basalan (Страна Басков) для проведения фитосанитарной инспекции (см. рис. 1). Уже в феврале 2022 г. специалисты провели фитосанитарное обследование питомника и в соответствии с ГОСТ 12430-2019 «Методы и нормы отбора образцов подкарантинной продукции при карантинном фитосанитарном досмотре и лабораторных исследованиях» отобрали образцы саженцев, которые были доставлены в Испытательный лабораторный центр ФГБУ «ВНИИКР» для исследования.

Quercus robur L. From Guernica. Connection between generations.

Chalkin A.A.[1], Aleksandrova E.A.[2], Khamaeva B.B.[3]

[1,3] All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU "VNIIKR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150

[2] Association "North – Children of the War of the USSR", Basque Country, Spain

In January 2022, the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhoznadzor) received an inquiry from the Spanish side about the intention to import oak seedlings *Quercus robur* L. from the Spanish city of Guernica to the territory of the Russian Federation as living symbols of memory, timed to coincide with the 80th anniversary of the Victory in the Great Patriotic War of 1941-1945. Members of the Russian-Spanish association "North - Children of the War of the USSR" decided to hold memorial events in places of historical significance for Russia and Spain: in St. Petersburg (at the Piskarevskoye Memorial Cemetery, in the Summer Garden (Shkolnaya Alley) and Tsarskoye Selo

Рис. 1. Фитосанитарное обследование питомника Basalan

Fig. 1. Phytosanitary inspection of the Basalan nursery

Были проведены энтомологические, гельминтологические и микологические экспертизы. После получения результатов лабораторных исследований (карантинные объекты, имеющие значение для Российской Федерации, не были выявлены) на основании выданных заключений Россельхознадзор принял решение о выпуске подкарантинной продукции.

Саженцы дубков получили разрешение для ввоза на территорию Российской Федерации и были доставлены в Ботанический сад Петра Великого (Санкт-Петербург), где находились в карантинной оранжерее. Каждый саженец имеет официальный сертификат, в котором председатель Генеральной ассамблеи Бискайи удостоверяет, что дуб является узаконенным прямым потомком дерева из г. Герники. Церемония передачи саженцев дуба для высадки в мемориальных местах Российской Федерации прошла у исторического здания парламента Бискайи Casa de Juntas (см. рис. 2).

Рис. 2. Церемония передачи саженцев *Quercus robur* у знаменитого дуба г. Герники (рядом с Casa de Juntas Generales)

Fig. 2. Ceremony of handing over *Quercus robur* seedlings at the famous oak tree of Guernica (near the Casa de Juntas Generales)

Под этим деревом в Гернике начиная с XIV века собирались посланники Страны Басков для принятия свода законов и передачи престолов королями. Этот дуб символизирует демократию, стойкость и сопротивление испанского народа.

Историческая справка. *В 1937 г. в Советский Союз из Испании было эвакуировано около 3 тыс. детей 3–15 лет. Их родители сражались против диктатуры Франко, а соотечественники плечом к плечу стояли с советскими солдатами против фашистской Германии. Однако в 1941 г. в СССР война их настигла вновь. В ленинградском Доме испанской молодежи 22 июня 1941 г. испанскими юношами и девушками были написаны первые заявления с просьбой отправить их на фронт. Испанцы были первыми и самыми многочисленными иностранцами в рядах Красной армии. В первые месяцы войны в Карелии сражалась 3-я фрунзенская дивизия народного ополчения, в рядах которой было около 70 юных испанцев. Бойцы этой дивизии не дали замкнуть большое блокадное кольцо и погибнуть Ленинграду. Около 100 испанских девчонок и мальчишек 14–20 лет помогали фронту в блокадном городе, они тушили зажигательные бомбы, копали окопы, работали в госпиталях, были донорами. Среди 140 тонн донорской блокадной крови есть и испанская кровь.*

in memory of the Spanish siege survivors and defenders of Leningrad); in the Republic of Karelia (at the "Alyosha" memorial, near the obelisks immortalizing the Spanish volunteers who died in 1941); in Moscow (on Poklonnaya Hill, near the chapel-monument erected in memory of the Spanish volunteers who participated in the Great Patriotic War).

Recognizing the importance of this mission, specialists of Rosselkhoznadzor and the All-Russian Plant Quarantine Center (VNIIKR) were dispatched to the Basalan State Nursery (Basque Country) to conduct a phytosanitary inspection (see Fig. 1). In February 2022, specialists conducted a phytosanitary inspection of the nursery and, in accordance with GOST 12430-2019 "Methods and Standards for Sampling Quarantine Products during Quarantine Phytosanitary Inspection and Laboratory Research," collected seedling samples, which were delivered to the VNIIKR Testing Laboratory Center for testing.

Entomological, helmin-thological, and mycological examinations were conducted. After receiving the laboratory test results (no quarantine objects of significance to the Russian Federation were identified), based on the issued conclusions, Rosselkhoznadzor decided to release the regulated articles.

Oak seedlings were granted permission to enter the Russian Federation and were delivered to the Peter the Great Botanical Garden (St. Petersburg), where they were kept in a quarantine greenhouse. Each seedling has an official certificate, in which the President of the General Assembly of Vizcaya certifies that the oak is a legitimate direct descendant of the tree from Guernica. The ceremony of handing over the oak saplings for planting at memorial sites in the Russian Federation took place at the historic Casa de Juntas, the parliament building of Vizcaya (see Fig. 2).).

Since the 14th century, envoys from the Basque Country have gathered under this tree in Guernica to adopt a code of laws and transfer thrones from king to king. This oak symbolizes democracy, resilience, and the resistance of the Spanish people.

Historical background. *In 1937, approximately 3,000 children aged 3 to 15 were evacuated from Spain to the Soviet Union. Their parents fought against Franco's dictatorship, and their compatriots stood shoulder to shoulder with Soviet soldiers against Nazi Germany.*

В память о мужестве и героизме испанских добровольцев и было принято решение посадить на российской земле саженцы дубов из г. Герники как символ стойкости, демократии и неукротимого духа сопротивления. В посадках саженцев дуба из г. Герники в мае 2025 г. принимала участие делегация из Испании, в составе которой были испанские дети войны, их потомки, историки-реконструкторы (см. рис. 3, 4, 5).

However, in 1941, war caught up with them again in the USSR. On June 22, 1941, at the Leningrad House of Spanish Youth, Spanish young men and women wrote the first applications requesting to be sent to the front. Spaniards were the first and most numerous foreigners in the ranks of the Red Army. In the first months of the war, the 3rd Frunze Division of the People's Militia fought in Karelia, with approximately 70 young Spaniards among its ranks. The soldiers of this division prevented the closing of the Great Siege of Leningrad and the destruction of Leningrad. Around 100 Spanish boys and girls aged 14 to 20 helped the front in the besieged city, putting out incendiary bombs, digging trenches, working in hospitals, and donating blood. Among the 140 tons of blood donated during the siege, there was some Spanish blood.

In memory of the courage and heroism of the Spanish volunteers, it was decided to plant oak seedlings from Guernica on Russian soil as a symbol of fortitude, democracy, and the indomitable spirit of resistance. A delegation from Spain, including Spanish children of the war, their descendants, and historical reenactors, participated in the planting of the oak seedlings from Guernica in May 2025 (see Figs. 3, 4, 5).

At the initiative of the Russian-Spanish Association and on behalf of Spanish children of war—Victoria Iglesias Martínez and Azucena Fernández Fernández, Sergio Salueña, Manuel Arce, Ángel Gutiérrez, and others—commemorative plaques were installed near the oak trees. These inscriptions read in Russian, Spanish, and Basque: "In the name of life! In the name of world peace! Remember us!" and "From the Spanish children of war, with gratitude to the Soviet people. We fought fascism together".

Spaniards fought on the Leningrad Front, in Moscow Oblast, in the forests of Bryansk and Smolensk, and in Stalingrad. Six Spaniards served in the Red Army as far as Berlin.

Рис. 3. Церемония посадки саженца дуба в Республике Карелии (д. Сяндеба, мемориал «Алеша»)

Fig. 3. Oak tree planting ceremony in the Republic of Karelia (Syandeba village, Alyosha memorial)

Рис. 4. Саженец дуба в Летнем саду, Санкт-Петербург

Fig. 4. An oak seedling in the Summer Garden, St. Petersburg

По инициативе российско-испанской ассоциации и от имени испанских детей войны – Виктории Иглесиас Мартинес и Асусена Фернандес Фернандес, Серхио Салуэнья, Мануэля Арсе, Анхела Гутьерреса и других – рядом с дубками были установлены памятные таблички с надписью на русском, испанском и баскском языках: «Во имя жизни! Во имя мира во всем мире! Помните о нас!» и «От испанских детей войны с благодарностью советскому народу. Мы вместе боролись с фашизмом».

Испанцы сражались на Ленинградском фронте, в Московской области, в лесах Брянщины, Смоленщины, в Сталинграде. Шестеро испанцев в рядах Красной армии дошли до Берлина.

Рис. 5. Посадка саженца дуба на Поклонной горе, Москва

Fig. 5. Planting an oak tree on Poklonnaya Hill, Moscow

Организатор акции Елена Александрова, президент ассоциации «Север – дети войны СССР», уверена, что широкая география подвига испанского народа в Великой Отечественной войне должна быть увековечена, и в будущем планируется высадить дубки из Испании в Сталинграде, Крыму, Брянске, на Кавказе. Ассоциация «Север» будет продолжать масштабный исторический проект, мероприятия которого послужат сохранению нашей общей исторической памяти.

Рис. 6. Участники акции

Fig. 6. Participants

The organizer of the event, Elena Aleksandrova, president of the "North – Children of the USSR War" association, is confident that the vast geography of the Spanish people's heroism in the Great Patriotic War should be immortalized, and plans are underway to plant oak trees from Spain in Stalingrad, Crimea, Bryansk, and the Caucasus. The "North" association will continue this large-scale historical project, the events of which will serve to preserve our shared historical memory.

DOI 10.69536/FKR.2025.77.12.001
УДК 632.911.2; 58.084.1; 578.85/.86

Растения картофеля в культуре *in vitro* как модель для поддержания и изучения вирусов

*Абрамова А. С.[1], Усков А. И.[2], Кирюшина А. С.[3], Соловьев А. А.[4], Копкова Т. А.[5], Калашников А. А.[6], Гарибян Ц. С.[7]

[1, 3, 4, 5, 6, 7]ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150
[2]ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха» (ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени Лорха»), д. п. Красково, г. Люберцы, Московская обл., Россия, 140051

[1]*ORCID: 0009-0003-8641-5396; e-mail: abramova.as@phystech.edu*
[2]*ORCID: 0000-0003-1596-8359; e-mail: korenevo2000@mail.ru*
[3]*ORCID: 0009-0000-7338-0153; e-mail: kr.nastya.mail@gmail.com*
[4]*ORCID: 0000-0003-4480-8776; e-mail: asoloviev70@yandex.ru*
[5]*ORCID: 0009-0008-7629-5497; e-mail: kopkova_tatyana@vniikr.ru*
[6]*ORCID: 0009-0007-8827-4792; e-mail: andreysm.uch@mail.ru*
[7]*ORCID: 0000-0001-8226-3792; e-mail: tsovinar1980@mail.ru*

АННОТАЦИЯ

В данной статье рассматриваются перспективы использования растений картофеля в культуре *in vitro* для поддержания и изучения вирусов, а также представлен краткий обзор информации о рекомендуемом протоколе выращивания и микроклонального размножения вирусных растений картофеля в культуре *in vitro*. Создание коллекции патогенных и карантинных вирусов растений *in vitro* необходимо для разработки исследовательской базы вирусов растений. Многие вирусы плохо сохраняются в мертвом растительном материале в течение длительного времени, поэтому наличие коллекции живых изолированных растений позволит сохранять материал и проводить исследования на протяжении всего года, наблюдать динамику развития симптомов. Наблюдение за симптомами в стерильных и изолированных условиях *in vitro* позволит объективно и более точно охарактеризовать симптомы, вызываемые различными штаммами и видами вирусов. Некоторые растения, в том числе и в культуре *in vitro*, могут служить индикаторами и использоваться для подтверждения наличия инфекции. В данной работе применены методы микроклонального размножения растений, метод ПЦР, совмещенный с обратной транскрипцией, для выявления вирусов в растительном материале, а также методы стерилизации, необходимые для работы с асептичес-

DOI 10.69536/FKR.2025.77.12.001
UDC 632.911.2; 58.084.1; 578.85/.86

Potato plants *in vitro* culture as a model for maintaining and studying viruses

* Aleksandra S. Abramova[1], Aleksandr I. Uskov[2], Anastasia S. Kiryushina[3], Aleksandr A. Soloviev[4], Tatiana A. Kopkova[5], Andrey A. Kalashnikov[6], Tsovinar S. Garibyan[7]

[1, 3, 4, 5, 6, 7]All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU "VNIIKR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150
[2] Lorkh Russian Potato Federal Research Center, Kraskovo, Lyubertsy, Moscow Oblast, Russia, 140051

[1]*ORCID: 0009-0003-8641-5396; e-mail: abramova.as@phystech.edu*
[2]*ORCID: 0000-0003-1596-8359; e-mail: korenevo2000@mail.ru*
[3]*ORCID: 0009-0000-7338-0153; e-mail: kr.nastya.mail@gmail.com*
[4]*ORCID: 0000-0003-4480-8776; e-mail: asoloviev70@yandex.ru*
[5]*ORCID: 0009-0008-7629-5497; e-mail: kopkova_tatyana@vniikr.ru*
[6]*ORCID: 0009-0007-8827-4792; e-mail: andreysm.uch@mail.ru*
[7]*ORCID: 0000-0001-8226-3792; e-mail: tsovinar1980@mail.ru*

ABSTRACT

This article examines the prospects for using potato plants *in vitro* for maintaining and studying viruses, and provides a brief overview of the recommended protocol for growing and micropropagating potato virus plants *in vitro*. The creation of a collection of pathogenic and quarantine plant viruses *in vitro* is essential for developing a plant virus research base. Many viruses do not maintain well in dead plant material for long periods, so a collection of live isolated plants will allow for the preservation of material and year-round research, as well as the monitoring of symptom development dynamics. Observing symptoms under sterile and isolated *in vitro* conditions will allow for an objective and more accurate characterization of the symptoms caused by various virus strains and species. Certain plants, including those cultured *in vitro*, can serve as indicators and be used to confirm infection. This study utilized plant micropropagation methods, PCR ким растительным материалом. Результаты проведенного исследования доказали эффективность хранения вирусов растений в культуре *in vitro*. Полученные данные методом ОТ-ПЦР-РВ показали сохранение вирусов в ходе микроклонального размножения зараженных вирусами растений в культуре *in vitro* вне зависимости от пассажа. То есть данный метод позволяет хранить живой вирусный материал на протяжении длительного периода времени.

Ключевые слова. *Solanum tuberosum* L, вирусы растений, микроклональное размножение, ПЦР, ОТ-ПЦР-РВ.

combined with reverse transcription to detect viruses in plant material, and sterilization methods necessary for working with aseptic plant material. The results of the study demonstrated the effectiveness of preserving plant viruses *in vitro*. The data obtained using the real-time RT-PCR method demonstrated the persistence of viruses during microclonal propagation of virus-infected plants *in vitro*, regardless of the passage. This method allows for the storage of live viral material over an extended period of time.

Key words. *Solanum tuberosum* L, plant viruses, microclonal propagation, PCR, real-time RT-PCR.

ВВЕДЕНИЕ

Картофель (*Solanum tuberosum* L.) относится к числу наиболее значимых продовольственных и сельскохозяйственных культур, занимая четвертое место в мире по объемам производства, уступая лишь рису, пшенице и кукурузе. (Devaux et al., 2021; Jiang, Du, Zhang, 2022).

Среди большого числа болезней картофеля вирусные являются серьезной глобальной проблемой в картофелеводстве, снижая урожайность картофеля более чем на 50%. Вирусы картофеля X (PVX), Y (PVY), S (PVS) и M (PVM), а также вирус скручивания листьев картофеля (PLRV) являются основными патогенами, снижающими качество и урожайность сельскохозяйственных культур (Григорян, Ткаченко, 2019; Масленникова, Пыхтина, Табанюхов, 2024; Усков и др., 2024; Chung, Yoon, Palukaitis, 2013; Yanagisawa, Matsushita, 2021).

Современные методы борьбы с вирусными инфекциями картофеля осложняются тем, что большинство вирусов не может долго сохраняться в мертвом растительном материале. В этой связи актуальность приобретает разработка и внедрение методов долговременного хранения и исследования вирусов в коллекциях живых изолированных растений (Батыгина, Васильева, 2002; Бабикова, Горпенченко, 2007). Применение культуральных систем *in vitro* открывает новые возможности для круглогодичного поддержания материала, мониторинга развития симптомов и популяционной динамики вирусов.

Особое значение имеют наблюдения за проявлением симптоматики вирусных инфекций в стандартизированных стерильных условиях *in vitro*. Использование растений-индикаторов, в том числе в сочетании с морфологическими признаками и молекулярно-генетическими методами, позволяет объективно оценивать проявление поражения, что расширяет возможности идентификации и характеристики различных штаммов и видов вирусов.

Целью настоящего исследования является изучение особенностей культивирования растений картофеля, инфицированных различными вирусами, в системе *in vitro*. В рамках работы решались задачи установления заражения вирусами асептического материала методом обратной транскрипции в сочетании с мультиплексной полимеразной цепной реакцией и

INTRODUCTION

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the most important food and agricultural crops, ranking fourth in the world in terms of production volume, second only to rice, wheat and corn (Devaux et al., 2021; Jiang, Du, Zhang, 2022).

Among the large number of potato diseases, viral diseases are a serious global problem in potato production, reducing potato yields by more than 50%. Potato viruses X (PVX), Y (PVY), S (PVS) and M (PVM), as well as potato leafroll virus (PLRV) are the main pathogens that reduce the quality and yield of agricultural crops (Grigoryan, Tkachenko, 2019; Maslennikova, Pykhtina, Tabanyukhov, 2024; Uskov et al., 2024; Chung, Yoon, Palukaitis, 2013; Yanagisawa, Matsushita, 2021).

Current methods for controlling potato viral infections are complicated by the fact that most viruses cannot persist for long in dead plant material. Therefore, the development and implementation of methods for long-term storage and study of viruses in collections of living isolated plants is becoming increasingly important (Batygina, Vasilyeva, 2002; Babikova, Gorpenchenko, 2007). The use of *in vitro* culture systems opens up new opportunities for year-round material maintenance, monitoring of symptom development, and virus population dynamics.

Monitoring the manifestation of viral infection symptoms under standardized, sterile *in vitro* conditions is particularly important. The use of indicator plants, including in combination with morphological characteristics and molecular genetic methods, allows for an objective assessment of the manifestations of infection, expanding the possibilities for identifying and characterizing various virus strains and species.

The aim of this study was to investigate the *in vitro* cultivation of potato plants infected with various viruses. This work addressed the problem of detecting viral infection of aseptic material using reverse transcription, multiplex polymerase chain

Табл. 1. Перечень растений картофеля, зараженных вирусами в культуре in vitro
Table 1. List of potato plants infected with viruses in vitro

Образец растений картофеля Potato sample	**Наличие вируса** Virus present
Osa Osa	**PLRV**
24 24	**PVM**
Загадка Zagadka	**PVY**
Красавчик Krasavchik	**PVX**
Лисана Lisana	**PVS**

гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследований являлись растения картофеля различных сортов, зараженные вирусами в культуре *in vitro* (см. табл. 1).

Одним из ключевых факторов успешного культивирования зараженных вирусами растений картофеля *in vitro* является строгий контроль стерильности в отношении других патогенов. Тщательная стерилизация необходима для предотвращения контаминации и развития посторонних патогенных микроорганизмов на искусственных питательных средах, предназначенных для выращивания инфицированных растений. Все работы с зараженными вирусами растениями *in vitro* проводили в ламинарных боксах, обеспечивающих стерильные условия. Перед началом экспериментов и в ходе работы подвергали стерилизации не только рабочее пространство бокса, но и инструменты, лабораторную посуду, питательные среды и прочие расходные материалы в соответствии с методическими рекомендациями (Калашникова, 1998).

Стерилизацию стеклянной посуды и металлических инструментов осуществляли в сухожаровом шкафу при температуре +175 °C в течение двух часов либо автоклавированием. Автоклавированию подвергали пробирки, колбы с дистиллированной водой и питательными средами, которые обрабатывали при температуре 121 °C и давлении 1,2 атм в течение 20 минут (Калашникова, 1998).

Зараженные вирусами растения картофеля культивировали на универсальной безгормональной питательной среде Мурасиге – Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962), используя метод микроклонального размножения. Для поддержания стерильных условий внутренние поверхности ламинар-бокса протирали 5%-м раствором дезинфицирующего средства «Дезитабс», содержащего натриевую соль дихлоризоциануровой кислоты, а также облучали бактерицидными ультрафиолетовыми лампами в течение 10–12 часов. После УФ-облучения включали свет и обеспечивали вентиляцию (Калашникова, 1998).

Перед началом работ руки протирали 70%-м этанолом. Внутри ламинар-бокса в стерильные стеклянные пробирки разливали растопленную агаризованную питательную среду МС (температура среды (60 ± 5) °C) по 30 мл в каждую. Пробирки с растениями, пригодными для черенкования, обрабатывали 96%-м спиртом, после чего поме-

reaction, and real-time fluorescence hybridization detection (real-time RT-PCR).

MATERIALS AND METHODS

The objects of the study were potato plants of different varieties infected with viruses *in vitro* culture (Table 1).

One of the key factors for the successful *in vitro* cultivation of virus-infected potato plants is strict sterility control with respect to other pathogens. Thorough sterilization is necessary to prevent contamination and the development of foreign pathogens in artificial nutrient media intended for growing infected plants. All work with virus-infected plants *in vitro* was carried out in laminar flow hoods ensuring sterile conditions. Before and during experiments, not only the hood workspace but also the instruments, laboratory glassware, nutrient media, and other consumables were sterilized in accordance with methodological recommendations (Kalashnikova, 1998).).

Glassware and metal instruments were sterilized in a dry-heat oven at 175°C for 2 hours or by autoclaving. Test tubes and flasks containing distilled water and nutrient media were autoclaved at 121°C and 1.2 atm for 20 minutes (Kalashnikova, 1998).

Virus-infected potato plants were grown on a universal, hormone-free Murashige-Skoog (MS) medium (Murashige and Skoog, 1962) using micropropagation. To maintain sterile conditions, the interior surfaces of the laminar flow cabinet were wiped with a 5% solution of Desitabs disinfectant containing sodium dichloroisocyanurate and irradiated with bactericidal ultraviolet lamps for 10–12 hours. After UV irradiation, the lights were turned on and ventilation was provided (Kalashnikova, 1998).

Before starting work, hands were wiped with 70% ethanol. Inside a laminar flow hood, melted MS agar nutrient medium (temperature 60 ± 5 °C) was poured into sterile glass test tubes, 30 ml each. The tubes containing plants suitable for cuttings were treated with 96% alcohol and then placed in the laminar flow hood. Using sterile tweezers, the plants were carefully removed from the tubes and placed on the prepared surface for cuttings. Using a sterile scalpel, the plant was divided so that each part contained a stem segment with a leaf and an axillary bud. The resulting cuttings were transplanted into test tubes containing MS nutrient medium, щали в ламинарный бокс. Стерильным пинцетом растения аккуратно извлекали из пробирок и размещали для черенкования на подготовленную поверхность. Используя стерильный скальпель, делили растение так, чтобы каждая часть содержала отрезок стебля с листом и пазушной почкой. Образовавшиеся черенки пересаживали в пробирки с питательной средой МС, погружая их на глубину междоузлия (Ескендирова и др., 2013). Интервал между последовательными черенкованиями составлял 20–25 дней.

Для исключения перекрестного заражения использовали индивидуальные комплекты инструментов для каждого образца растения. Все инструменты в процессе работы регулярно дезинфицировали, прокаливая в пламени спиртовки (Бабикова, Горпенченко, 2007).

После черенкования пробирки размещали на фитостеллажах в световой камере с освещенностью 3000 люкс, температурой (22 ±2) °С и световым режимом 16 часов в сутки. Корнеобразование у черенков отмечали уже на третий день. Для массового размножения растений картофеля микроклональное размножение осуществляли с интервалом 20–25 дней. Безвирусные растения с пятью–шестью узлами периодически пересаживали в свежие питательные среды, что обеспечивало непрерывное получение новых пробирочных растений (Ескендирова и др., 2013).

Для получения растительных экстрактов 0,4 г материала гомогенизировали в 6 мл экстрагирующего буфера, состоящего из фосфатно-солевого буфера с детергентом (PBST) с добавлением 2%-го поливинилпирролидона (PVP) и 0,2%-го бычьего сывороточного альбумина (BSA). Нуклеиновые кислоты выделяли с использованием коммерческого набора компании «Агродиагностика».

Далее выделенные нуклеиновые кислоты использовали для выявления вирусов картофеля с помощью коммерческих наборов реагентов компании «Синтол», предназначенных для дифференциальной диагностики РНК исследуемых вирусов методом обратной транскрипции с полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ).

ОТ-ПЦР-РВ выполняли на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Детекцию флуоресценции проводили на стадии элонгации с использованием каналов FAM, ROX и HEX. Для анализа конечных результатов применяли программное обеспечение LightCycler® 96, версия SW1.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выращивание растений картофеля, инфицированных вирусами и свободных от других патогенных микроорганизмов, осуществляли на универсальной безгормональной питательной среде Мурасиге – Скуга (МС) в культуре *in vitro* посредством регулярного микрочеренкования с интервалом 20–25 дней (см. табл. 2). После микрочеренкования зараженные вирусами растения пересаживали в пробирки со свежей питательной средой МС (см. рис. 1, a). К 14-му дню после черенкования рост растений достигал 10–15 см (см. рис. 1, b).

Следует отметить, что в течение более полугода растения трех пассажей не имели морфологи-

immersing them to the depth of an internode (Eskendirova et al., 2013). The interval between successive cuttings was 20-25 days.

To prevent cross-contamination, individual sets of instruments were used for each plant specimen. All instruments were regularly disinfected during the work process by heating them in a spirit lamp (Babikova, Gorpenchenko, 2007).).

After propagation by cuttings, the test tubes were placed on phytoracks in a light chamber with 3000 lux illumination, a temperature of 22°C (±2°C), and a light regime of 16 hours per day. Rooting of the cuttings was observed as early as the third day. For mass propagation of potato plants, micropropagation was carried out at intervals of 20–25 days. Virus-free plants with 5–6 nodes were periodically transplanted into fresh nutrient media, which ensured the continuous production of new test tube plants (Eskendirova et al., 2013).

To obtain plant extracts, 0.4 g of material was homogenized in 6 ml of extraction buffer consisting of phosphate-buffered saline with Tween (PBST) supplemented with 2% polyvinylpyrrolidone (PVP) and 0.2% bovine serum albumin (BSA). Nucleic acids were isolated using an Agrodiagnostika commercial kit.

The isolated nucleic acids were then used to detect potato viruses using Synthol commercial reagent kits designed for differential diagnostics of RNA of the viruses under study using the method of reverse transcription with polymerase chain reaction in real time (real-time RT-PCR).

Real-time RT-PCR was performed on a CFX96 Touch instrument (Bio-Rad, USA). Fluorescence detection was performed during the elongation phase using the FAM, ROX, and HEX channels. LightCycler® 96 software, version SW1.1, was used for final results analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Potato plants infected with viruses and free of other pathogens were grown *in vitro* on a universal hormone-free Murashige-Skoog (MS) nutrient medium by regular microcutting at intervals of 20–25 days (Table 2). After microcutting, virus-infected plants were transplanted into test tubes with fresh MS nutrient medium (Fig. 1a). By the 14th day after cutting, plant growth reached 10–15 cm (Fig. 1b).).

It should be noted that for more than six months, plants from the three passages showed no morphological differences between passages. However, varietal differentiation was noted in the number of nodes per plant, which explains the differences in cuttings between the variants.

The plants obtained as a result of *in vitro* propagation were analyzed for the presence of the studied viruses—PVX, PVY, PLRV, PVM, and PVS. Leaves and microtubers (if available) of plants of each variety and passage were selected for analysis (Table 3).).

In the study, 25 samples were analyzed using real-time RT-PCR, including 5 contamination controls (negative controls) and 5 positive controls from commercial diagnostic kits. Amplification of the controls was detected in all samples, indicating the absence of an inhibitory effect and confirming the

Табл. 2. Пассажи пробирочных растений картофеля, зараженных разными вирусами
Table 2. Passages of test-tube potato plants infected with different viruses

Вирусы Viruses	**Число пробирочных растений картофеля в ходе пассажей, шт.** Number of test-tube potato plants during passages, pcs.			**Всего** Total
	1-й пассаж 1 passage	**2-й пассаж** 2 passage	**3-й пассаж** 3 passage	
PVX	**6**	**15**	**24**	**45**
PVY	**14**	**20**	**27**	**61**
PLRV	**10**	**21**	**36**	**67**
PVM	**10**	**23**	**35**	**68**
PVS	**6**	**17**	**25**	**48**

Табл. 3. Список исследуемых образцов растений картофеля *in vitro*, зараженных вирусами, используемых для ПЦР-анализа
Table 3. List of *in vitro* potato plant samples infected with viruses used for PCR analysis

№ образца Sample №	**Сорт картофеля** Potato variety	**Вирус** Virus	**Материал** Material	**№ пассажа** Passage №
1	**Osa** Osa	**PLRV**	**листья** leaves	**3**
2	**Osa** Osa	**PLRV**	**клубни** tubers	**1**
3	**Osa** Osa	**PLRV**	**листья** leaves	**1**
4	**24** 24	**PVM**	**листья** leaves	**3**
5	**24** 24	**PVM**	**клубни** tubers	**1**
6	**24** 24	**PVM**	**листья** leaves	**1**
7	**Загадка** Zagadka	**PVY**	**листья** leaves	**1**
8	**Загадка** Zagadka	**PVY**	**клубни** tubers	**1**
9	**Загадка** Zagadka	**PVY**	**листья** leaves	**3**
10	**Красавчик** Krasavchik	**PVX**	**листья** leaves	**3**
11	**Красавчик** Krasavchik	**PVX**	**клубни** tubers	**3**
12	**Красавчик** Krasavchik	**PVX**	**листья** leaves	**1**
13	**Лисана** Lisana	**PVS**	**листья** leaves	**3**
14	**Лисана** Lisana	**PVS**	**клубни** tubers	**1**
15	**Лисана** Lisana	**PVS**	**листья** leaves	**1**

ческих различий между пассажами. При этом отмечена сортовая дифференциация по числу узлов на растении, чем обусловлено различие черенкованных растений между вариантами.

Полученные в результате размножения *in vitro* растения подвергали анализу на присутствие в них изучаемых вирусов – PVX, PVY, PLRV, PVM и PVS. Для анализа отбирали листья и микроклубни (при наличии) растений каждого сорта и пассажа (см. табл. 3).

В исследовании методом ОТ-ПЦР-РВ проанализировано 25 образцов, включая пять контролей контаминации (отрицательный контроль) и пять положительных контролей из коммерческих диагностических наборов. Амплификация контролей была зафиксирована во всех образцах, что свидетельствует об отсутствии ингибирующего воздействия и подтверждает корректность полученных данных. Положительные контроли продемонстрировали ожидаемые пороговые циклы (C_q).

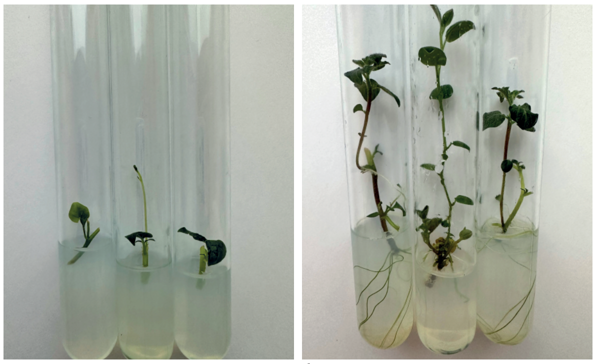
Результаты ОТ-ПЦР-РВ, представленные в табл. 4, подтверждают присутствие исследуемых вирусов во всех анализируемых растениях, что

accuracy of the obtained data. Positive controls demonstrated the expected threshold cycles (Cq).

The results of real-time RT-PCR presented in Table 4 confirm the presence of the studied viruses in all analyzed plants, which indicates the success of microclonal propagation and the preservation of viral material throughout the cutting procedure.

CONCLUSION

The study demonstrated the high effectiveness of *in vitro* culture as a tool for maintaining and studying potato plant viruses. Regular microcutting of plants infected with PVX, PVY, PLRV, PVM, and PVS viruses allows for the maintenance of both the viability of the plants themselves and the viability and stability of the viral material over a long period.



a b

Рис. 1. а – черенки растений картофеля, зараженные вирусом PVX, сорта Красавчик сразу после черенкования; b – черенки растений картофеля, зараженные вирусом PVX, сорта Красавчик спустя 14 дней после черенкования

Fig. 1. a. Cuttings of potato plants infected with the PVX virus, variety "Krasavchik" immediately after propagation; b. Cuttings of potato plants infected with the PVX virus, variety "Krasavchik" 14 days after propagation

свидетельствует об успешности микроклонального размножения и сохранении вирусного материала на протяжении процедуры черенкования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования доказана высокая эффективность культуры *in vitro* как инструмента для поддержания и изучения вирусов растений картофеля. Регулярное микрочеренкование растений, зараженных вирусами PVX, PVY, PLRV, PVM и PVS, позволяет сохранять как сами растения в жизнеспособном состоянии, так и жизнеспособность и стабильность вирусного материала на протяжении длительного времени.

Молекулярно-генетический анализ методом ОТ-ПЦР-РВ подтвердил устойчивое присутствие исследуемых вирусов в растительном материале на разных этапах микрочеренкования, что свидетельствует о надежности выбранной методики.

Полученные данные позволяют заключить, что микроклональное размножение *in vitro* обеспечивает сохранность вирусов и растений, в которых они размножаются, что дает возможность создания стандартизированной коллекции растений с вирусной моноинфекцией для их долговременного хранения и дальнейшего исследования.

Полученные результаты могут служить основой для разработки новых протоколов хранения вирусных коллекций и внедрения современных диагностических технологий в лабораторную практику.

Исследования выполнены в рамках государственного задания «Разработка методов введения и поддержания вирусов в культуре *in vitro*» (регистрационный номер НИОКТР 125040304814-8).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабикова А.В., Горпенченко Т.Ю., Журавлев Ю.Н. Растение как объект биотехнологии // Комаровские чтения. 2007. LV. С. 184–211.

2. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2002, 232 с.

3. Григорян М.А., Ткаченко О.В. Получение оздоровленного картофеля и диагностика вирусных заболеваний в условиях Энгельсского района

Molecular genetic analysis using the real-time RT-PCR method confirmed the stable presence of the studied viruses in plant material at different stages of micro-cutting, which indicates the reliability of the chosen method.

The obtained data allow us to conclude that *in vitro* microclonal propagation ensures the preservation of viruses and the plants in which they reproduce, which makes it possible to create a standardized collection of plants with viral monoinfection for their long-term storage and further research.

The obtained results can serve as a basis for the development of new protocols for storing viral collections and the introduction of modern diagnostic technologies into laboratory practice.

The research was carried out within the framework of the state assignment “Development of methods for introducing and maintaining viruses *in vitro* culture” (registration number NIOKTR 125040304814-8)).

REFERENCES

1. Babikova A.V., Gorpenchenko T.Yu., Zhuravlev Yu.N. Plant as an object of biotechnology [Rasteniye kak obyekt biotekhnologii] // Komarov readings. 2007. LV. P. 184-211. (In Russ.)

2. Batygina T.B., Vasilyeva V.E. Plant propagation. [Razmnozhenie rasteniy] SPb.: Publishing house St. Petersburg. Univ., 2002, 232 pp. (In Russ.)

3. Grigoryan M.A., Tkachenko O.V. Obtaining healthy potatoes and diagnostics of viral diseases in the Engels district of Saratov Oblast [Polucheniye ozdorovlennogo kartofelya i diagnostika virusnykh zabolevaniy v usloviyakh Engelsskogo rayona Saratovskoy oblasti] // Agrarian science. 2019; 3: 60-63. https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-3-60-63 (In Russ.)

4. Eskandirova S. Z. et al. Isolation, purification and immunochemical characterization of potato virus preparations [Vydeleniye, ochistka i immunokhimicheskaya kharakteristika virusnykh preparatov kartofelya] // Biotechnology. Theory and Practice. 2013; 4: 63-67. https://doi.org/10.11134/btp.4.2013.10 (In Russ.)

5. Kalashnikova B.A. Clonal micropropagation of plants [Klonalnoye mikrorazmnozheniye rasteniy] // Agricultural biotechnology: Ed. by V.S. Shevelukha. Moscow: Higher school, 1998. 36–66 p. (In Russ.)

6. Maslennikova V. S., Pykhtina M. B., Tabanyukhov K. A. Prevalence and species composition of potato viruses in Novosibirsk Oblast [Rasprostranennost i vidovoy sostav virusov kartofelya v Novosibirskoy oblasti] // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2024; 28 (5):554-562. https://doi.org/10.18699/vjgb-24-61 (In Russ.)

7. Uskov A. I. et al. Serological and phytopathological characteristics of potato Y-virus isolates distributed in various regions of the Russian Federation [Serologicheskaya i fitopatologicheskaya kharakteristika izolyatov Y-virusa kartofelya, rasprostranennykh na territorii razlichnykh regionov Rossiyskoy Federatsii] // Scientific works on agronomy. 2024; 4 (15): 26-34. (In Russ.)

Табл. 4. Результаты ОТ-ПЦР-РВ образцов растений картофеля *in vitro*, зараженных вирусами, по двум каналам флуоресценции
Table 4. Results of real-time RT-PCR of potato plant samples in vitro infected with viruses, using two fluorescence channels

№ образца Sample №	**Сорт картофеля** Potato variety	**Вирус** Virus	**№ пассажа** Passage №	**Значение C_q** C_q
1	**Osa** Osa	**PLRV**	**3**	**22,27**
2	**Osa** Osa	**PLRV**	**1**	**18,39**
3	**Osa** Osa	**PLRV**	**1**	**18,32**
Положительный контроль Positive control		**PLRV**	**-**	**35,17**
Отрицательный контроль Negative control		**PLRV**	**-**	**0,00**
4	**24**	**PVM**	**3**	**19,02**
5	**24**	**PVM**	**1**	**21,16**
6	**24**	**PVM**	**1**	**22,48**
Положительный контроль Positive control		**PVM**	**-**	**34,87**
Отрицательный контроль Negative control		**PVM**	**-**	**0,00**
7	**Загадка** Zagadka	**PVY**	**1**	**21,54**
8	**Загадка** Zagadka	**PVY**	**1**	**24,73**
9	**Загадка** Zagadka	**PVY**	**3**	**20,08**
Положительный контроль Positive control		**PVY**	**-**	**28,84**
Отрицательный контроль Negative control		**PVY**	**-**	**0,00**
10	**Красавчик** Krasavchik	**PVX**	**3**	**21,85**
11	**Красавчик** Krasavchik	**PVX**	**3**	**22,89**
12	**Красавчик** Krasavchik	**PVX**	**1**	**20,14**
Положительный контроль Positive control		**PVX**	**-**	**26,77**
Отрицательный контроль Negative control		**PVX**	**-**	**0,00**
13	**Лисана** Lisana	**PVS**	**3**	**15,85**
14	**Лисана** Lisana	**PVS**	**1**	**17,82**
15	**Лисана** Lisana	**PVS**	**1**	**14,72**
Положительный контроль Positive control		**PVS**	**-**	**28,51**
Отрицательный контроль Negative control		**PVS**	**-**	**0,00**

Саратовской области // Аграрная наука. 2019. № 3. С. 60–63. https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-3-60-63.

4. Ескендирова С. З. и др. Выделение, очистка и иммунохимическая характеристика вирусных препаратов картофеля // Биотехнология. Теория и практика. 2013. № 4, С. 63–67. https://doi.org/10.11134/btp.4.2013.10.

5. Калашникова Б.А. Клональное микроразмножение растений // Сельскохозяйственная биотехнология: Под ред. В.С. Шевелухи. М.: Высш. шк., 1998. С. 36–66.

6. Масленникова В. С., Пыхтина М. Б., Табанюхов К. А. Распространенность и видовой состав вирусов картофеля в Новосибирской области // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2024. № 28 (5). С. 554–562. https://doi.org/10.18699/vjgb-24-61.

8. Chung, B.N., Yoon, J.Y., Palukaitis, P. Engineered resistance in potato against potato leafroll virus, potato virus A and potato virus Y // Virus Genes. 2013. Vol. 47. P. 86–92. https://doi.org/10.1007/s11262-013-0904-4

9. Devaux, A., Goffart, J.P., Kromann, P., Andrade, P.J., Polar, V., Hareau, G. The Potato of the Future: Opportunities and Challenges in Sustainable Agri-food Systems // Potato Res. 2021. Vol. 64. P. 681–720. https://doi.org/10.1007/s11540-021-09501-4

7. Усков А. И. и др. Серологическая и фитопатологическая характеристика изолятов Y-вируса картофеля, распространенных на территории различных регионов Российской Федерации // Научные труды по агрономии. 2024. № 4 (15). С. 26–34.

8. Chung, B.N., Yoon, J.Y., Palukaitis, P. Engineered resistance in potato against potato leafroll virus, potato virus A and potato virus Y // Virus Genes. 2013. Vol. 47. P. 86–92. https://doi.org/10.1007/s11262-013-0904-4.

9. Devaux, A., Goffart, J.P., Kromann, P., Andrade, P.J., Polar, V., Hareau, G. The Potato of the Future: Opportunities and Challenges in Sustainable Agrifood Systems // Potato Res. 2021. Vol. 64. P. 681–720. https://doi.org/10.1007/s11540-021-09501-4.

10. Jiang L., Du Z., Zhang G. Advances in RNA-Silencing-Related Resistance against Viruses in Potato // Genes. 2022. Vol. 13(5). P. 731. https://doi.org/10.3390/genes13050731

11. Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473–497. https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x

12. Yanagisawa H., Matsushita Y. Occurrence and distribution of viruses infecting potato in Russia // Letters in Applied Microbiology. 2021. Vol. 73. P. 64 – 72. https://doi.org/10.1111/lam.13476

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Абрамова Александра Сергеевна, младший научный сотрудник, аспирант, лаборатория «Государственная коллекция карантинных организмов», ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0009-0003-8641-5396;
e-mail: abramova.as@phystech.edu

Усков Александр Иринархович, доктор сельскохозяйственных наук, заведующий отделом биотехнологии и иммунодиагностики, ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени Лорха», г. Люберцы, Московская обл., Россия;
ORCID: 0000-0003-1596-8359;
e-mail: korenevo2000@mail.ru

Соловьев Александр Александрович, заместитель директора, доктор биологических наук, профессор РАН, ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0000-0003-4480-8776;
e-mail: asoloviev70@yandex.ru

Кирюшина Анастасия Святославовна, младший научный сотрудник, лаборатория «Государственная коллекция карантинных организмов», ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0009-0000-7338-0153;
e-mail: kr.nastya.mail@gmail.com

Копкова Татьяна Анатольевна, научный сотрудник, лаборатория «Государственная коллекция карантинных организмов», ученый секретарь, ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0009-0008-7629-5497;
e-mail: kopkova_tatyana@vniikr.ru

Калашников Андрей Алексеевич, младший научный сотрудник, аспирант, лаборатория «Государственная коллекция карантинных организмов», ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0009-0007-8827-4792;
e-mail: andreysm.uch@mail.ru

Гарибян Цовинар Саркисовна, кандидат технических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией «Государственная коллекция карантинных организмов», ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0000-0001-8226-3792;
e-mail: tsovinar1980@mail.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Aleksandra Abramova, Junior Researcher, Postgraduate student, Laboratory of State Collection of Quarantine Pests, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID: 0009-0003-8641-5396;
e-mail: abramova.as@phystech.edu

Aleksandr Uskov, Advanced Doctor of Agriculture, Head of the Department of Biotechnology and Immunodiagnostics, Lorkh Russian Potato Federal Research Center, Lyubertsy, Moscow Oblast, Russia;
ORCID: 0000-0003-1596-8359;
e-mail: korenevo2000@mail.ru

Aleksandr Soloviev, Deputy Director, Advanced Doctor of Biology, Professor of the Russian Academy of Sciences, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID: 0000-0003-4480-8776;
e-mail: asoloviev70@yandex.ru

Anastasia Kiryushina, Junior Researcher, Laboratory of State Collection of Quarantine Pests, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID: 0009-0000-7338-0153;
e-mail: kr.nastya.mail@gmail.com

Tatiana Kopkova, Researcher, Laboratory of State Collection of Quarantine Pests, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID: 0009-0008-7629-5497;
e-mail: kopkova_tatyana@vniikr.ru

Andrey Kalashnikov, Junior Researcher, Postgraduate student, Laboratory of State Collection of Quarantine Pests, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID: 0009-0007-8827-4792;
e-mail: andreysm.uch@mail.ru

Tsovinar Garibyan, Phd Technical Sciences, Senir Researcher, Head of Laboratory of State Collection of Quarantine Pests, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID: 0000-0001-8226-3792;
e-mail: tsovinar1980@mail.ru

DOI 10.69536/FKR.2025.18.13.002
УДК 632.4:633.1

Ювенильная устойчивость пшеницы к листостебельным болезням в Поволжье

*Баранова О.А.[1], Расторгуева Т.Р.[2], Коваленко Н.М.[3], Мироненко Н.В.[4]
[1,2,3,4] ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ВИЗР), г. Санкт-Петербург, Россия, 196608
[2]Санкт-Петербургский государственный университет (СПбГУ), г. Санкт-Петербург, Россия, 199034
[1]*ORCID ID: 0000-0001-9439-2102, e-mail: baranova_oa@mail.ru*
[2]*e-mail: rastorguevataya@gmail.com*
[3]*ORCID ID: 0000-0001-9577-8816, e-mail: nadyakov@mail.ru*
[4]*ORCID ID: 0000-0003-3383-2973, e-mail: nina2601mir@mail.ru*

АННОТАЦИЯ

Пшеница (*Triticum aestivum* L.) является одной из наиболее важных для человека зерновых культур. В России основные зернопроизводящие регионы – это Западная Сибирь, Краснодарский край и Поволжье. Значительному снижению урожая пшеницы способствуют заболевания, вызываемые грибными патогенами, такими как стеблевая ржавчина (возбудитель *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) и желтая пятнистость (возбудитель *Pyrenophora tritici-repentis*). В работе проведена оценка ювенильной устойчивости в лабораторных условиях 92 яровых сортов мягкой пшеницы, возделываемых на территории Поволжья, к двум популяциям *P. graminis* f. sp. *tritici* (челябинской популяции гриба 2024 года и чувашской популяции 2025 года) и двум популяциям *Pyrenophora tritici-repentis* (тамбовской популяции патогена 2024 года и пензенской популяции 2025 года), а также идентификация генов устойчивости к стеблевой ржавчине (*Sr24, Sr25, Sr26, Sr28, Sr31, Sr36, Sr38, Sr57, Sr1A1R*) и доминантной аллели гена восприимчивости к желтой пятнистости *Tsn1* с помощью молекулярных маркеров. Показано, что к челябинской популяции стеблевой ржавчины были устойчивы 26 сортов (28,2%), к чувашской популяции гриба – 50 сортов (54,3%). К обеим популяциям возбудителя стеблевой ржавчины был устойчив 21 сорт (22,8%). К тамбовской популяции желтой пятнистости умеренно устойчивы 15,2% и устойчивы 2,2% сортов, к пензенской популяции гриба умеренно устойчивы 34,7% и устойчивы 47,8% сортов. К обеим популяциям возбудителя желтой пятнистости умеренно устойчивы 11 сортов (11,9%), устойчивы два сорта – Экада 253 и Скирда, что составило 2,1% от общего количества сортов.

DOI 10.69536/FKR.2025.18.13.002
UDC 632.4:633.1

Seedling resistance of wheat to leaf diseases in the Volga region (Russia)

*Olga A. Baranova[1], Taisia R. Rastorgueva[2], Nadezhda M. Kovalenko[3], Nina V. Mironenko[4]
[1,2,3,4] All-Russian Institute of Plant Protection (VIZR), St. Petersburg, Russia, 196608
[2]Saint Petersburg State University (SPbSU), Saint Petersburg, Russia, 199034
[1]*ORCID ID: 0000-0001-9439-2102, e-mail: baranova_oa@mail.ru*
[2]*e-mail: rastorguevataya@gmail.com*
[3]*ORCID ID: 0000-0001-9577-8816, e-mail: nadyakov@mail.ru*
[4]*ORCID ID: 0000-0003-3383-2973, e-mail: nina2601mir@mail.ru*

ABSTRACT

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most important grain crops for humans. In Russia, the main grain-producing regions are Western Siberia, Krasnodar Krai, and the Volga region. Diseases caused by fungal pathogens, such as stem rust (caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) and tan spot (caused by *Pyrenophora tritici-repentis*), significantly reduce wheat yields. This study assessed the seedling resistance of 92 spring bread wheat cultivars grown in the Volga region to two populations of *P. graminis* f. sp. *tritici* (Chelyabinsk population of the fungus of 2024 and Chuvashia population of 2025) and two populations of *Pyrenophora tritici-repentis* (Tambov population of 2024 and Penza population of 2025) under laboratory conditions. Also, the identification of genes for resistance to stem rust (*Sr24, Sr25, Sr26, Sr28, Sr31, Sr36, Sr38, Sr57, Sr1A1R*) and the dominant allele of the gene for susceptibility to tan spot - *Tsn1* were carried out using molecular markers. It was shown that 26 cultivars (28.2%) were resistant to the Chelyabinsk population of stem rust, and 50 cultivars (54.3%) to the Chuvashia population of the fungus. A total of 21 cultivars (22.8%) were resistant to both populations of the stem rust. 15.2% of cultivars were moderately resistant to the Tambov population of tan spot, while 2.2% of cultivars were resistant. 34.7% of cultivars were moderately resistant to the Penza population of the fungus, while 47.8% of cultivars were resistant. Eleven cultivars (11.9%) were moderately resistant to both populations of the tan spot, while 2 cultivars, Ekada 253 and Skirda, were resistant, which accounted for 2.1% of the total number of cultivars. The following genes were

В сортах идентифицированы гены: *Sr31, Sr24, Sr25, Sr28, Sr38, Sr57, Sr1A1R, Tsn1*. Выделены перспективные сорта с групповой устойчивостью: 100 лет ТАССР (*Sr31, Tsn1*), Канюк (*Sr24+Sr1A1R, tsn1*), Экада 253 (*Sr31, tsn1*) и Экада 258 (*Sr31, tsn1*).

Ключевые слова: яровые сорта мягкой пшеницы, ювенильная устойчивость, стеблевая ржавчина, желтая пятнистость, *Sr*-гены, *Tsn1*.

identified in the cultivars: *Sr31, Sr24, Sr25, Sr28, Sr38, Sr57, Sr1A1R*, and *Tsn1*. Promising cultivars with group resistance were identified: 100 years of TASSR (*Sr31, Tsn1*), Kanyuk (*Sr24+Sr1A1R, tsn1*), Ekada 253 (*Sr31, tsn1*) and Ekada 258 (*Sr31, tsn1*).

Keywords: spring bread wheat cultivars, seedling resistance, stem rust, tan spot, *Sr* genes, *Tsn1*.

ВВЕДЕНИЕ

Поволжье – один из основных зернопроизводящих регионов нашей страны. В последние годы в регионе ухудшается фитопатологическая ситуация, связанная с возбудителями стеблевой ржавчины (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) и желтой пятнистости (*Pyrenophora tritici-repentis*). Стеблевая ржавчина относится к особо опасным заболеваниям пшеницы, потери урожая на восприимчивых сортах при эпифитотийном развитии патогена могут достигать 80% и более (Ashagre, 2022). Основная проблема ржавчинных заболеваний состоит в том, что урединиоспоры гриба переносятся воздушными массами на огромные расстояния (Leonard and Szabo, 2005). Недаром один из известнейших в мире селекционеров Норман Борлоуг сказал свою знаменитую фразу: «У ржавчины нет границ». В настоящее время, с одной стороны, по странам Африки и Ближнего Востока распространяется раса Ug99 (TTKSK), вирулентная к сортам с геном *Sr31,* и вероятен ее занос на территорию Поволжья через Каспийское море, с другой стороны – в Европе и России есть свои агрессивные расы гриба, авирулентные к *Sr31*, но поражающие сорта без этого гена (Patpour et al., 2022). В Поволжье увеличение вредоносности возбудителя стеблевой ржавчины наблюдается с 2016 года, когда эпифитотийное развитие патогена затронуло Республику Татарстан и Саратовскую область (Василова и др., 2017; Baranova et al., 2023).

Что касается желтой пятнистости, то в среднем заболевание вызывает потери 5–10% урожая, но на восприимчивых сортах в эпифитотийные годы они могут достигать 65% и более (Rees et al., 1982). Так, на территории Саратовской области (Нижнее Поволжье) с 2000 года отмечается массовое распространение и сильное эпифитотийное развитие желтой пятнистости (Маркелова и др., 2012). В 2018 г. в Саратовской области поражение растений пшеницы патогеном было 30–40%, а в 2019 г. развитие болезни достигало уже 80% на восприимчивых сортах (Конькова, Лящева, 2020).

Таким образом, оценка сортов, рекомендованных к возделыванию на территории Поволжья, на устойчивость к стеблевой ржавчине и желтой пятнистости является актуальным направлением исследований.

Идентификация генов устойчивости растений с помощью молекулярных маркеров, рекомендованных для маркер-ориентированной селекции, – удобный инструмент в руках исследо-

INTRODUCTION

The Volga region is one of the main grain-producing regions of Russia. In recent years, the phytopathological situation associated with stem rust (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) and tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) has worsened in the region. Stem rust is a particularly dangerous disease of wheat; yield losses on susceptible cultivars during epiphytotic development of the pathogen can reach 80% or more (Ashagre, 2022). The main problem with rust diseases is that the fungal urediniospores are carried by air masses over vast distances (Leonard and Szabo, 2005). One of the world's most renowned plant breeders, Norman Borlaug, famously said, "Rust knows no boundaries." Currently, on the one hand, the Ug99 (TTKSK) race, virulent to cultivars with the *Sr31* gene, is spreading across Africa and the Middle East, and it is likely to be introduced into the Volga region via the Caspian Sea. On the other hand, Europe and Russia have their own aggressive fungus races, avirulent to *Sr31*, but affecting cultivars without this gene (Patpour et al., 2022). In the Volga region, an increase in the harmfulness of the stem rust pathogen has been observed since 2016, when the epiphytotic development of the pathogen affected the Republic of Tatarstan and Saratov Oblast (Vasilova et al., 2017; Baranova et al., 2023).

As for tan spot, the disease causes yield losses of 5-10% on average, but in susceptible cultivars in epiphytotic years, they can reach 65% or more (Rees et al., 1982). Thus, in Saratov Oblast (Lower Volga region), a widespread spread and strong epiphytotic development of tan spot has been observed since 2000 (Markelova et al., 2012). In 2018, in Saratov Oblast, damage to wheat plants by the pathogen reached 30-40%, and in 2019, the development of the disease reached 80% on susceptible cultivars (Konkova, Lyashcheva, 2020).

Thus, the evaluation of cultivars recommended for cultivation in the Volga region for resistance to stem rust and tan spot is a relevant area of research.

вателя, позволяющий определить, какими генами детерминирована устойчивость к патогенам в сортах. Использование молекулярных маркеров наряду с фитопатологической оценкой устойчивости дает возможность выделить перспективные доноры устойчивости, которые могут представлять интерес для селекции.

В связи с этим целью работы была оценка ювенильной устойчивости 92 сортов яровой мягкой пшеницы, возделываемых на территории Поволжья, к стеблевой ржавчине и желтой пятнистости и идентификация в них генов устойчивости к стеблевой ржавчине – *Sr*-генов и восприимчивости к желтой пятнистости – *Tsn1*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе анализировали 92 сорта яровой мягкой пшеницы, возделываемые на территории Поволжья. Для оценки ювенильной устойчивости в лабораторных условиях использовали челябинскую популяцию стеблевой ржавчины 2024 года и чувашскую популяцию стеблевой ржавчины 2025 года; тамбовскую популяцию желтой пятнистости 2024 года и пензенскую популяцию желтой пятнистости 2025 года. Размножение популяций стеблевой ржавчины и анализ устойчивости растений в стадии проростков проводили по стандартной лабораторной методике (Jin et al., 2007). Для заражения проростков пшеницы возбудителем стеблевой ржавчины использовали суспензию урединиоспор *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (концентрация суспензии – 1 мг урединиоспор гриба на 1 мл воды с «Твин 80»). Реакцию проростков на инокуляцию суспензией спор возбудителя стеблевой ржавчины проводили на 12-е сутки по стандартной четырехбалльной шкале E.C. Stakman and M.N. Levine (1962).

Для оценки устойчивости сортов пшеницы к возбудителю желтой пятнистости отсеченные листья 10-дневных проростков помещали в кювету на фильтровальную бумагу, смоченную бензимидазолом (40 мг/л), и инокулировали суспензией конидий гриба в концентрации 5000 кон/мл. Устойчивость оценивали на пятый день после заражения по пятибалльной шкале (Rees et al.,1987; Михайлова и др., 2012), в которой комбинации баллов поражения в виде некроз/хлороз интерпретировали следующим образом: R (0/0, 0/1, 1/0, 1/1,) – устойчивые, MR (1/2, 2/2, 2/1) – умеренно устойчивые, S (3/3, 3 /4, 4/3, 4/4, 2/3, 3/2) – восприимчивые, HS (4/3, 4/4, 4/5, 5/4, 5/5) – высоко восприимчивые.

ДНК растений пшеницы выделяли из пятидневных проростков СТАВ-методом (Murray, Thompson, 1980). Для идентификации генов устойчивости и восприимчивости использовали специфичные праймеры: Sr24#12– *Sr24* (Mago et al., 2005), Gb – *Sr25/Lr19* (Prins et al., 2001), Sr26#43 – *Sr26* (Mago et al.,2005); *wPt-7004-PCR – Sr28* (Rouse et. al. 2012), scm9 –*Sr31/Lr26* и *Sr1A1R*) (Weng et al., 2007); *Xwmc477*, *Xstm773-2 – Sr36* (Tsilo et al.,2008); *Xcmwg682- Sr38* (Helguera et al., 2003); csLV34 – *Sr57/Lr34* (Lagudah et al., 2006); *Xfcp623 - Tsn1* (Faris et al., 2010). Амплификацию проводили с использованием смеси ПЦР (БиоМастер HS-Taq ПЦР (2×) Биолабмикс). Электрофорез продуктов амплифи-

Identification of plant resistance genes using molecular markers recommended for marker-assisted breeding is a convenient tool for researchers, allowing them to determine which genes determine pathogen resistance in cultivars. The use of molecular markers, along with phytopathological assessment of resistance, makes it possible to identify promising resistance donors that may be of interest for breeding.

In this regard, the aim of the work was to evaluate the seedling resistance of 92 cultivars of spring soft wheat cultivated in the Volga region to stem rust and tan spot and to identify genes for resistance to stem rust – *Sr* genes and susceptibility to tan spot – *Tsn1*.

MATERIALS AND METHODS

The study analyzed 92 cultivars of spring soft wheat grown in the Volga region. To assess seedling resistance in laboratory conditions, the Chelyabinsk stem rust population of 2024 and the Chuvashia stem rust population of 2025; the Tambov tan spot population of 2024; and the Penza tan spot population of 2025 were used. The propagation of stem rust populations and the analysis of plant resistance at the seedling stage were carried out according to standard laboratory methods (Jin et al., 2007). To infect wheat seedlings with the stem rust pathogen, a suspension of urediniospores of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* was used (the suspension concentration was 1 mg of fungal urediniospores per 1 ml of water with Tween 80). The reaction of seedlings to inoculation with a suspension of spores of the stem rust pathogen was carried out on the 12th day according to the standard 4-point scale of E.C. Stakman and M.N. Levine (1962).

To assess the resistance of wheat cultivars to the tan spot pathogen, excised leaves of 10-day-old seedlings were placed in a cuvette on filter paper soaked in benzimidazole (40 mg/l) and inoculated with a suspension of fungal conidia at a concentration of 5000 con/ml. Resistance was assessed on the 5th day after infection using a 5-point scale (Rees et al., 1987; Mikhailova et al., 2012), in which combinations of damage scores in the form of necrosis/chlorosis were interpreted as follows: R (0/0, 0/1, 1/0, 1/1) – resistant, MR (1/2, 2/2, 2/1) – moderately resistant, S (3/3, 3/4, 4/3, 4/4, 2/3, 3/2) – susceptible, HS (4/3, 4/4, 4/5, 5/4, 5/5) – highly susceptible.

Wheat plant DNA was isolated from 5-day-old seedlings using the CTAB method (Murray and Thompson, 1980). Specific primers were used to identify resistance and susceptibility genes.: Sr24#12– *Sr24* (Mago et al., 2005), Gb – *Sr25/Lr19* (Prins et al., 2001), Sr26#43 – *Sr26* (Mago et al.,2005); *wPt-7004-PCR - Sr28* (Rouse et. al. 2012), scm9 – *Sr31/Lr26* и *Sr1A1R*) (Weng et al., 2007); *Xwmc477*, *Xstm773-2 – Sr36* (Tsilo et al.,2008); *Xcmwg682- Sr38* (Helguera et al., 2003); csLV34 – *Sr57/Lr34* (Lagudah et al., 2006); *Xfcp623 - Tsn1* (Faris et al., 2010). Amplification was performed using a PCR mixture (BioMaster HS-Taq PCR (2×) Biolabmix). Electrophoresis of the кации проводили в 2% агарозных гелях и 8% полиакриламидных гелях. Для визуализации электрофореграмм использовали гель-документирующую систему GelDoc Go Bio-Rad (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фитопатологическая оценка на устойчивость

На первом этапе работы была проведена оценка ювенильной устойчивости 92 сортов яровой мягкой пшеницы к стеблевой ржавчине и желтой пятнистости на стадии проростков в лабораторных условиях (см. рис. 1, рис. 2).

Количество устойчивых к стеблевой ржавчине сортов (%)

Number of cultivars resistant to stem rust (%)

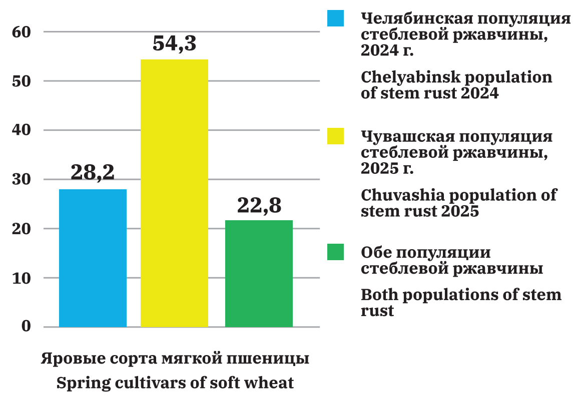


Рис. 1. Устойчивость яровых сортов мягкой пшеницы к стеблевой ржавчине

Fig. 1. Resistance of spring soft wheat cultivars to stem rust

В результате к челябинской популяции патогена были устойчивы 26 сортов (28,2%), а к чувашской популяции – 50 сортов (54,3%). К обеим популяциям стеблевой ржавчины был устойчив 21 сорт (22,8%). Устойчивость сортов яровой мягкой пшеницы к *Pyrenophora tritici-repentis* представлена на рис. 2.

К тамбовской популяции желтой пятнистости умеренно устойчивы 15,2%, устойчивы – 2,2% сортов, к пензенской популяции гриба умеренно устойчивы 34,7%, устойчивы – 47,8% сортов. К обеим популяциям желтой пятнистости умеренно устойчивы 11 сортов (11,9%), устойчивы два сорта – Экада 253 и Скирда, что составило 2,1% от общего количества сортов.

Сорта 100 лет ТАССР, Канюк, Экада 253 и Экада 258 были устойчивы ко всем четырем популяциям патогенов, то есть обладали групповой устойчивостью к стеблевой ржавчине и желтой пятнистости.

Идентификация генов устойчивости

В результате молекулярного скрининга 92 яровых сортов пшеницы в них идентифицированы гены устойчивости к стеблевой ржавчине: *Sr31, Sr24, Sr25, Sr28, Sr38, Sr57, Sr1A1R*, а также доминантный ген восприимчивости к желтой пятнистости *Tsn1*. Гены *Sr26* и *Sr36* в проанализированном материале обнаружены не были.

amplification products was performed in 2% agarose gels and 8% polyacrylamide gels. The GelDoc Go Bio-Rad gel documentation system (USA) was used to visualize the electropherograms).

RESULTS AND DISCUSSION

Phytopathological assessment for resistance.

At the first stage of the work, an assessment was made of the seedling resistance of 92 cultivars of spring soft wheat to stem rust and tan spot at the seedling stage under laboratory conditions (see Fig.1, Fig. 2).

Количество устойчивых к желтой пятнистости сортов (%)

Number of cultivars resistant to tan spot (%)

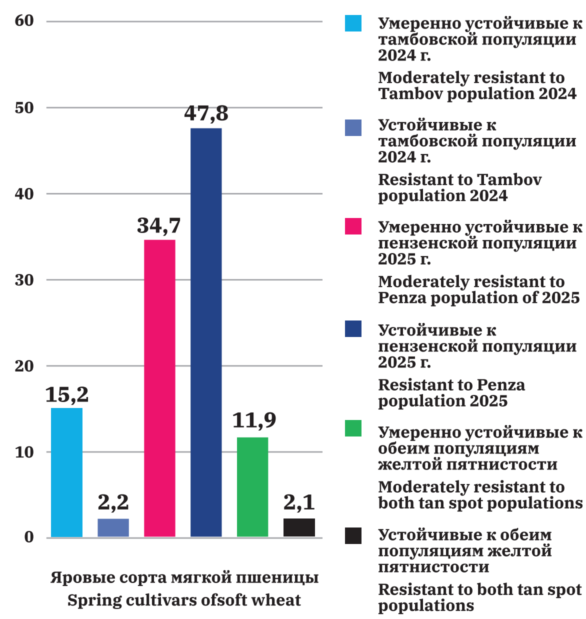


Рис. 2. Устойчивость яровых сортов мягкой пшеницы к желтой пятнистости

Fig. 2. Resistance of spring cultivars of soft wheat to tan spot

As a result, 26 cultivars (28.2%) were resistant to the Chelyabinsk population of the pathogen, and 50 cultivars (54.3%) were resistant to the Chuvashia population. Twenty-one cultivars (22.8%) were resistant to both stem rust populations. Resistance of spring soft wheat cultivars to *Pyrenophora tritici-repentis* is shown in Fig. 2.

15.2% of cultivars are moderately resistant to the Tambov population of tan spot, and 2.2% are resistant. 34.7% of cultivars are moderately resistant to the Penza population of the fungus, and 47.8% are resistant. Eleven cultivars (11.9%) are moderately resistant to both tan spot populations, and two cultivars – Ekada 253 and Skirda – are resistant, which accounts for 2.1% of the total number of cultivars.

The cultivars 100 years of TASSR, Kanyuk, Ekada 253 and Ekada 258 were resistant to all four pathogen populations, i.e. they had group resistance to stem rust and tan spot.

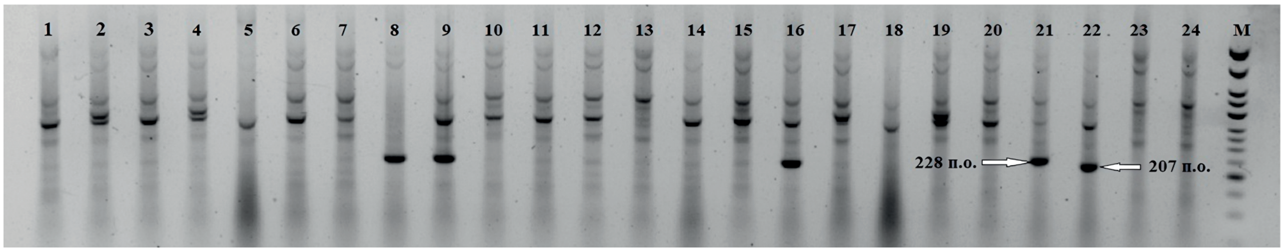


Рис. 3. Идентификация генов *Sr31* и *Sr1A1R* с использованием молекулярного маркера scm9: М – маркер молекулярного веса ДНК Step50 plus (Биолабмикс); стрелками указаны диагностический фрагмент 207 п.о., выявляющий Sr31 (№ 8 – Архат, № 9 – Балкыш, № 16 – Ершовская 36, № 22 – Квартет Л 375), и 228 п.о., выявляющий Sr1A1R (№ 21 – Канюк)

Fig. 3. Identification of the genes *Sr31* and *Sr1A1R* using the molecular marker scm9: M – DNA molecular weight marker Step50 plus (Biolabmix); arrows indicate the diagnostic fragment of 207 bp, detecting Sr31 (No. 8 – Arkhat, No. 9 Balkysh, No. 16 Ershovskaya 36, No. 22 Quartet L 375 and 228 bp, detecting Sr1A1R - No. 21 Kanyuk)

Ген устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr31* (локализован в ржаной транслокации 1RS.1BL) является эффективным к российским, в том числе и к поволжским популяциям стеблевой ржавчины, но не эффективным к расе Ug99 и ее биотипам. Маркер scm9 различает транслокации 1RS.1BL и 1RS.1AL – диагностический фрагмент 207 п.о. указывает на наличие 1BL.1RS-транслокации, а 228 п.о. – на транслокацию 1AL.1RS (Weng et al., 2007). По результатам ПЦР-анализа ген *Sr31* был идентифицирован в 15 сортах: 100 лет ТАССР, Архат, Балкыш, Ершовская 36, Квартет Л 375, Курьер, Прохоровка, Чистопольская, Экада 253, Экада 258, Экада 265, Юго-Восточная 2, Юго-Восточная 4, Квартет, Кинер. Все они были высокоустойчивы к обеим популяциям стеблевой ржавчины. В сорте Канюк был идентифицирован ген *Sr1A1R,* локализованный в транслокации 1RS.1AL (см. рис. 3). Это эффективный ген против стеблевой ржавчины, сорт Канюк был высокоустойчив к обеим популяциям гриба.

Кроме того, в сортах Канюк и Экада 265 был идентифицирован ген *Sr24*. Данный ген сцеплен с эффективным геном устойчивости к бурой ржавчине *Lr24*, что делает его перспективным для селекции. Это редкий ген для отечественных сортов пшеницы, хотя он распространен в зарубежных сортах. В анализируемом материале с использованием маркера Ventriup-LN2 у четырех сортов – Флоренс, Экада 66, Эстер и Каликсо – был идентифицирован ген *Sr38*. Это неэффективный ген, однако он может повысить устойчивость к патогену в сочетании с другими генами устойчивости (Rauf *et al*., 2022).

Из генов, эффективных против расы возбудителя стеблевой ржавчины Ug99, в анализируемом материале были идентифицированы гены *Sr25, Sr28* и *Sr57.* Для идентификации гена возрастной устойчивости *Sr57* (*Lr34*) был использован молекулярный маркер csLV34. Результаты скрининга показали наличие гена *Sr57* в семи анализируемых сортах: Жигулевская, Казанская Юбилейная, Чистопольская, Екатерина, Хаят, Экада 253, Экада 282. Для идентификации гена *Sr25* использовали STS-маркер Gb. Во всех зонах распространения расы Ug99 ген *Sr25* эффективен, но он контролирует высокий уровень устойчивости к стеблевой ржавчине только на определенном генетическом фоне, особенно в присутствии возрастного гена *Sr2.* В России ген *Sr25* потерял эффективность на территории Поволжья (Баранова и др., 2021), но

Identification of resistance genes

As a result of molecular screening of 92 spring wheat cultivars, genes for resistance to stem rust were identified in them: *Sr31, Sr24, Sr25, Sr28, Sr38, Sr57, Sr1A1R*, as well as the dominant gene for susceptibility to tan spot *Tsn1.* The *Sr26* and *Sr36* genes were not detected in the analyzed material.

The stem rust resistance gene *Sr31* (located in the rye translocation 1RS.1BL) is effective against Russian, including Volga region, stem rust populations, but is ineffective against the Ug99 race and its biotypes. The scm9 marker differentiates between the 1RS.1BL and 1RS.1AL translocations: a 207-bp diagnostic fragment indicates the presence of the 1BL.1RS translocation, while a 228-bp fragment indicates the 1AL.1RS translocation (Weng et al., 2007). Based on the PCR analysis results, the *Sr31* gene was identified in 15 cultivars: 100 years of TASSR, Arkhat, Balkysh, Ershovskaya 36, Kvartet L 375, Kurier, Prokhorovka, Chistopolskaya, Ekada 253, Ekada 258, Ekada 265, Yugo-Vostochnaya 2, Yugo-Vostochnaya 4, Kvartet, and Kiner. All of them were highly resistant to both stem rust populations. The *Sr1A1R* gene, localized in the 1RS.1AL translocation (see Fig. 3), was identified in the Kanyuk cultivar. This is an effective gene against stem rust; the Kanyuk cultivar was highly resistant to both populations of the fungus.

Besides, the *Sr24* gene was identified in the same Kanyuk and the Ekada 265 cultivars. This gene is linked to the effective leaf rust resistance gene *Lr24*, making it promising for breeding. This gene is rare among Russian wheat cultivars, although it is common in foreign cultivars. In the analyzed material, using the VENTRIUP-LN2 marker, the *Sr38* gene was identified in four cultivars: Florence, Ekada 66, Ester, and Calixo. This gene is ineffective; however, it can increase resistance to the pathogen when combined with other resistance genes (Rauf *et al.*, 2022).

Of the genes effective against the Ug99 race of the stem rust pathogen, the *Sr25*, *Sr28*, and *Sr57* genes were identified in the analyzed material. The molecular marker csLV34 was used to identify the age-related resistance gene *Sr57* (*Lr34*). Screening остается эффективным в Западной Сибири и Краснодарском крае. Ген *Sr25* идентифицирован в 18 сортах (19,5%). Также в проанализированном материале с использованием маркера wPt-7004-PCR идентифицирован ген *Sr28*, эффективный против расы Ug99 и ее биотипов. Ген *Sr28* был обнаружен в двух сортах – Сакара и Чистопольская (2,1%). Количество сортов с идентифицированными *Sr*-генами представлено на рис. 4.

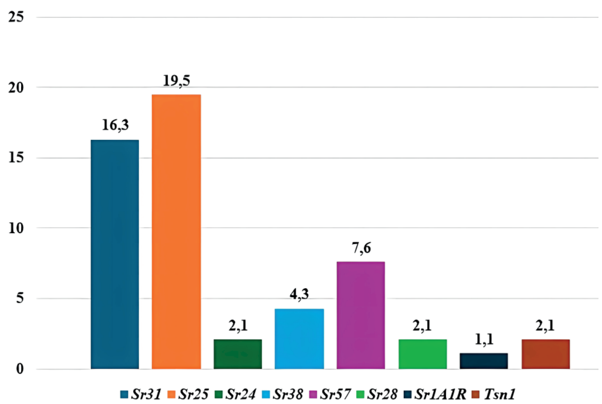


Рис. 4. Количество яровых сортов пшеницы с идентифицированными генами устойчивости (%)

Fig. 4. Number of spring wheat cultivars with identified resistance genes (%)

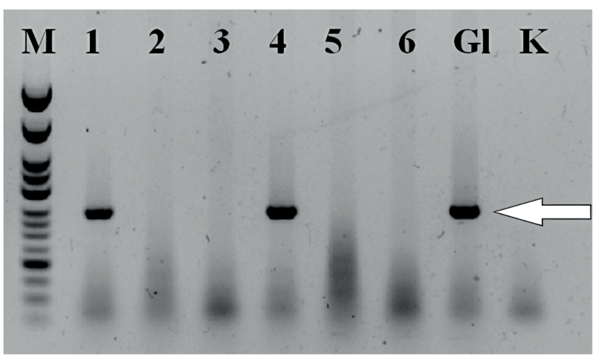


Рис. 5. Идентификация доминантной аллели гена восприимчивости *Tsn1* с использованием молекулярного маркера Xfcp623: M – маркер молекулярного веса ДНК Step50 plus (Биолабмикс); стрелкой указан диагностический фрагмент 380 п.о. № 1–6 – яровые сорта пшеницы, № 1 – 100 лет ТАССР, № 4 – Аль Варис, Gl – сорт Glenlea (позитивный контроль), К – вода (негативный контроль)

Fig. 5. Identification of the dominant *Tsn1* allele of the susceptibility gene using the Xfcp623 molecular marker: M is the Step50 plus DNA molecular weight marker (Biolabmix); the arrow indicates the 380 bp diagnostic fragment. No. 1-6 are spring wheat cultivars, No. 1 is 100 years of the TASSR, No. 4 is Al Waris, Gl is the Glenlea cultivar (positive control), K is water (negative control)

Как видно на рис. 4, наибольшее количество сортов с идентифицированными генами устойчивости к стеблевой ржавчине – носители генов *Sr25* (19,5%) и *Sr31* (16,3%), что следовало ожидать, так как эти гены, особенно *Sr25,* распространены в яровых российских сортах пшеницы.

Выделены сорта с сочетанием генов устойчивости к стеблевой ржавчине: Архат (*Sr31+Sr25*), Квартет Л 375 (*Sr31+Sr25*); Канюк (*Sr24+Sr1A1R*), Чистопольская (*Sr31+ Sr28+ Sr57*), Экада 253 (*Sr31+ Sr57*), Экада 265 (*Sr31+Sr24*).

results revealed the presence of the *Sr57* gene in seven analyzed cultivars: Zhigulevskaya, Kazanskaya Yubileynaya, Chistopolskaya, Ekaterina, Hayat, Ekada 253, and Ekada 282. The STS marker Gb was used to identify the *Sr25* gene. The *Sr25* gene is effective in all zones of distribution of the Ug99 race, but it controls a high level of resistance to stem rust only in a specific genetic background, especially in the presence of the age-related gene *Sr2*. In Russia, the *Sr25* gene has lost its effectiveness in the Volga region (Baranova et al., 2021), but remains effective in Western Siberia and Krasnodar Krai. The *Sr25* gene was identified in 18 cultivars (19.5%). The *Sr28* gene, effective against the Ug99 race and its biotypes, was also identified in the analyzed material using the wPt-7004-PCR marker. The *Sr28* gene was detected in two cultivars—Sakara and Chistopolskaya (2.1%). The number of cultivars with identified *Sr* genes is shown in Fig. 4.

As can be seen from Fig. 4, the largest number of cultivars with identified genes for resistance to stem rust are carriers of the *Sr25* (19.5%) and *Sr31* (16.3%) genes, which was expected, since these genes, especially *Sr25*, are common in Russian spring wheat cultivars.

Cultivars with a combination of genes for resistance to stem rust have been identified: Arhat (*Sr31+Sr25*), Quartet L 375 (*Sr31+Sr25*); Kanyuk (*Sr24+Sr1A1R*), Chistopolskaya (*Sr31+ Sr28+ Sr57*), Ekada 253 (*Sr31+Sr57*), Ekada 265 (*Sr31+Sr24*).

Also, in the cultivars 100 years of TASSR and Al Varis, a dominant *Tsn1* allele for susceptibility to tan spot was identified (see Fig. 5).

The absence of a diagnostic fragment of the dominant *Tsn1* allele indicated the presence of a null recessive *tsn1* allele controlling resistance. However, no correlation was found between the detection of the dominant *Tsn1* allele in cultivars and susceptibility to tan spot, which is consistent with our previous findings on landraces and modern common wheat cultivars (Mironenko et al., 2023, 2024).

CONCLUSION

Thus, laboratory evaluation showed that 21 cultivars (22.8%) were resistant to stem rust, 11 cultivars (11.9%) were moderately resistant to tan spot, and 2 cultivars (2.1%) were resistant. Identification of stem rust resistance genes using molecular markers revealed the presence of *Sr* genes in spring cultivars of common wheat: *Sr31, Sr24, Sr25, Sr28, Sr38, Sr57* and *Sr1A1R*. Combinations of genes for resistance to stem rust have been identified in cultivars: Arhat (*Sr31+Sr25*), Quartet L 375 (*Sr31+Sr25*); Kanyuk (*Sr24+Sr1A1R*), Chistopolskaya (*Sr31+ Sr28+ Sr57*), Ekada 253 (*Sr31+ Sr57*) and Ekada 265 (*Sr31+Sr24*).

Promising cultivars with group resistance to stem rust and tan spot have been identified: 100 years of the TASSR (*Sr31, Tsn1*), Kanyuk (*Sr24+Sr1A1R, tsn1*), Ekada 253 (*Sr31, tsn1*) and Ekada 258 (*Sr31, tsn1*).

Также в сортах 100 лет ТАССР и Аль Варис была идентифицирована доминантная аллель гена восприимчивости к желтой пятнистости *Tsn1* (см. рис. 5).

Отсутствие диагностического фрагмента доминантной аллели *Tsn1* означало наличие нулевой рецессивной аллели *tsn1,* контролирующей устойчивость. Однако корреляции между детекцией доминантной аллели *Tsn1* в сортах и восприимчивостью к желтой пятнистости не было обнаружено, что согласуется с выводами, сделанными нами ранее на материале стародавних и современных сортов мягкой пшеницы (Мироненко и др., 2023, 2024).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, оценка в лабораторных условиях показала, что к стеблевой ржавчине был устойчив 21 сорт (22,8%), к желтой пятнистости умеренно устойчивы 11 сортов (11,9%), устойчивы – два (2,1%). Идентификация генов устойчивости к стеблевой ржавчине с использованием молекулярных маркеров выявила наличие в яровых сортах мягкой пшеницы *Sr*-генов: *Sr31, Sr24, Sr25, Sr28, Sr38, Sr57* и *Sr1A1R*. Выявлены сочетания генов устойчивости к стеблевой ржавчине в сортах: Архат (*Sr31+Sr25*), Квартет Л 375 (*Sr31+Sr25*); Канюк (*Sr24+Sr1A1R*), Чистопольская (*Sr31+ Sr28+ Sr57*), Экада 253 (*Sr31+ Sr57*) и Экада 265 (*Sr31+ Sr24*).

Выделены перспективные сорта с групповой устойчивостью к стеблевой ржавчине и желтой пятнистости: 100 лет ТАССР (*Sr31, Tsn1*), Канюк (*Sr24+Sr1A1R, tsn1*), Экада 253 (*Sr31, tsn1*) и Экада 258 (*Sr31, tsn1*).

БЛАГОДАРНОСТЬ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 25-16-00287 https://ias.rscf.ru/ext/shot/10457251

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранова О.А., Сибикеев С.Н., Дружин А.Е., Созина И.Д. Потеря эффективности генов устойчивости к стеблевой ржавчине Sr25 и Sr6Agi на территории Нижнего Поволжья // Вестник защиты растений. 2021. Т. 104, № 2. С. 105–112. DOI: 10.31993/2308-6459-2021-104-2-14994.

2. Василова Н.З., Асхадуллин Д.Ф. Эпифитотия стеблевой ржавчины на яровой пшенице в Татарстане // Защита и карантин растений. 2017. № 2. С. 27–28.

3. Конькова Э.А., Лящева С.В. Желтая пятнистость листьев озимой мягкой пшеницы в Саратовской области // Зерновое хозяйство России. 2020. № 3 (69). С. 67–71.

4. Маркелова Т.С., Иванова О.В. Устойчивость образцов яровой и озимой пшеницы к желтой пятнистости листьев в условиях нижнего Поволжья // Сельскохозяйственная биология. 2012. Т. 47. № 3. С. 118–121.

5. Мироненко Н.В., Коваленко Н.М., Баранова О.А., Митрофанова О.П. Устойчивость стародавней озимой мягкой пшеницы к желтой пятнистости // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2023. Т. 184. № 4. С. 1–10. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-4-1-10.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 25-16-00287 https://ias.rscf.ru/ext/shot/10457251

REFERENCES

1. Baranova O. A., Sibikeev S. N., Druzhin A. E., Sozina I. D. Loss of effectiveness of stem rust resistance genes Sr25 and Sr6Agi in the Lower Volga region // Plant Protection News 104(2):105-112. DOI: 10.31993/2308-6459-2021-104-2-14994. (In Russ.)

2. Vasilova N. Z., Askhadullin D. F. Epiphytoty of stem rust on spring wheat in Tatarstan [Epifitotiya steblevoy rzhavchiny na yarovoy pshenitse v Tatarstane] // Plant Protection and Quarantine. 2017; 2: 27–28. (In Russ.)

3. Konkova E. A., Lyashcheva S. V. Yellow spot of leaves of winter soft wheat in Saratov Oblast [Zheltaya pyatnistost listyev ozimoy myagkoy pshenitsy v Saratovskoy oblasti] // Grain economy of Russia. 2020; 3 (69): 67–71. (In Russ.)

4. Markelova T. S., Ivanova O. V. Resistance of spring and winter wheat samples to tan leaf spot in the lower Volga region [Ustoychivost obraztsov yarovoy i ozimoy pshenitsy k zheltoy pyatnistosti listyev v usloviyakh nizhnego Povolzhya] // Agricultural Biology. 2012; 47 (3): 118–121. (In Russ.)

5. Mironenko N.V., Kovalenko N.M., Baranova O.A., Mitrofanova O.P. Resistance of old winter bread wheat landraces to tan spot [Ustoychivost starodavney ozimoy myagkoy pshenitsy k zheltoy pyatnistosti] // Proceedings on applied botany, genetics and breeding. 2023;184(4):205-214. (In Russ.) DOI: 10.30901/2227-8834-2023-4-1-10. (In Russ.)

6. Mironenko N.V., Kovalenko N.M., Baranova O.A., Khakimova A.G., Mitrofanova O.P. Seedling resistance of winter and spring bread wheat cultivars to *Pyrenophora tritici-repentis*. [Yuvenilnaya ustoychivost ozimykh i yarovykh sortov myagkoy pshenitsy k Pyrenophora tritici-repentis] // Proceedings on applied botany, genetics and breeding. 2024;185(2):95-105. (In Russ.) DOI:10.30901/2227-8834-2024-2-95-105.

7. Mikhailova L. A., Mironenko N. V., Kovalenko N. M. Tan spot of wheat. Guidelines for studying populations of the tan spot pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* and cultivar resistance [Zheltaya pyatnistost pshenitsy. Metodicheskiye ukazaniya po izucheniyu populyatsiy vozbuditelya zheltoy pyatnistosti Pyrenophora tritici-repentis i ustoychivosti sortov]. St. Petersburg, 2012. (In Russ.)

8. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens / Faris J. D., Zhang Z., Lu H., Lu S. et al. // Proc Natl Acad Sci. 2010. Vol. 107. P. 13544–13549. DOI:10.1073/pnas.1004090107.

6. Мироненко Н.В., Коваленко Н.М., Баранова О.А., Хакимова А.Г., Митрофанова О.П. Ювенильная устойчивость озимых и яровых сортов мягкой пшеницы к Pyrenophora tritici-repentis // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2024. Т. 185, № 2. С. 95–105. DOI:10.30901/2227-8834-2024-2-95-105.

7. Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Желтая пятнистость пшеницы. Методические указания по изучению популяций возбудителя желтой пятнистости Pyrenophora tritici-repentis и устойчивости сортов. Санкт-Петербург, 2012.

8. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens / Faris J. D., Zhang Z., Lu H., Lu S. et al. // Proc Natl Acad Sci. 2010. Vol. 107. P. 13544–13549. DOI:10.1073/pnas.1004090107.

9. PCR assays for the Lr37-Yr17-Sr38 cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines / Helguera M., Khan I. A., Kolmer J., Lijavetzky D., Zhong-qi L., Dubcovsky J. // Crop Science. 2003. Vol. 43. P. 1839–1847.

10. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic Sr gene lines to race TTKS of Puccinia graminis f. sp. tritici / Jin Y., Singh R. P., Ward R. W., Wanyera R., Kinyua M., Njau P., Fetch T., Pretorius Z. A., Yahyaoui A. // Plant Disease. 2007. Vol. 91. P. 1096–1099.

11. Lagudah E. S., McFadden H., Singh R. P. et al. Molecular genetic characterization of the Lr34/Yr18 slow rusting resistance gene region in wheat // Theor. Appl. Genet. 2006. Vol. 114. P. 21–30.

12. Mago R., Bariana H. S., Dundas I. S. at al. Development of PCR markers for the selection on wheat stem rust resistance genes Sr24 and Sr26 in diverse wheat germplasm // Theor. Appl. Genet. 2005. Vol. 111. P. 496–504. DOI: 10.1007/s00122-005-2039-z.

13. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Res. 1980. Vol. 8. P. 4321–4325.

14. Wheat Stem Rust Back in Europe: Diversity, Prevalence and Impact on Host Resistance / Patpour M., Hovmøller M. S., Rodriguez-Algaba J., Randazzo B., Villegas D., Shamanin V. P., Berlin A., Flath K., Czembor P., Hanzalova A., Slikova S., Skolotneva E. S., Jin Y., Szabo L., Meyer K. J. G., Valade R., Thach T., Hansen J. G., Justesen A. F. // Front. Plant Sci. 2022. Vol. 13. Art. 882440. DOI:10.3389/fpls.2022.882440.

15. AFLP and STS tagging of Lr19, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat / Prins R., Koebner R. M. D., Groenwald J. Z., Marias G. F. et al. // Theor Appl Genet. 2001. Vol. 103. P. 618–624.

16. Molecular Characterization of Genomic Regions for Adult Plant Resistance to Stem Rust in a Spring Wheat Mapping Population / Rauf Y., Bajgain P., Rouse M. N., Khanzada K. A., Bhavani S., Huerta-Espino J., Singh R. P., Imtiaz M., Anderson J. A. // Plant Disease. 2022, Feb;106(2):439-450. DOI:10.1094/PDIS-03-21-0672-RE.

17. Rees R., Platz G., Mayer R. Yield losses in wheat from yellow spot: comparison of estimates derived from single tillers and plots // Australian Journal of Agricultural Research. 1982. Vol. 33, № 6. P. 899–908. DOI: 10.1071/AR9820899.

18. Rees R. G., Platz G. J., Mayer R. J. Susceptibility

9. PCR assays for the Lr37-Yr17-Sr38 cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines / Helguera M., Khan I. A., Kolmer J., Lijavetzky D., Zhong-qi L., Dubcovsky J. // Crop Science. 2003. Vol. 43. P. 1839-1847.

10. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic Sr gene lines to race TTKS of Puccinia graminis f. sp. tritici / Jin Y., Singh R. P., Ward R. W., Wanyera R., Kinyua M., Njau P., Fetch T., Pretorius Z. A., Yahyaoui A. // Plant Disease. 2007. Vol. 91. P. 1096-1099.

11. Lagudah E. S., McFadden H., Singh R. P. et al. Molecular genetic characterization of the Lr34/Yr18 slow rusting resistance gene region in wheat // Theor. Appl. Genet. 2006. Vol. 114. P. 21–30.

12. Mago R., Bariana H. S., Dundas I. S. at al. Development of PCR markers for the selection on wheat stem rust resistance genes Sr24 and Sr26 in diverse wheat germplasm // Theor. Appl. Genet. 2005. Vol. 111. P. 496-504. DOI: 10.1007/s00122-005-2039-z.

13. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Res. 1980. Vol. 8. P. 4321-4325.

14. Wheat Stem Rust Back in Europe: Diversity, Prevalence and Impact on Host Resistance / Patpour M., Hovmøller M. S., Rodriguez-Algaba J., Randazzo B., Villegas D., Shamanin V. P., Berlin A., Flath K., Czembor P., Hanzalova A., Slikova S., Skolotneva E. S., Jin Y., Szabo L., Meyer K. J. G., Valade R., Thach T., Hansen J. G., Justesen A. F. // Front. Plant Sci. 2022. Vol. 13. Art. 882440. DOI:10.3389/fpls.2022.882440.

15. AFLP and STS tagging of Lr19, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat / Prins R., Koebner R. M. D., Groenwald J. Z., Marias G. F. et al. // Theor Appl Genet. 2001. Vol. 103. P. 618–624.

16. Molecular Characterization of Genomic Regions for Adult Plant Resistance to Stem Rust in a Spring Wheat Mapping Population / Rauf Y., Bajgain P., Rouse M. N., Khanzada K. A., Bhavani S., Huerta-Espino J., Singh R. P., Imtiaz M., Anderson J. A. // Plant Disease. 2022, Feb;106(2):439-450. DOI:10.1094/PDIS-03-21-0672-RE.

17. Rees R., Platz G., Mayer R. Yield losses in wheat from yellow spot: comparison of estimates derived from single tillers and plots // Australian Journal of Agricultural Research. 1982. Vol. 33, № 6. P. 899-908. DOI: 10.1071/AR9820899.

18. Rees R. G., Platz G. J., Mayer R. J. Susceptibility of Australian wheats to Pyrenophora tritici-repentis // Australian Journal of Agricultural Research. 1987. Vol. 39. P. 141-151.

19. Identification of markers linked to the race Ug99 effective stem rust resistance gene Sr28 in wheat (Triticum aestivum L.) / Rouse M. N., Nava I. C., Chao S., Anderson J. A., Jin Y. // Theoretical and Applied Genetics. 2012. Vol. 125. P. 877-885. DOI:10.1007/s00122-012-1879-6.

of Australian wheats to Pyrenophora tritici-repentis // Australian Journal of Agricultural Research. 1987. Vol. 39. P. 141–151.

19. Identification of markers linked to the race Ug99 effective stem rust resistance gene Sr28 in wheat (Triticum aestivum L.) / Rouse M. N., Nava I. C., Chao S., Anderson J. A., Jin Y. // Theoretical and Applied Genetics. 2012. Vol. 125. P. 877–885. DOI:10.1007/s00122-012-1879-6.

20. Stakman E. C., Stewart D. M., Loegering W. Q. Identification of physiologic races of Puccinia graminis var. tritici // United States Department of Agriculture–Agricultural Research Service. 1962. E-617 (rev).

21. Tsilo T. J., Jin Y., Anderson J. A. Diagnostic microsatellite markers for detection of stem rust resistance gene Sr36 in diverse genetic backgrounds of wheat // Crop Sci. 2008. Vol. 48. P. 253–261. DOI: 10.2135/cropsci2007.04.0204.

22. PCR-based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations in wheat background / Weng Y., Azhaguvel P., Devkota R. N., Rudd J. C // Plant Breeding. 2007. Vol. 126. P. 482–486. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01331.x.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Баранова Ольга Александровна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ВИЗР, г. Пушкин, г. Санкт-Петербург, Россия; baranova_oa@mail.ru,
https://orcid.org/0000-0001-9439-2102

Расторгуева Таисия Руслановна, студентка 2-го курса магистратуры биологического факультета СПбГУ, г. Санкт-Петербург, Россия; лаборант-исследователь ВИЗР, г. Пушкин, г. Санкт-Петербург, Россия;
rastorguevataya@gmail.com

Коваленко Надежда Михайловна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ВИЗР, г. Пушкин, г. Санкт-Петербург, Россия;
nadyakov@mail.ru,
http://orcid.org/0000-0001-9577-8816

Мироненко Нина Васильевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ВИЗР, г. Пушкин, г. Санкт-Петербург, Россия;
nina2601mir@mail.ru,
http://orcid.org/0000-0003-3383-2973

20. Stakman E. C., Stewart D. M., Loegering W. Q. Identification of physiologic races of Puccinia graminis var. tritici // United States Department of Agriculture–Agricultural Research Service. 1962. E-617 (rev).

21. Tsilo T. J., Jin Y., Anderson J. A. Diagnostic microsatellite markers for detection of stem rust resistance gene Sr36 in diverse genetic backgrounds of wheat // Crop Sci. 2008. Vol. 48. P. 253-261. DOI: 10.2135/cropsci2007.04.0204.

22. PCR-based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat–rye translocations in wheat background / Weng Y., Azhaguvel P., Devkota R. N., Rudd J. C // Plant Breeding. 2007. Vol. 126. P. 482-486. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2007.01331.x.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Olga Baranova, PhD in Biology, Leading Researcher, All-Russian Research Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg;
baranova_oa@mail.ru,
https://orcid.org/0000-0001-9439-2102

Taisia Rastorgueva, 2nd-year Master's student, Faculty of Biology, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia; laboratory assistant – researcher, All-Russian Research Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg;
rastorguevataya@gmail.com

Nadezhda Kovalenko, PhD in Biology, Leading Researcher, All-Russian Research Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg;
nadyakov@mail.ru,
http://orcid.org/0000-0001-9577-8816

Nina Mironenko, Advanced Doctor of Biology, Leading Researcher, All-Russian Research Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg;
nina2601mir@mail.ru,
http://orcid.org/0000-0003-3383-2973

DOI 10.69536/FKR.2025.30.49.003
УДК 578:579.64:632.3.01/.08

Вироид рубцеватости плодов яблони – фитопатоген плодовых культур

* Башкирова И.Г.[1], Приходько Ю.Н.[2], Шнейдер Ю.А.[3], Лозовая Е.Н.[4], Живаева Т.С.[5], Селявкин С.Н.[6]
[1] ORCID: 0000-0001-9014-4179, *e-mail: bashkirovaid@mail.ru*
[2] ORCID: 0009-0004-9176-407X, *e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru*
[3] ORCID: 0000-0002-7565-1241, *e-mail: yury.shneyder@mail.ru*
[4] ORCID: 0000-0001-8612-5127, *e-mail: evgeniyaf@mail.ru*
[5] ORCID: 0009-0008-8312-2666, *e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru*
[6] ORCID: 0000-0001-7647-5799, *e-mail: selyavkin91@mail.ru*
[1, 2, 3, 4, 5] ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150
[3]ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева» (ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева), г. Москва, Россия, 127434
[6] Воронежский филиал ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (Воронежский филиал ФГБУ «ВНИИКР»), г. Воронеж, Воронежская обл., Россия, 394042

АННОТАЦИЯ

Вироид рубцеватости плодов яблони (*Apscaviroid cicatricimali*, Apple scar skin viroid, ASSVd) является одним из особо опасных фитопатогенов, поражающих семечковые и косточковые плодовые культуры. Вироидная инфекция представляет потенциальную опасность, которая может нанести экономический ущерб производству плодовых культур. Наиболее распространенным способом передачи ASSVd является контактная передача (механически через рабочие инструменты), а также через прививку (от зараженного растения к здоровому). В статье приведена краткая обзорная информация по вироиду, а также показаны данные по апробации олигонуклеотидов для диагностики ASSVd методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием отечественных реактивов.

Проверку работы олигонуклеотидов осуществляли с помощью отечественных наборов реагентов компании ООО «НПФ Синтол» и ЗАО «Евроген». Для проведения экспериментов по оценке специфичности праймеров использовали различные изоляты близкородственных вироидов из семейств Avsunviroidae и Pospiviroidae. В данной работе проведен анализ олигонуклеотидов с использованием онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST. В исследовании проведено множественное выравнивание нуклеотидных

DOI 10.69536/FKR.2025.30.49.003
UDC 578:579.64:632.3.01/.08

Apple scar skin viroid – fruit crops phytopathogen

* Ida G. Bashkirova[1], Yuri N. Prikhodko[2], Yuri A. Shneyder[3], Evgenia N. Lozovaya[4], Tatiana S. Zhivaeva[5], Sergey N. Selyavkin[6]
[1] ORCID: 0000-0001-9014-4179, *e-mail: bashkirovaid@mail.ru*
[2] ORCID: 0009-0004-9176-407X, *e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru*
[3] ORCID: 0000-0002-7565-1241, *e-mail: yury.shneyder@mail.ru*
[4] ORCID: 0000-0001-8612-5127, *e-mail: evgeniyaf@mail.ru*
[5] ORCID: 0009-0008-8312-2666, *e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru*
[6] ORCID: 0000-0001-7647-5799, *e-mail: selyavkin91@mail.ru*
[1, 2, 3, 4, 5] All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU «VNIIKR»), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150
[3] Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia, 127434
[6] Voronezh Branch of FGBU "VNIIKR", Voronezh, Voronezh Oblast, Russia, 394042

ABSTRACT

Apple scar skin viroid, ASSVd (*Apscaviroid cicatricimali*) is a particularly dangerous phytopathogen affecting pome and stone fruit crops. Viroid infection poses a potential threat that can cause economic damage to fruit production. The most common pathways of ASSVd are contact (mechanically through tools) and grafting (from an infected plant to a healthy one). This article provides a brief overview of the viroid and presents data on the validation of oligonucleotides for ASSVd diagnostics with real-time PCR using Russian reagents.

Oligonucleotide performance was tested using Russian Syntol and Evrogen reagent kit. Various isolates of closely related viroids from the Avsunviroidae and Pospiviroidae families were used to conduct experiments assessing primer specificity. In this study, oligonucleotide analysis was performed using the NCBI Primer-BLAST online service. Multiple nucleotide sequence alignments of apple fruit scarring viroid isolates were performed using последовательностей изолятов вироида рубцеватости плодов яблони с помощью специальных программ MAFFT и AliView. Биоинформатически проанализированы видоспецифичные олигонуклеотиды на возможность образования вторичных структур – шпилек и димеров, которые могут повлиять на диагностику фитопатогена. Установлено, что праймеры cASSVd/hASSVd и ASS-F/ASS-R способны образовывать большое количество вторичных структур, которые могут привести к ложноположительному результату. С помощью праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291, ASS-F/ASS-R и зонда ASS-P возможно идентифицировать вироид рубцеватости плодов яблони методом ПЦР-РВ.

Ключевые слова. Apscaviroid cicatricimali, ASSVd, семечковые культуры, косточковые культуры, карантин растений.

specialized MAFFT and AliView software. Species-specific oligonucleotides were bioinformatically analyzed for the formation of secondary structures—hairpins and dimers—that may affect the diagnosis of the phytopathogen. It was found that the cASSVd/hASSVd and ASS-F/ASS-R primers are capable of forming a large number of secondary structures, which can lead to false-positive results. Using the primers ASSVd-F91/ASSVd-R291, ASS-F/ASS-R and the probe ASS-P, it is possible to identify the apple fruit scarring viroid using the real-time PCR method.

Key words. *Apscaviroid cicatricimali*, ASSVd, pome crops, stone fruit crops, plant quarantine.

ВВЕДЕНИЕ

Среди различных фитопатогенов плодовых культур особое положение занимают вироиды. Вироиды – это инфекционные патогены, состоящие из одноцепочечной кольцевой РНК, которые вызывают различные болезни растений, нанося огромный экономический ущерб. Поскольку эти патогены не кодируют белки, они используют белки растения-хозяина для выполнения всех своих основных функций, включая репликацию, транспортировку и патогенез. Вироиды передаются вегетативным размножением/прививкой и механической инокуляцией, например, через использование загрязненных лезвий во время обрезки и прививки (Diener, 2001; Walia et al., 2014; Приходько и др., 2021; Tian et al., 2022).

Для семечковых плодовых культур особое значение имеет вироид рубцеватости плодов яблони (*Apscaviroid cicatricimali*, Apple scar skin viroid, ASSVd), который является типовым видом рода *Apscaviroid* семейства Pospiviroidae (EPPO Global Database, 2025). Вироид вызывает болезни рубцеватости плодов (scar skin) яблони, пятнистости плодов яблони (dapple apple), ямчатости плодов груши (pear fruit dimple), ржавой кожицы плодов груши (pear rusty skin), морщинистости плодов груши (pear fruit crinkle) (Walia et al., 2012; Hadidi et al., 2017; Tian et al., 2022).

Первые сообщения о болезни рубцеватости плодов яблони появились в 1930-х гг. в Китае. Инфекция привела к серьезным потерям урожая в Китае в 1950-х гг., особенно в районе Ляодунского полуострова, где были поражены тысячи деревьев, а плоды яблони перестали продаваться из-за нетоварного внешнего вида. Болезнь повлияла на выращивание основного сорта яблони в Китае – Red Fuji. В некоторых провинциях Шаньси, Шэньси и Хэбэй более 50% деревьев были поражены этой болезнью (Liu et al., 1957; Hadidi et al., 2017). В 1953 г. в Китае болезнь была описана и получила название Manshu-sabika-byo (болезнь побурения плодов маньчжурской яблони), или Sabika (болезнь маньчжурской яблони), по

INTRODUCTION

Among the various phytopathogens of fruit crops, viroids occupy a special position. Viroids are infectious pathogens consisting of single-stranded circular RNA that cause various plant diseases, causing enormous economic losses. Since these pathogens do not encode proteins, they utilize host plant proteins to perform all their essential functions, including replication, transport, and pathogenesis. Viroids are transmitted by vegetative propagation/grafting and mechanical inoculation, for example, through the use of contaminated blades during pruning and grafting (Diener, 2001; Walia et al., 2014; Prikhodko et al., 2021; Tian et al., 2022).

Apple scar skin viroid is of particular importance for pome fruit crops (*Apscaviroid cicatricimali*, Apple scar skin viroid, ASSVd), which is the type species of the genus *Apscaviroid* of the family Pospiviroidae (EPPO Global Database, 2025). The viroid causes apple scar skin, dapple apple, pear fruit dimple, pear rusty skin, pear fruit crinkle (Walia et al., 2012; Hadidi et al., 2017; Tian et al., 2022).

The first reports of ASSVd appeared in China in the 1930s. The infection caused severe crop losses in China in the 1950s, particularly in the Liaodong Peninsula region, where thousands of trees were affected, and the apple fruit became unmarketable due to its unmarketable appearance. The disease impacted the cultivation of China's main apple variety, Red Fuji. In some provinces of Shanxi, Shaanxi, and Hebei, more than 50% of trees were affected by this disease (Liu et al., 1957; Hadidi et al., 2017). In 1953, the disease was described in China and named "Manshu-sabika-byo" (Manchurian apple browning disease) or "Sabika" (Manchurian apple disease), based on the results of experiments on viroid transmission through grafting (Ohtsuka, 1935;

результатам экспериментов по передаче вироида через прививку (Ohtsuka, 1935; Ohtsuka, 1938; Walia et al., 2014). Также в 1950-х гг. в яблоневом саду (штат Нью-Гэмпшир, США) была отмечена болезнь пятнистости плодов яблони, позже она наблюдалась в Великобритании, Китае и Японии (Lee et al., 2001; Hadidi et al., 2017).

Затем, в 1953 г., появились сообщения о болезни плодовых в префектуре Нагано (Япония), а в 1970-х гг. эта болезнь наблюдалась и в других основных районах выращивания яблонь в Японии (Hadidi et al., 2017). Симптомы болезни проявлялись лишь на плодах; на листьях и стволах деревьев симптомов заражения не было (Takahashi, 1987). В 1960–1962 гг. в Китае отмечалось, что около 90% деревьев груш были поражены болезнью (Liu et al., 1962).

Изначально считалось, что возбудителем болезней является вирус из-за его способности передаваться через трансплантант (Koganezawa, 1985). И только в 1980-х гг. была выдвинута гипотеза о вироидной этиологии данных болезней (Walia et al., 2012).

Предполагается, что первичный ареал ASSVd находится в Северо-Восточной Азии (Китай и Япония), где он наиболее широко распространен. А его ограниченное распространение в странах Европы и Америки является результатом первоначальной интродукции коммерческих сортов плодовых культур из вышеупомянутых азиатских стран (Kyriakopoulou, Hadidi, 1997). Груша миндалевидная на протяжении многих веков произрастает в горах Греции, и ранее ее семена широко использовались для получения семенных подвоев с целью последующей прививки культурных сортов груши и айвы. Присутствие ASSVd в растениях груши в горах, вдали от любого вмешательства человека, позволяет предположить, что вироид является родным для Греции. В связи с этим не исключена возможность, что Греция, расположенная в Средиземноморском регионе, является вторым центром происхождения вироида. Очевидно, инфицирование растений происходило с помощью зараженного материала через прививку (Kyriakopoulou, Hadidi, 1997; Kyriakopoulou et al., 2001). Позднее данный вироид был выявлен на культивируемых и дикорастущих растениях черешни в Греции (Kaponi et al., 2013).

Геном вироида рубцеватости плодов яблони был секвенирован в 1987 г. и представляет собой одноцепочечную кольцевую РНК, состоящую из 330 нуклеотидов (Hashimoto, Koganezawa, 1987).

Основным растением-хозяином для вироида является яблоня обыкновенная (*Malus domestica* (Suckow) Borkh). Помимо яблони, вироид инфицирует и другие растения из семейства Rosaceae: яблоня дикая (*M. sylvestris* (L.) Mill.), груша обыкновенная (*Pyrus communis* L.), груша миндалевидная (*P. amygdaliformis* Vill.), белая китайская груша (*P. bretschneideri* Rehder), груша грушелистная (*P. pyrifolia* (Burm.f.) Nak.), груша уссурийская (*P. ussuriensis* Maxim.), персик (*Prunus persica* (L.) Batsch), абрикос (*P. armeniaca* L.), черешня (*P. avium* L.), гималайская вишня (*P. cerasoides* D.Don) (Walia et al., 2012; Walia et al., 2014; Kaponi et al., 2024; CABI, 2025).

Ohtsuka, 1938; Walia et al., 2014). Also, in the 1950s, apple fruit spot disease was noted in an apple orchard (New Hampshire, USA), and later it was observed in the UK, China, and Japan (Lee et al., 2001; Hadidi et al., 2017).

Then, in 1953, reports of the disease appeared in Nagano Prefecture, Japan, and in the 1970s, the disease was observed in other major apple-growing areas of Japan (Hadidi et al., 2017). Symptoms of the disease appeared only on the fruits; there were no symptoms of infection on the leaves or trunks of the trees (Takahashi, 1987). In China, between 1960 and 1962, it was noted that about 90% of pear trees were affected by the disease (Liu et al., 1962).

Initially, it was believed that the causative agent of the diseases was a virus, due to its ability to be transmitted through a transplant (Koganezawa, 1985). It was only in the 1980s that the hypothesis of a viroid etiology of these diseases was put forward (Walia et al., 2012).

The primary distribution of ASSVd is believed to be in Northeast Asia (China and Japan), where it is most widespread. Its limited distribution in Europe and America is the result of the initial introduction of commercial fruit varieties from the aforementioned Asian countries (Kyriakopoulou and Hadidi, 1997). The almond-shaped pear has been grown in the mountains of Greece for centuries, and its seeds were previously widely used to produce seed rootstocks for subsequent grafting of cultivated pear and quince varieties. The presence of ASSVd in pear plants in the mountains, far from any human intervention, suggests that the viroid is native to Greece. Therefore, the possibility cannot be ruled out that Greece, located in the Mediterranean region, is a second center of origin for the viroid. Apparently, the plants were infected by grafting contaminated material (Kyriakopoulou and Hadidi, 1997; Kyriakopoulou et al., 2001). Later, this viroid was detected on cultivated and wild cherry plants in Greece (Kaponi et al., 2013).

The genome of ASSVd was sequenced in 1987 and is a single-stranded circular RNA consisting of 330 nucleotides (Hashimoto, Koganezawa, 1987).

The main host plant for ASSVd is the common apple tree (*Malus domestica* (Suckow) Borkh). Apart from apple trees, the viroid also infects other plants from the Rosaceae family: *M. sylvestris* (L.) Mill., *Pyrus communis* L., *P. amygdaliformis* Vill., *P. bretschneideri* Rehder, *P. pyrifolia* (Burm.f.) Nak., *P. ussuriensis* Maxim., *Prunus persica* (L.) Batsch, *P. armeniaca* L., *P. avium* L., *P.* cerasoides D.Don) (Walia et al., 2012; Walia et al., 2014; Kaponi et al., 2024; CABI, 2025).

ASSVd has been detected in various apple tissues: leaves, stems, peel, fruit pulp, rootstocks, and roots. However, symptoms of viroid infection appear only on the fruit, not on the leaves and stems. Stunting of plant growth is the primary symptom of most viroid diseases (Hashimoto, Koganezawa, 1987; Hurtt, Podleckis, 1995; Desvignes et al., 1999; Kim et al., 2010; Walia et al., 2014; Li et al., 2023).

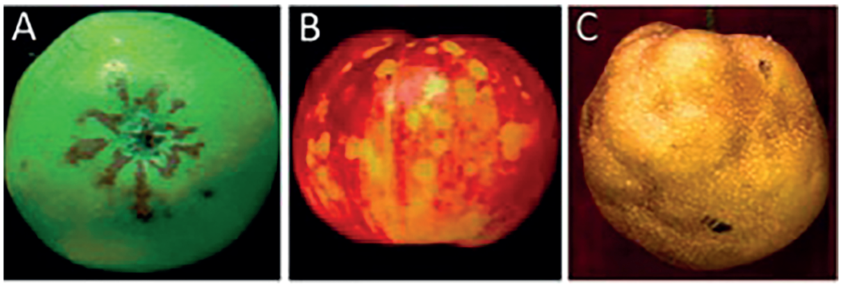


Рис. 1. Симптомы: A – коричневая рубцеватость на плодах яблони; B – бледные пятна на кожице плодов яблони; C – ямчатость на плодах груши (Di Serio et al., 2018)

Fig. 1. Symptoms: A) Brown scarring on apple fruit; B) Pale spots on apple fruit skin; C) Pear fruit crinkle (Di Serio et al., 2018)

ASSVd был обнаружен в различных тканях яблони: в листьях, стеблях, кожуре, мякоти плодов, подвоях и корнях. Однако симптомы заражения вироидом проявляются только на плодах, но не проявляются на листьях и стеблях. Задержка роста растений является основным симптомом большинства вироидных болезней (Hashimoto, Koganezawa, 1987; Hurtt, Podleckis, 1995; Desvignes et al., 1999; Kim et al., 2010; Walia et al., 2014; Li et al., 2023).

Например, во Франции (1995–1998 гг.) были проведены опыты по искусственному заражению ASSVd 42 коммерческих сортов яблони. По результатам чувствительности к вироиду выделено несколько групп основных сортов яблони: толерантные (Baujade, Belrène, Golden Delicious, Granny Smith, Jonagold, Pink Lady, Reine des Reinettes, Reinette Grise du Canada, Smoothee), слабовосприимчивые (Akane, Ambassy, Delbarestivale, Fuji и мутанты Fuji, Gala и мутанты Gala, Redwinter, Spurkoop), восприимчивые (Delbard Jubilé, Elstar и мутанты Elstar, Festival, Querina, Sunris), более восприимчивые (Ace, Charden, Early Red One, Red Chief, Red Delicious, Starkrimson), высоковосприимчивые (Belchard, Braeburn, Hillwell и мутанты Hillwell, Indo). На толерантных сортах лишь на отдельных плодах развивались неотчетливые пятна или слабое изменение окраски. На слабовосприимчивых и восприимчивых сортах у части плодов развивалась пятнистость слабой или умеренной интенсивности. На более восприимчивых сортах почти все плоды изменяли окраску или имели пятна, а у семенной чашечки развивались ржавые опробковевшие пятна. На высоковосприимчивых сортах развивались интенсивные симптомы рубцеватости, растрескивания и некротизации плодов, которые утрачивали товарные качества (Desvignes et al., 1999).

ASSVd в естественных условиях поражает исключительно древесные растения, в первую очередь семечковые и косточковые плодовые деревья. Однако вироид имеет широкий круг экспериментальных растений-хозяев: огурец (*Cucumis sativus* L.), томат (*Solanum lycopersicum* L.), баклажан (*S. melongena* L.), горох (*Pisum sativum* Lam.), фасоль (*Phaseolus vulgaris* L.), табак (*Nicotiana benthamiana* Domin, *N. tabacum* L., *N. glutinosa* L.), киноа (*Chenopodium quinoa* Willd.), марь (*C. amaranticolor* D. Don). Возможность заражения этих растений в природных условиях не изучалась (Walia et al., 2014; Walia et al., 2015; Lodh, 2017).

For example, in France (1995-1998), experiments were conducted on artificial infection of 42 commercial apple varieties with ASSVd. Based on the results of susceptibility to the viroid, several groups of main apple varieties were distinguished: tolerant (Baujade, Belrène, Golden Delicious, Granny Smith, Jonagold, Pink Lady, Reine des Reinettes, Reinette Grise du Canada, Smoothee), slightly susceptible (Akane, Ambassy, Delbarestivale, Fuji and Fuji mutants, Gala and Gala mutants, Redwinter, Spurkoop), susceptible (Delbard Jubilé, Elstar and Elstar mutants, Festival, Querina, Sunris), more susceptible (Ace, Charden, Early Red One, Red Chief, Red Delicious, Starkrimson), highly susceptible (Belchard, Braeburn, Hillwell and Hillwell mutants, Indo). On tolerant varieties, only a few fruits developed indistinct spots or mild discoloration. On slightly susceptible and susceptible varieties, some fruits developed mild to moderate spotting. On more susceptible varieties, almost all fruits showed discoloration or spots, and rusty, corky spots developed on the calyx. On highly susceptible varieties, severe scarring, cracking, and necrosis of the fruits developed, rendering them unmarketable (Desvignes et al., 1999).

ASSVd naturally infects exclusively woody plants, primarily pome and stone fruit trees. However, the viroid has a wide range of experimental host plants: Cucumis sativus L., Solanum lycopersicum L., S. melongena L., Pisum sativum Lam., Phaseolus vulgaris L., Nicotiana benthamiana Domin, N. tabacum L., N. glutinosa L., Chenopodium quinoa Willd., C. amaranticolor D.Don. The possibility of infection of these plants in natural conditions has not been studied (Walia et al., 2014; Walia et al., 2015; Lodh, 2017).

When infected with ASSVd, pale spots form on the skin of apple fruit (see Fig. 1-B). The surface of the

Рис. 2. Симптомы заражения ASSVd на незрелом яблоке из района Олимпия на Пелопоннесе, Греция (Kaponi et al., 2024)

Fig. 2. Symptoms of ASSVd infection on an unripe apple from the Olympia region of the Peloponnese, Greece (Kaponi et al., 2024)

Рис. 3. Коричневая рубцеватость на плодах яблони (Sipahioglu et al., 2009)

Fig. 3. Brown scar skin on apple fruit (Sipahioglu et al., 2009)

При заражении вироидом рубцеватости плодов яблони образуются бледные пятна на кожице плодов яблони (см. рис. 1, B). Поверхность пятен может покрываться красно-бурой или коричневой опробковевшей тканью, которая в виде полос или целых секторов распространяется по плоду (см. рис. 1, A, рис. 3). Пятна часто растрескиваются (см. рис. 2). Зараженные плоды часто остаются мелкими и жесткими, плохо вызревшими и имеют неприятный вкус. Симптомы заражения на плодах груши проявляются в виде ямчатости (морщинистости) кожицы (см. рис. 1, C). Симптомы на плодах яблони обычно не сопровождаются наличием каких-либо симптомов на листьях. Вироид может иметь длительный латентный период в своих растениях-хозяевах (Shamloul et al., 2004; Sipahioglu et al., 2009; Hadidi et al., 2017; Di Serio et al., 2018; Kaponi et al., 2024).

Apple scar skin viroid снижает товарный вид плодов яблони (уменьшение размера, образование рубцов, неравномерное окрашивание кожуры), что негативно сказывается на производстве фруктов (Diener, 1971; Li et al., 2023). Заражение вироидом может привести к значительным экономическим потерям и снижению урожайности.

В настоящее время ASSVd распространен в странах Азии (Индия, Иран, Китай, Республика Корея, Япония), Европы (Великобритания, Греция, Дания, Италия, Польша, Турция, Франция), Северной Америки (Канада, США), Южной Америки (Аргентина) (CABI/EPPO, 2025).

Вироид является одним из наиболее опасных возбудителей болезней плодовых культур в Китае и Японии, хотя в большинстве стран – производителей яблок фитопатоген встречается относительно редко (Hashimoto, Koganezawa, 1987; Desvignes et al., 1999). В основных регионах производства яблонь в Китае инфекционная нагрузка вироидом колеблется от 4,8 до 48,6% (Li et al., 2023). Симптомы заражения вироидом наблюдались в Республике Корея на нескольких сортах яблони (Kim et al., 2006). В Южной Корее ASSVd широко распространен на сортах яблони Sansa, Fuji, Chukwang, Miki-Life, Hongro и Songbongeum на юге страны, вызывая на них пятнистость плодов (Kwon et al., 2002). В большинстве районов выращивания яблонь в штате Химачал-Прадеш (Индия) уровень заражения ASSVd составил 27,6% в 2012 г., что является самым высоким показателем среди исследуемых вироидных и вирусных патогенов семечковых культур, распространенных в этих районах (Kumar et al., 2012). Вироид выявляли на растениях яблони сорта Golden Delicious и груши сорта Dargazi в провинции Хорасан-Резави (Иран) (Yazarlou et al., 2012). Также

spots may become covered with a reddish-brown or brown corky tissue, which spreads across the fruit in stripes or entire sectors (see Fig. 1-A, Fig. 3). The spots often crack (see Fig. 2). Infected fruits often remain small and tough, do not ripen well, and have an unpleasant taste. Symptoms of infection on pear fruit appear as pitting (wrinkling) of the skin (see Fig. 1-C). Symptoms on apple fruit are usually not accompanied by any symptoms on the leaves. The viroid can have a long latent period in its host plants (Shamloul et al., 2004; Sipahioglu et al., 2009; Hadidi et al., 2017; Di Serio et al., 2018; Kaponi et al., 2024).

ASSVd reduces the marketability of apple fruits (size reduction, scarring, uneven peel coloring), which negatively impacts fruit production (Diener, 1971; Li et al., 2023). Viroid infection can lead to significant economic losses and reduced yields.

Currently, ASSVd is widespread in Asian countries (India, Iran, China, Republic of Korea, Japan), Europe (Great Britain, Greece, Denmark, Italy, Poland, Turkey, France), North America (Canada, USA), South America (Argentina) (CABI/EPPO, 2025).

Viroid is one of the most important pathogens of fruit crops in China and Japan, although in most apple-producing countries the phytopathogen is relatively rare (Hashimoto and Koganezawa, 1987; Desvignes et al., 1999). In the main apple-producing regions of China, the viroid infection load ranges from 4.8 to 48.6% (Li et al., 2023). Symptoms of viroid infection have been observed in the Republic of Korea on several apple varieties (Kim et al., 2006). In South Korea, ASSVd is widespread on Sansa, Fuji, Chukwang, Miki-Life, Hongro, and Songbongeum apple varieties in the south of the country, causing fruit spotting (Kwon et al., 2002). In most apple-growing areas of Himachal Pradesh, India, the ASSVd infection rate was 27.6% in 2012, which is the highest among the studied viroid and viral pathogens of pome crops common in these areas (Kumar et al., 2012). The viroid was detected on Golden Delicious apple and Dargazi pear plants in Razavi Khorasan Province, Iran (Yazarlou et al., 2012). ASSVd is also widespread in the Eastern Anatolia Region, Turkey (Sipahioglu et al., 2009).

ASSVd широко распространен в регионе Восточной Анатолии (Турция) (Sipahioglu et al., 2009).

Сведения о фитосанитарном статусе вироида представлены в таблице.

Основным путем распространения ASSVd является инфицированный посадочный материал восприимчивых растений-хозяев, так как этот патоген легко переносится на здоровые растения при прививке на них зараженных черенков или почек, а также рабочий инструмент – загрязненный соком растения секатор (Heo et al., 2019; Li et al., 2023). Отмечено, что в низкой степени возможна передача вироида через семена зараженных деревьев (Hurtt, Podleckis, 1995; Kim et al., 2006; Walia et al., 2015). Было установлено, что передача вироида может осуществляться насекомым-переносчиком – тепличной белокрылкой (*Trialeurodes vaporariorum* Westwood) и табачной белокрылкой (*Bemisia tabaci* Genn.) (Walia et al., 2015; Lodh, 2017; Tian et al., 2022).

На размножение ASSVd существенное влияние оказывает температура. Например, при инокуляции экспериментальных растений-хозяев симптомы заражения появлялись при температуре от 20 до 30 °C (Walia et al. 2014).

Information on the phytosanitary status of the viroid is presented in the table.

The main pathway of ASSVd spread is infected planting material from susceptible host plants, as this pathogen is easily transferred to healthy plants by grafting infected cuttings or buds onto them, as well as by working tools - pruning shears contaminated with plant sap (Heo et al., 2019; Li et al., 2023). It has been noted that, to a low degree, transmission of the viroid is possible through the seeds of infected trees (Hurtt and Podleckis, 1995; Kim et al., 2006; Walia et al., 2015). It has been established that transmission of the viroid can be carried out by an insect vector – *Trialeurodes vaporariorum* Westwood and *Bemisia tabaci* Genn (Walia et al., 2015; Lodh, 2017; Tian et al., 2022).

Temperature has a significant impact on ASSVd reproduction. For example, when inoculating experimental host plants, infection symptoms appeared at temperatures between 20°C and 30°C (Walia et al. 2014).

Табл. 1. Фитосанитарный статус вироида рубцеватости плодов яблони (EPPO Global Database, 2025)

Table. Phytosanitary status of ASSVd (EPPO Global Database, 2025)

Страна Country	**Статус** Status	**Год включения в Перечень КВО** Year of inclusion in Quarantine Pest List
Канада Canada	**Карантинный вредный организм** Quarantine pest	2019
Израиль Israel	**Карантинный вредный организм** Quarantine pest	2009
Иордания Jordan	**Список А1** List A1	2013
Швейцария Switzerland	**Регулируемый некарантинный вредный организм** Regulated non-quarantine pest	2019
Великобритания United Kingdom	**Регулируемый некарантинный вредный организм** Regulated non-quarantine pest	2020
ЕС EU	**Регулируемый некарантинный вредный организм (приложение IV)** Regulated non-quarantine pest (Appendix IV)	2019

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследованиях использовали следующие референсные изоляты вироидов из коллекции DSMZ (Германия): латентной мозаики персика (PLMVd PC-1134), рубцеватости плодов яблони (ASSVd PC-1136), пузырчатого рака коры груши (PBCVd PC-1135), экзокортиса цитрусовых (CEVd PV-0942; CEVd PV-1163), карликовости верхушек томата (TASVd PV-1151, TASVd PV-0971), латентный вироид колумнеи (CLVd PV-1068), мелкоплодности перца (PCFVd PC-1181, PCFVd PV-1067), карликовости хризантем (CSVd PC-0735), хлоротичной карликовости томата (ToCDVd PV-1148, ToCDVd PC-0916), веретеновидности клубней картофеля (PSTVd PV-0860); а также изоляты вироида веретеновидности клубней картофеля (PSTVd VIZR-07, ФГБУ «ВНИИКР») и вироида желтой крапчатости винограда (GYSVd Syn-10, ООО «Синтол»). Все вышеперечисленные изоляты использовались для оценки специфичности анализируемых праймеров.

MATERIALS AND METHODS

The following reference isolates of viroids from the DSMZ collection (Germany) were used in the studies: Peach latent mosaic viroid (PLMVd PC-1134), Apple Scar Skin Viroid (ASSVd PC-1136), Pear blister canker disease (PBCVd PC-1135), Citrus exocortis viroid (CEVd PV-0942; CEVd PV-1163), Tomato apical stunt viroid (TASVd PV-1151, TASVd PV-0971), Columnea latent viroid (CLVd PV-1068), Pepper chat fruit viroid (PCFVd PC-1181, PCFVd PV-1067), Chrysanthemum Stunt Viroid (CSVd PC-0735), Tomato Chlorotic Dwarf Viroid (ToCDVd PV-1148, ToCDVd PC-0916), Potato spindle tuber viroid (PSTVd PV-0860); as well as isolates of potato spindle tuber viroid (PSTVd VIZR-07, FGBU "VNIIKR") and Grapevine yellow speckle viroid (GYSVd Syn-10,

```
All potential self-annealing sites

5' GCCTTCGTCGACGACGACAG      3'
3'  GACAGCAGCAGCTGCTTCCG     5'

5'   GCCTTCGTCGACGACGACAG    3'
3' GACAGCAGCAGCTGCTTCCG      5'

5'       GCCTTCGTCGACGACGACAG 3'
3' GACAGCAGCAGCTGCTTCCG      5'

5' GCCTTCGTCGACGACGACAG      3'
3'     GACAGCAGCAGCTGCTTCCG  5'
```

Рис. 4. Вариант вторичных структур для праймеров cASSVd/hASSVd, интерфейс Oligonucleotide Properties Calculator (фото авторов)

Fig. 4. Secondary structure variant for cASSVd/hASSVd primers, Oligonucleotide Properties Calculator (photo by the authors)

Выделение РНК исследуемых изолятов осуществляли с помощью набора реагентов «Сорб-ГМО-Б» (ООО «НПФ Синтол», Россия). Для идентификации вироида рубцеватости плодов яблони методом ПЦР-РВ использовали следующие олигонуклеотиды: cASSVd/hASSVd (Di Serio et al., 2002), ASSVd-F91/ASSVd-R291 (Bae, 2015; Bak et al., 2017), ASSVd-F/ASSVd-R/ASSVd-P (Malandraki et al., 2015). Для проверки работы олигонуклеотидов использовали отечественные наборы реагентов компании ООО «НПФ Синтол»: 2,5х реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green, набор реагентов для проведения ПЦР, совмещенной с реакцией обратной транскрипции (ПЦР-ОТ), а также набор OneTube RT-PCR SYBR (ЗАО «Евроген») по инструкциям, прилагаемым к наборам. Данный формат ПЦР является информативным – детекция продуктов осуществляется непосредственно в ходе процесса амплификации, а не после нее. Дополнительно данный формат позволяет определять наличие/отсутствие вторичных структур и специфичность праймеров. Для реакции обратной транскрипции использовали набор реагентов «ОТ-1» (ООО «НПФ Синтол»). Постановку ПЦР-РВ осуществляли на приборе CFX96 Bio-Rad Laboratories, Inc. (США).

Олигонуклеотиды синтезированы отечественной компанией АО «ГенТерра» и предоставлены в лиофилизированном виде. Рабочая концентрация олигонуклеотидов – 10 пмоль/мкл.

Предварительно все тестируемые олигонуклеотиды были биоинформатически проверены на возможность образования вторичных структур (шпилек, димеров), температуру плавления и специфичность посадки. Были использованы онлайн-сервисы Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., 2025) и Oligonucleotide Properties Calculator (Oligo Calculator, 2025). Для множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей вироида рубцеватости плодов яблони была использована программа MAFFT версия 7.526 с последующей визуализацией в программе AliView версия 1.27. Анализ олигонуклеотидов проводили с помощью онлайн-сервиса National Center for Biotechnology Information Primer-BLAST (NCBI Primer-BLAST, 2025).

Synthol). All of the above isolates were used to evaluate the specificity of the analyzed primers.

RNA extraction from the isolates was performed using the Sorb-GMO-B reagent kit (Syntol, Russia). The following oligonucleotides were used for identification of ASSVd by real-time PCR: cASSVd/hASSVd (Di Serio et al., 2002), ASSVd-F91/ASSVd-R291 (Bae, 2015; Bak et al., 2017), ASSVd-F/ASSVd-R/ASSVd-P (Malandraki et al., 2015). To test the performance of the oligonucleotides, we used Russian reagent kits by Syntol: 2.5x Reaction Mixture for Real-Time PCR in the Presence of EVA Green Dye, a Reagent Kit for PCR Combined with the Reverse Transcription Reaction (RT-PCR), and the OneTube RT-PCR SYBR Kit (Evrogen) according to the instructions included with the kits. This PCR format is informative – product detection occurs directly during the amplification process, rather than after it. Additionally, this format allows for determining the presence/absence of secondary structures and primer specificity. The OT-1 reagent kit (NPF Syntol) was used for the reverse transcription reaction. RT-PCR was performed on a CFX96 Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA).

The oligonucleotides were synthesized by the Russian company GenTerra and provided in lyophilized form. The working concentration of the oligonucleotides is 10 pmol/μl.

All tested oligonucleotides were preliminarily bioinformatically checked for the possibility of forming secondary structures (hairpins, dimers), melting temperature, and binding specificity. The online services Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc., 2025) and Oligonucleotide Properties Calculator (Oligo Calculator, 2025) were used. For multiple alignment of the nucleotide sequences of the apple fruit scarring viroid, MAFFT version 7.526 was used, followed by visualization in AliView version 1.27. Oligonucleotide analysis was performed using the online service National Center for Biotechnology Information Primer-BLAST (NCBI Primer-BLAST, 2025).

RESEARCH RESULTS

Bioinformatics analysis revealed that the cASSVd/hASSVd oligonucleotides can form GC-rich secondary structures (see Fig. 4). The predicted melting temperature for this primer pair was 70°C. Primer validation revealed that the hASSVd oligonucleotide is located in a region where some isolates of the target viroid exhibit polymorphisms that could interfere with primer annealing and lead to false-negative results (see Fig. 5).

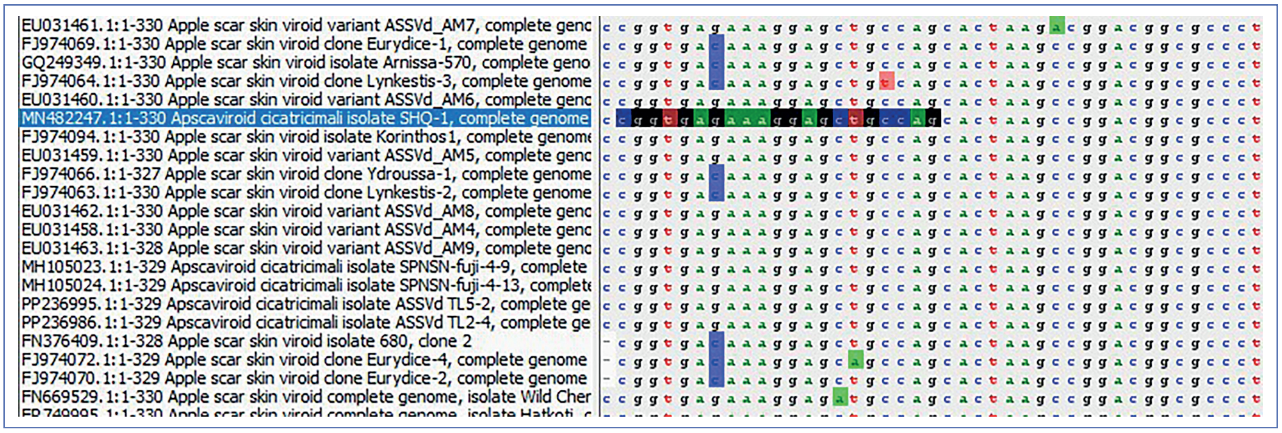


Рис. 5. Фрагмент множественного выравнивания последовательностей ASSVd и область посадки праймера hASSVd (фото авторов)

Fig. 5. Fragment of multiple alignment of ASSVd sequences and the landing region of the hASSVd primer (photo by the authors)

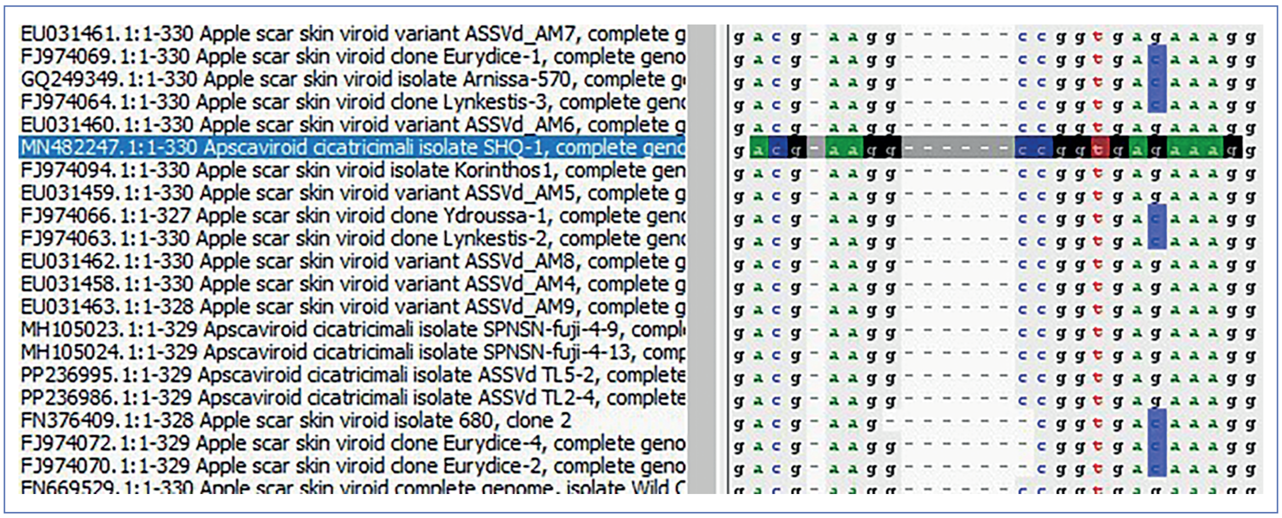


Рис. 6. Фрагмент множественного выравнивания последовательностей ASSVd и область посадки праймера ASSVd-F91 (фото авторов)

Fig. 6. Fragment of multiple alignment of ASSVd sequences and the landing region of the ASSVd-F91 primer (photo by the authors)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты биоинформатического анализа показали, что олигонуклеотиды cASSVd/hASSVd могут образовывать GC-богатые вторичные структуры (см. рис. 4). Расчетная температура плавления для данной пары праймеров составила 70 °C. Проверка праймеров показала, что олигонуклеотид hASSVd расположен в области, где у некоторых изолятов целевого вироида присутствуют полиморфизмы, которые могут повлиять на отжиг данного праймера и привести к ложноотрицательному результату (см. рис. 5).

Анализ пары праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291 показал, что она не образует вторичных структур. Температура плавления – 67 °C. Несмотря на отсутствие шпилек и димеров, данные праймеры располагаются в областях с полиморфизмами (см. рис. 6, рис. 7). Такое расположение олигонуклеотидов значительно сокращает количество потенциально детектируемых изолятов/штаммов вироида рубцеватости плодов яблони.

Последней анализируемой парой праймеров для идентификации целевого вироида были ASS-F/ASS-R с зондом ASS-P для постановки ПЦР-РВ. Данная комбинация не создает шпилек, но ASS-R

Analysis of the ASSVd-F91/ASSVd-R291 primer pair showed that it does not form secondary structures. Melting temperature is 67°C. Despite the absence of hairpins and dimers, these primers are located in regions with polymorphisms (see Fig. 6, Fig. 7). This arrangement of the oligonucleotides significantly reduces the number of potentially detectable ASSVd isolates/strains.

The final primer pair analyzed for target viroid identification was ASS-F/ASS-R with the ASS-P probe for real-time PCR. This combination does not produce hairpins, but ASS-R can form a dimer (see Fig. 8). It should also be noted that the probe is only 13 nucleotides long, and due to the presence of a fluorophore and quencher, the 5'- and 3'-terminal nucleotides may not be involved in annealing, which significantly reduces the specificity and sensitivity of this probe.

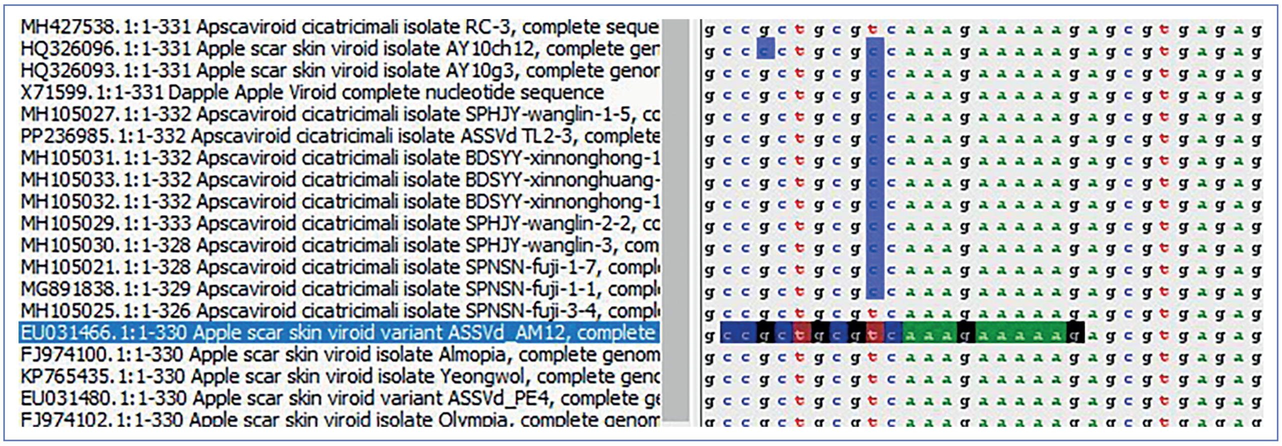


Рис. 7. Фрагмент множественного выравнивания последовательностей ASSVd и область посадки праймера ASSVd-R291 (фото авторов)

Fig. 7. Fragment of multiple alignment sequences of ASSVd and the landing region of the primer ASSVd-R291 (photo by the authors)

может образовывать димер (см. рис. 8). Дополнительно хочется отметить, что размер зонда всего 13 нуклеотидов, ввиду наличия у него флуорофора и гасителя, 5'- и 3'-концевые нуклеотиды могут не участвовать при отжиге, что значительно снижает специфичность и чувствительность такого зонда. Температура плавления составила 67, 66 и 65 °C соответственно. Область посадки праймеров ASS-F/ASS-R и зонда ASS-P находится в наиболее консервативных регионах с небольшим количеством полиморфизмов (см. рис. 9), что увеличивает количество детектируемых изолятов/штаммов ASSVd.

```
                 Self-Dimers:

1 dimer for: ASS-R
             5-tttaccgggaaacacctattgtgt->
               ||| |||| |||
<-tgtgttatccacaaagggccattt-5

               Cross Primer Dimers:
```

Рис. 8. Вариант вторичных структур для праймера ASS-R, интерфейс Multiple Primer Analyzer (фото авторов)

Fig. 8. Secondary structure variant for the ASS-R primer, Multiple Primer Analyzer interface (photo by the authors)

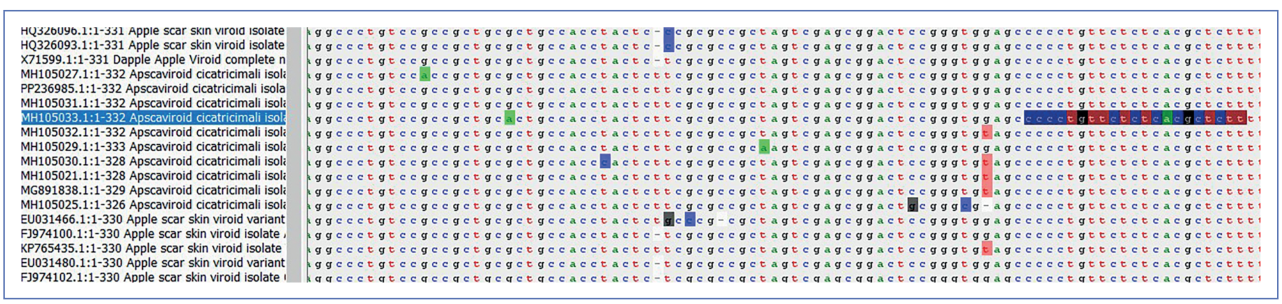


Рис. 9. Вариант вторичных структур для праймера ASS-R, интерфейс Multiple Primer Analyzer (фото авторов)

Fig. 9. Fragment of multiple alignment of ASSVd sequences and the landing region of the ASS-F primer (photo by the authors)

По полученным данным биоинформатического анализа можно сделать вывод, что большинство праймеров для идентификации вироида рубцеватости плодов яблони могут образовывать большое количество вторичных структур, а расположение области посадки на полиморфизмах снижает количество детектируемых изолятов/штаммов ASSVd. Для более точного определения влияния вторичных структур на специфичность и чувствительность диагностики проведено тестирование методом ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя. Данный анализ проводился для более полного понимания особенностей работы олигонуклеотидов и для точной интерпретации полученных результатов.

Постановку ПЦР-РВ проводили на образцах как целевого изолята ASSVd, так и на близкородственных вироидах. Оценку работы олигонуклеотидов проводили по следующим критериям: отсутствие сигнала флуоресценции в отрицательном контроле, в пробах с РНК близкородственных

The melting temperatures were 67, 66, and 65°C, respectively. The binding sites of the ASS-F/ASS-R primers and the ASS-P probe are located in the most conserved regions with a small number of polymorphisms (see Fig. 9), which increases the number of ASSVd isolates/strains detected.

Based on the bioinformatics analysis data, it can be concluded that most primers for identifying ASSVd can form a large number of secondary structures, and that targeting the planting region on polymorphisms reduces the number of detected ASSVd isolates/strains. To more accurately determine the influence of secondary structures on diagnostic specificity and sensitivity, real-time PCR testing using an intercalating dye was conducted. This analysis was conducted to better understand the performance of the oligonucleotides and to accurately interpret the results.

видов, выход кинетической кривой до 38-го цикла. Анализ проводили с использованием регрессионного метода.

На рис. 10 показаны результаты тестирования пары праймеров cASSVd/hASSVd с готовой реакционной смесью в присутствии красителя EVA Green (ООО «НПФ Синтол»), которые показывают выход кривой флуоресценции как у целевого изолята ASSVd PC-1136, так и у других изолятов (PLMVd PC-1134, CEVd PV-1163, TASVd PV-0971, CLVd PV-1068, PCFVd PC-1181, CSVd PC-0735, ToCDVd PC-0916, PSTVd VIZR-07) и у отрицательного контроля. Такие данные указывают на то, что тестируемые праймеры образуют вторичные структуры и не могут использоваться при проведении диагностики, так как есть высокий риск получения ложноположительного результата. Увеличение температуры отжига может помочь избавиться от образования вторичных структур, но при этом могут быть сильные потери в чувствительности системы.

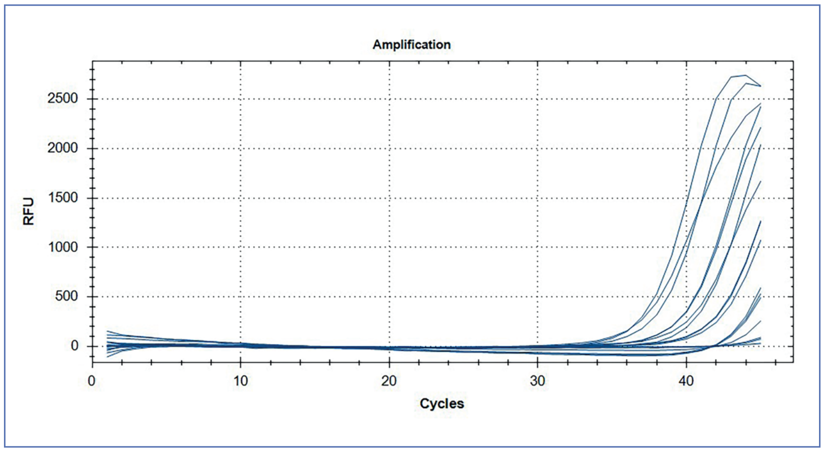


Рис. 10. Результаты анализа праймеров cASSVd/hASSVd с набором «2,5х реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green» (ООО «НПФ Синтол»), интерфейс CFX96 Bio-Rad (фото авторов)

Fig. 10. Results of the analysis of cASSVd/hASSVd primers with the kit «2.5x Reaction mixture for RT-PCR in the presence of EVA Green dye» (NPF Syntol), CFX96 Bio-Rad interface (photo by the authors)

Тестирование праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291 показало наличие сигнала флуоресценции у целевого вида на 31,6 цикле и почти полное отсутствие ложноположительного результата (см. рис. 11). Из всех тестируемых близкородственных вироидов только у образцов PSTVd VIZR-07 и TASVd PV-0971 был замечен подъем кинетической кривой на 40-м цикле. Такой результат может быть связан с присутствием единичных копий патогена в нецелевых образцах или с неспецифичной работой праймеров.

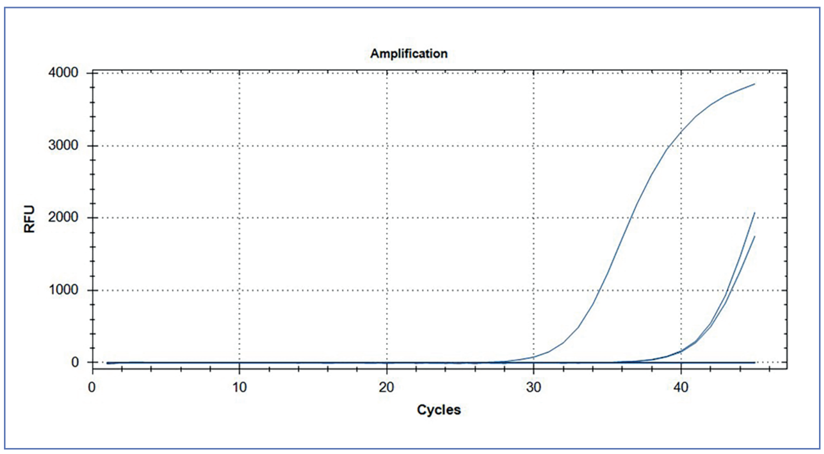


Рис. 11. Результаты анализа праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291 с набором «2,5х реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green» (ООО «НПФ Синтол»), интерфейс CFX96 Bio-Rad (фото авторов)

Fig. 11. Results of the analysis of primers ASSVd-F91/ASSVd-R291 with the kit “2.5x Reaction mixture for RT-PCR in the presence of EVA Green dye” (NPF Syntol), CFX96 Bio-Rad interface (photo by the authors)

Для оптимизации работы праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291 были использованы другие наборы для проведения ПЦР, в том числе наборы для ПЦР с совмещенной реакций обратной транскрипции. Результаты тестирования данных праймеров с набором реагентов OneTube RT-PCR SYBR (ЗАО «Евроген») представлены на рис. 12.

Полученные результаты показывают наличие сигнала флуоресценции почти во всех тестируемых образцах. Такой результат может быть связан с некорректной работой набора или неоптимальными условиями проведения ПЦР для данной пары праймеров в тестируемом наборе.

Тестирование праймеров ASS-F/ASS-R и зонда ASS-P проводили с использованием набора реагентов для проведения ПЦР, совмещенной с реакцией обратной транскрипции (ПЦР-ОТ) (ООО «НПФ Синтол»). Полученные результаты представлены на рис. 13.

Полученные результаты тестирования олигонуклеотидов ASS-F/ASS-R/ASS-P показывают наличие сигнала флуоресценции только у

Real-time PCR was performed on samples of both the target ASSVd isolate and closely related viroids. Oligonucleotide performance was assessed using the following criteria: absence of a fluorescence signal in the negative control, in samples containing RNA from closely related species, and kinetic curve recovery up to cycle 38. Analysis was performed using a regression method.

Fig. 10 shows the results of testing the cASSVd/hASSVd primer pair with the prepared reaction mixture in the presence of EVA Green dye (NPF Syntol), which show the yield of the fluorescence curve for both the target isolate ASSVd PC-1136 and other isolates (PLMVd PC-1134, CEVd PV-1163, TASVd PV-0971, CLVd PV-1068, PCFVd PC-1181, CSVd PC-0735, ToCDVd PC-0916, PSTVd VIZR-07) and the

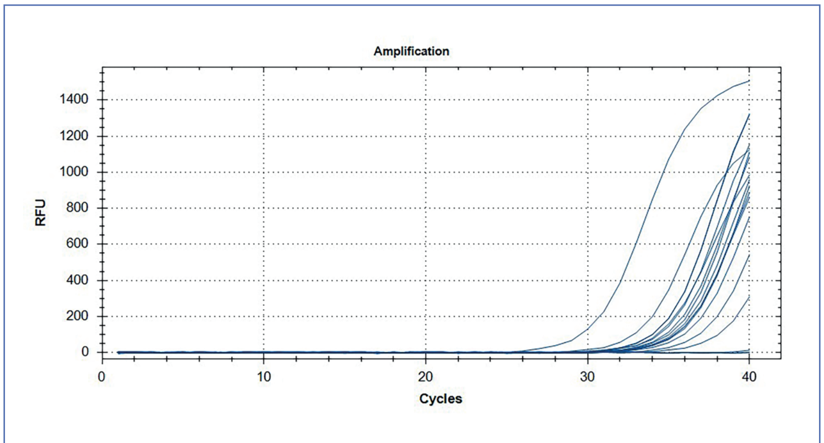


Рис. 12. Результаты анализа праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291 с набором OneTube RT-PCR SYBR (ЗАО «Евроген»), интерфейс CFX96 Bio-Rad (фото авторов)

Fig. 12. Results of the analysis of ASSVd-F91/ASSVd-R291 primers with the OneTube RT-PCR SYBR kit (Evrogen), CFX96 Bio-Rad interface (photo by the authors)

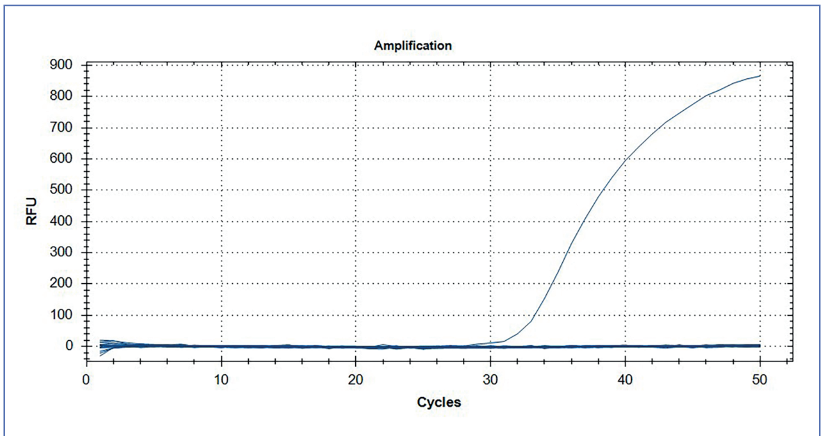


Рис. 13. Результаты анализа олигонуклеотидов ASS-F/ASS-R/ASS-P с набором реагентов для проведения ПЦР, совмещенной с реакцией обратной транскрипции (ПЦР-ОТ) (ООО «НПФ Синтол»), интерфейс CFX96 Bio-Rad (фото авторов)

Fig. 13. Results of the analysis of oligonucleotides ASS-F/ASS-R/ASS-P with a reagent kit for PCR combined with the reaction of reverse transcription (PCR-RT) (NPF Syntol), interface CFX96 Bio-Rad (photo by the authors)

negative control. These data indicate that the tested primers form secondary structures and cannot be used in diagnostics, since there is a high risk of obtaining a false positive result. Increasing the annealing temperature can help get rid of the formation of secondary structures, but this can lead to significant losses in the sensitivity of the system.

Testing of the ASSVd-F91/ASSVd-R291 primers revealed the presence of a fluorescence signal for the target species at cycle 31.6 and an almost complete absence of false-positive results (see Fig. 11). Of all the closely related viroids tested, only PSTVd VIZR-07 and TASVd PV-0971 samples showed an increase in the kinetic curve at cycle 40. This result may be due to the presence of single copies of the pathogen in non-target samples or to non-specific primer performance..

To optimize the performance of the ASSVd-F91/ASSVd-R291 primers, other PCR kits were used, including PCR kits with combined reverse transcription reactions. The results of testing these primers with the OneTube RT-PCR SYBR reagent kit (Evrogen) are shown in Fig. 12.

The obtained results show the presence of a fluorescence signal in almost all tested samples. This result may be due to incorrect operation of the kit or suboptimal PCR conditions for the given primer pair in the test kit.

Testing of the ASS-F/ASS-R primers and the ASS-P probe was performed using a reagent kit for PCR combined with the reverse transcription reaction (RT-PCR) (NPF Syntol). The results are presented in Fig. 13.

The obtained results from testing the ASS-F/ASS-R/ASS-P oligonucleotides show the presence of a fluorescence signal only for the target sample, ASSVd PC-1136. The advantage of using this kit is the combination of the reverse transcription reaction with real-time PCR, which increases diagnostic sensitivity. These primers demonstrate high specificity and will therefore be used in subsequent experiments to determine the main analytical characteristics.

целевого образца ASSVd PC-1136. Преимуществом использования данного набора является совмещение реакции обратной транскрипции с ПЦР-РВ, что увеличивает чувствительность диагностики. Данные праймеры показывают высокую специфичность, поэтому они будут использованы в последующих опытах для определения основных аналитических характеристик.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сотрудниками научного подразделения ФГБУ «ВНИИКР» в настоящее время проводятся исследования по изучению биологических особенностей вироида рубцеватости плодов яблони, способов его диагностики с дальнейшей разработкой нормативного документа для применения в лабораторной практике.

Проведенные исследования показали, что праймеры cASSVd/hASSVd способны образовывать вторичные структуры, тем самым создавая риск получения ложноположительного результата. Исходя из полученных результатов, данная

CONCLUSION

Researchers of FGBU "VNIIKR" are currently conducting study into the biological characteristics of ASSVd, methods for its diagnosis, and the subsequent development of a regulatory document for use in laboratory practice.

Conducted studies have shown that the cASSVd/hASSVd primers can form secondary structures, thereby creating a risk of false-positive пара праймеров не будет использоваться в дальнейших исследованиях. При тестировании праймеров ASSVd-F91/ASSVd-R291 отмечено, что они выявляют целевой вироид. В дальнейших исследованиях будет проводиться их апробация с другими наборами реагентов для ПЦР и дополнительной оптимизацией реакции. Олигонуклеотиды ASS-F/ASS-R/ASS-P для ПЦР-РВ также будут протестированы другими наборами реагентов отечественного производства. Для используемых праймеров в дальнейшем будут определены основные аналитические характеристики.

Финансирование. Исследования выполнены в рамках государственного задания (рег. № ЕГИСУ НИОКТР 125031103530-8).

Благодарность. Авторы выражают благодарность отделу диагностики патогенов растений ООО «Синтол» за предоставление изолята вироида для исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вироид латентной мозаики персика – опасный патоген плодовых культур / Приходько Ю.Н., Живаева Т.С., Лозовая Е.Н., Шнейдер Ю.А., Каримова Е.В. // Фитосанитария. Карантин растений. 2021. № 2. С. 20–26.

2. Bae Y.S. Development of multiplex RT-PCR for apple viruses and viroid and the incidence of apple viral disease in Gyeongsangbuk-do // Master's thesis. Kyungpook National University, Daegu, Korea. 2015.

3. Bak S., Seo E., Kim S.Y., Park W.H., Lee S.H. First report *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* infecting peach trees in South Korea // Research in Plant Disease. 2017. T. 23. №. 1. P. 75–81.

4. Desvignes J.C., Grasseau N., Boye R., Cornaggia D., Aparicio F., Di Serio F., Flores R. Biological properties of apple scar skin viroid: isolates, host range, different sensitivity of apple cultivars, elimination, and natural transmission // Plant Disease. 1999. T. 83. №. 8. P. 768–772.

5. Di Serio F., Ambrós S., Sano T., Flores R., Navarro B. Viroid diseases in pome and stone fruit trees and Koch's postulates: a critical assessment // Viruses. 2018. T. 10. №. 11. P. 612.

6. Di Serio F., Malfitano M., Alioto D., Ragozzino A., Flores R. Apple dimple fruit viroid: sequence variability and its specific detection by multiplex fluorescent RT-PCR in the presence of Apple scar skin viroid // Journal of Plant Pathology. 2002. P. 27–34.

7. Diener T.O. Potato spindle tuber “virus”: IV. A replicating, low molecular weight RNA // Virology. 1971. T. 45. №. 2. P. 411–428.

8. Diener T.O. The viroid: biological oddity or evolutionary fossil? // Advances in Virus Research. 2001. Vol. 57. P. 137–184.

9. Hadidi A., Barba M., Hong N., Hallan V. Apple scar skin viroid // Viroids and satellites. Academic press. 2017. P. 217–228.

10. Hashimoto J., Koganezawa H. Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid // Nucleic Acids Research. 1987. T. 15. №. 17. P. 7045–7052.

11. Heo S., Kim H.R., Lee H.J. Development of a quantitative real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA) assay for early detection of apple scar skin viroid // The plant pathology journal. 2019. T. 35. №. 2. P. 164.

results. Based on these results, this primer pair will not be used in further studies. Testing of the ASSVd-F91/ASSVd-R291 primers revealed that they detect the target viroid. Further studies will involve testing them with other PCR reagent kits and further optimization of the reaction. The ASS-F/ASS-R/ASS-R oligonucleotides for real-time PCR will also be tested with other Russian reagent kits. The main analytical characteristics of the primers used will be further determined.

Financing. The research was carried out within the framework of the State assignment (registration number EGISU NIOKTR 125031103530-8).

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the Syntol Plant Pathogen Diagnostics Department for providing the viroid isolate for research.

REFERENCES

1. Prikhodko Yu.N., Zhivaeva T.S., Lozovaya E.N., Shneyder Yu.A., Karimova E.V. Peach latent mosaic viroid – dangerous pathogen of fruit crops. Plant Health and Quarantine. 2021; (2): 20-26.

2. Bae Y.S. Development of multiplex RT-PCR for apple viruses and viroid and the incidence of apple viral disease in Gyeongsangbuk-do // Master's thesis. Kyungpook National University, Daegu, Korea. 2015.

3. Bak S., Seo E., Kim S.Y., Park W.H., Lee S.H. First report *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* infecting peach trees in South Korea // Research in Plant Disease. 2017. T. 23. №. 1. P. 75–81.

4. Desvignes J.C., Grasseau N., Boye R., Cornaggia D., Aparicio F., Di Serio F., Flores R. Biological properties of apple scar skin viroid: isolates, host range, different sensitivity of apple cultivars, elimination, and natural transmission // Plant Disease. 1999. T. 83. №. 8. P. 768–772.

5. Di Serio F., Ambrós S., Sano T., Flores R., Navarro B. Viroid diseases in pome and stone fruit trees and Koch's postulates: a critical assessment // Viruses. 2018. T. 10. №. 11. P. 612.

6. Di Serio F., Malfitano M., Alioto D., Ragozzino A., Flores R. Apple dimple fruit viroid: sequence variability and its specific detection by multiplex fluorescent RT-PCR in the presence of Apple scar skin viroid // Journal of Plant Pathology. 2002. P. 27–34.

7. Diener T.O. Potato spindle tuber “virus”: IV. A replicating, low molecular weight RNA // Virology. 1971. T. 45. №. 2. P. 411–428.

8. Diener T.O. The viroid: biological oddity or evolutionary fossil? // Advances in Virus Research. 2001. Vol. 57. P. 137–184.

9. Hadidi A., Barba M., Hong N., Hallan V. Apple scar skin viroid // Viroids and satellites. Academic press. 2017. P. 217–228.

10. Hashimoto J., Koganezawa H. Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid // Nucleic Acids Research. 1987. T. 15. №. 17. P. 7045–7052.

11. Heo S., Kim H.R., Lee H.J. Development of a quantitative real-time nucleic acid sequence based amplification (NASBA) assay for early detection of apple scar skin viroid // The plant pathology journal. 2019. T. 35. №. 2. P. 164.

12. Hurtt S.S., Podleckis E.V. Apple scar skin viroid is not seed transmitted or transmitted at a low rate in oriental pear // Acta Horticulturae. 1995. № 386. P. 544–550.

13. Kaponi M., Kyriakopoulou P.E., Hadidi A. Viroids of the mediterranean basin // Viruses. 2024. T. 16. №. 4. P. 612.

14. Kaponi M.S., Sano T., Kyriakopoulou P.E. Natural infection of sweet cherry trees with apple scar skin viroid // Journal of Plant Pathology. 2013. P. 429–433.

15. Kim D.H., Kim H.R., Heo S., Kim S.H., Kim M.A., Shin I.S., Kim J.H., Cho K.H., Hwang J.H. Occurrence of apple scar skin viroid and relative quantity analysis using real-time RT-PCR // Research in Plant Disease. 2010. T. 16. №. 3. P. 247–253.

16. Kim H.R., Lee S.H., Lee D.H., Kim J.S., Park J.W. Transmission of Apple scar skin viroid by grafting, using contaminated pruning equipment, and planting infected seeds // The Plant Pathology Journal. 2006. T. 22. №. 1. P. 63–67.

17. Koganezawa H. Transmission to apple seedlings of a low molecular weight RNA extracted from apple scar skin diseased trees // Japanese Journal of Phytopathology. 1985. T. 51. №. 2. P. 176–182.

18. Kumar S., Singh R.M., Ram R., Badyal J., Hallan V., Zaidi A.A., Varma A. Determination of major viral and sub viral pathogens incidence in apple orchards in Himachal Pradesh // Indian Journal of Virology. 2012. T. 23. №. 1. P. 75–79.

19. Kwon M.J., Hwang S.L., Lee S.J., Lee D.H., Lee J.Y. Detection and distribution of apple scar skin viroid-Korean strain (ASSVd-K) from apples cultivated in Korea // The Plant Pathology Journal. 2002. Vol. 18 (6). P. 342–344.

20. Kyriakopoulou P.E., Giunchedi L., Hadidi A. Peach latent mosaic and pome fruit viroids in naturally infected cultivated pear *Pyrus communis* and wild pear *P. amygdaliformis*: implications on possible origin of these viroids in the Mediterranean region // Journal of Plant Pathology. 2001. Vol. 83 (1). P. 51–62.

21. Kyriakopoulou P.E., Hadidi A. Natural infection of wild and cultivated pears with Apple scar skin viroid in Greece // XVII International Symposium Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops 472. 1997. P. 617–626.

22. Lee J.H., Park J.K., Lee D.H., Uhm J.Y., Ghim S.Y., Lee J.Y. Occurrence of apple scar skin viroid-Korean strain (ASSVd-K) in apples cultivated in Korea // The Plant Pathology Journal. 2001. T. 17. №. 5. P. 300–304.

23. Li G., Li J., Zhang H., Li J., Jia L., Zhou S., Wang Y., Sun J., Tan M., Shao J. ASSVd infection inhibits the vegetative growth of apple trees by affecting leaf metabolism // Frontiers in Plant Science. 2023. T. 14. P. 1137630.

24. Liu F.C., Chen R.F., Chen Y.X. Apple Scar Skin Disease // Academica Sinica Printery; Beijing, China. 1957. P. 43.

25. Liu F.C., Wang S.Y., Tian C.F., Chen R.F. Studies on apple scar skin disease // Annual Reports of Fruit Institute, Chinese Academy of Agriculture Science. 1962. P. 71–79.

26. Lodh S. Elucidating the fate of Apple scar skin viroid RNA in animal cells: Diss. // CSKHPKV, Palampur. 2017. P. 113.

12. Hurtt S.S., Podleckis E.V. Apple scar skin viroid is not seed transmitted or transmitted at a low rate in oriental pear // Acta Horticulturae. 1995. № 386. P. 544–550.

13. Kaponi M., Kyriakopoulou P.E., Hadidi A. Viroids of the mediterranean basin // Viruses. 2024. T. 16. №. 4. P. 612.

14. Kaponi M.S., Sano T., Kyriakopoulou P.E. Natural infection of sweet cherry trees with apple scar skin viroid // Journal of Plant Pathology. 2013. P. 429–433.

15. Kim D.H., Kim H.R., Heo S., Kim S.H., Kim M.A., Shin I.S., Kim J.H., Cho K.H., Hwang J.H. Occurrence of apple scar skin viroid and relative quantity analysis using real-time RT-PCR // Research in Plant Disease. 2010. T. 16. №. 3. P. 247–253.

16. Kim H.R., Lee S.H., Lee D.H., Kim J.S., Park J.W. Transmission of Apple scar skin viroid by grafting, using contaminated pruning equipment, and planting infected seeds // The Plant Pathology Journal. 2006. T. 22. №. 1. P. 63–67.

17. Koganezawa H. Transmission to apple seedlings of a low molecular weight RNA extracted from apple scar skin diseased trees // Japanese Journal of Phytopathology. 1985. T. 51. №. 2. P. 176–182.

18. Kumar S., Singh R.M., Ram R., Badyal J., Hallan V., Zaidi A.A., Varma A. Determination of major viral and sub viral pathogens incidence in apple orchards in Himachal Pradesh // Indian Journal of Virology. 2012. T. 23. №. 1. P. 75–79.

19. Kwon M.J., Hwang S.L., Lee S.J., Lee D.H., Lee J.Y. Detection and distribution of apple scar skin viroid-Korean strain (ASSVd-K) from apples cultivated in Korea // The Plant Pathology Journal. 2002. Vol. 18 (6). P. 342–344.

20. Kyriakopoulou P.E., Giunchedi L., Hadidi A. Peach latent mosaic and pome fruit viroids in naturally infected cultivated pear *Pyrus communis* and wild pear *P. amygdaliformis*: implications on possible origin of these viroids in the Mediterranean region // Journal of Plant Pathology. 2001. Vol. 83 (1). P. 51–62.

21. Kyriakopoulou P.E., Hadidi A. Natural infection of wild and cultivated pears with Apple scar skin viroid in Greece // XVII International Symposium Virus and Virus-Like Diseases of Temperate Fruit Crops 472. 1997. P. 617–626.

22. Lee J.H., Park J.K., Lee D.H., Uhm J.Y., Ghim S.Y., Lee J.Y. Occurrence of apple scar skin viroid-Korean strain (ASSVd-K) in apples cultivated in Korea // The Plant Pathology Journal. 2001. T. 17. №. 5. P. 300–304.

23. Li G., Li J., Zhang H., Li J., Jia L., Zhou S., Wang Y., Sun J., Tan M., Shao J. ASSVd infection inhibits the vegetative growth of apple trees by affecting leaf metabolism // Frontiers in Plant Science. 2023. T. 14. P. 1137630.

24. Liu F.C., Chen R.F., Chen Y.X. Apple Scar Skin Disease // Academica Sinica Printery; Beijing, China. 1957. P. 43.

27. Malandraki I., Varveri C., Olmos A., Vassilakos N. One-step multiplex quantitative RT-PCR for the simultaneous detection of viroids and phytoplasmas of pome fruit trees // Journal of Virological Methods. 2015. Vol. 213. 12–17.

28. Ohtsuka Y. A new diseased of apple, on the abnormality of fruit // Journal of Japan Society Horticultural Scienc (in Japanese). 1935. Т. 6. P. 44–53.

29. Ohtsuka Y. On Manshu-sabika-byo of apple, graft transmission and symptom variation in cultivars // Journal of Japan Society Horticultural Science. 1938. Т. 9. P. 282–286.

30. Shamloul A.M., Yang X., Han L., Hadidi A. Characterization of a new variant of Apple scar skin viroid associated with pear fruit crinkle disease // Journal of Plant Pathology. 2004. P. 249–256.

31. Sipahioglu H.M., Usta M., Ocak M. Development of a rapid enzymatic cDNA amplification test for the detection of Apple Scar Skin Viroid (ASSVd) in apple trees from eastern Anatolia, Turkey // Archives of Phytopathology and Plant Protection. 2009. Т. 42. №. 4. P. 352–360.

32. Takahashi T. Plant viroid diseases occurring in Japan // Japan Agricultural Research Quarterly. 1987. Т. 21. №. 3. P. 184–191.

33. Tian M., Wei S., Bian R., Luo J., Khan H.A., Tai H., Sun L. Natural cross-kingdom spread of apple scar skin viroid from apple trees to fungi // Cells. 2022. Т. 11. №. 22. P. 3686.

34. Walia Y., Dhir S., Bhadoria S., Hallan V., Zaidi A.A. Molecular characterization of Apple scar skin viroid from Himalayan wild cherry // Forest Pathology. 2012. Т. 42. №. 1. P. 84–87.

35. Walia Y., Dhir S., Ram R., Zaidi A.A., Hallan V. Identification of the herbaceous host range of Apple scar skin viroid and analysis of its progeny variants // Plant pathology. 2014. Т. 63. №. 3. P. 684–690.

36. Walia Y., Dhir S., Zaidi A.A., Hallan V. Apple scar skin viroid naked RNA is actively transmitted by the whitefly *Trialeurodes vaporariorum* // RNA Biology. 2015. Т. 12. №. 10. P. 1131–1138.

37. Yazarlou A., Jafarpour B., Habili N., Randles J.W. First detection and molecular characterization of new Apple scar skin viroid variants from apple and pear in Iran //Australasian Plant Disease Notes. 2012. Т. 7. №. 1. P. 99–102.

38. CABI, 2025. Apple scar skin viroid (apple dimple) [Электронный ресурс]. URL: https://plantwiseplusknowledgebank.org/doi/10.1079/PWKB.Species.6086 (дата обращения 18.08.2025).

39. CABI/EPPO, 2025. Apple scar skin viroid [Электронный ресурс]. URL: https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/DMPD/20123367481 (дата обращения 27.07.2025).

40. EPPO Global Database, 2025. *Apscaviroid cicatricimali* [Электронный ресурс]. URL: https://gd.eppo.int/taxon/ASSVD0 (дата обращения: 27.07.2025).

41. NCBI Primer-BLAST [Электронный ресурс]. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ (дата обращения: 08.08.2025).

42. Oligo Calculator, 2025. Oligonucleotide Properties Calculator Электронный ресурс]. URL: http://oligocalc.eu/ (дата обращения: 08.08.2025).

43. Thermo Fisher Scientific Inc., 2025. Multiple

25. Liu F.C., Wang S.Y., Tian C.F., Chen R.F. Studies on apple scar skin disease // Annual Reports of Fruit Institute, Chinese Academy of Agriculture Science. 1962. P. 71–79.

26. Lodh S. Elucidating the fate of Apple scar skin viroid RNA in animal cells: Diss. // CSKHPKV, Palampur. 2017. P. 113.

27. Malandraki I., Varveri C., Olmos A., Vassilakos N. One-step multiplex quantitative RT-PCR for the simultaneous detection of viroids and phytoplasmas of pome fruit trees // Journal of Virological Methods. 2015. Vol. 213. 12–17.

28. Ohtsuka Y. A new diseased of apple, on the abnormality of fruit // Journal of Japan Society Horticultural Scienc (in Japanese). 1935. Т. 6. P. 44–53.

29. Ohtsuka Y. On Manshu-sabika-byo of apple, graft transmission and symptom variation in cultivars // Journal of Japan Society Horticultural Science. 1938. Т. 9. P. 282–286.

30. Shamloul A.M., Yang X., Han L., Hadidi A. Characterization of a new variant of Apple scar skin viroid associated with pear fruit crinkle disease // Journal of Plant Pathology. 2004. P. 249–256.

31. Sipahioglu H.M., Usta M., Ocak M. Development of a rapid enzymatic cDNA amplification test for the detection of Apple Scar Skin Viroid (ASSVd) in apple trees from eastern Anatolia, Turkey // Archives of Phytopathology and Plant Protection. 2009. Т. 42. №. 4. P. 352–360.

32. Takahashi T. Plant viroid diseases occurring in Japan // Japan Agricultural Research Quarterly. 1987. Т. 21. №. 3. P. 184–191.

33. Tian M., Wei S., Bian R., Luo J., Khan H.A., Tai H., Sun L. Natural cross-kingdom spread of apple scar skin viroid from apple trees to fungi // Cells. 2022. Т. 11. №. 22. P. 3686.

34. Walia Y., Dhir S., Bhadoria S., Hallan V., Zaidi A.A. Molecular characterization of Apple scar skin viroid from Himalayan wild cherry // Forest Pathology. 2012. Т. 42. №. 1. P. 84–87.

35. Walia Y., Dhir S., Ram R., Zaidi A.A., Hallan V. Identification of the herbaceous host range of Apple scar skin viroid and analysis of its progeny variants // Plant pathology. 2014. Т. 63. №. 3. P. 684–690.

36. Walia Y., Dhir S., Zaidi A.A., Hallan V. Apple scar skin viroid naked RNA is actively transmitted by the whitefly *Trialeurodes vaporariorum* // RNA Biology. 2015. Т. 12. №. 10. P. 1131–1138.

37. Yazarlou A., Jafarpour B., Habili N., Randles J.W. First detection and molecular characterization of new Apple scar skin viroid variants from apple and pear in Iran //Australasian Plant Disease Notes. 2012. Т. 7. №. 1. P. 99–102.

38. CABI, 2025. Apple scar skin viroid (apple dimple) [Electronic resource]. URL: https://plantwiseplusknowledgebank.org/doi/10.1079/PWKB.Species.6086 (last accessed 18.08.2025).

39. CABI/EPPO, 2025. Apple scar skin viroid [Electronic resource]. URL: https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/DMPD/20123367481 (last accessed 27.07.2025).

Primer Analyzer [Электронный ресурс]. URL: https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html (дата обращения: 08.08.2025).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Башкирова Ида Геннадьевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0000-0001-9014-4179,
e-mail: bashkirovaid@mail.ru

Приходько Юрий Николаевич, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0009-0004-9176-407X,
e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

Шнейдер Юрий Андреевич, кандидат биологических наук, начальник научно-методического отдела вирусологии, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия; доцент кафедры защиты растений ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»;
ORCID: 0000-0002-7565-1241,
e-mail: yury.shneyder@mail.ru

Лозовая Евгения Николаевна, научный сотрудник отдела аспирантуры ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0000-0001-8612-5127,
e-mail: evgeniyaf@mail.ru

Живаева Татьяна Степановна, научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0009-0008-8312-2666,
e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

Селявкин Сергей Николаевич, младший научный сотрудник Воронежского филиала ФГБУ «ВНИИКР», г. Воронеж, Воронежская обл., Россия;
ORCID: 0000-0001-7647-5799,
e-mail: selyavkin91@mail.ru

40. EPPO Global Database, 2025. *Apscaviroid cicatricimali* [Electronic resource]. URL: https://gd.eppo.int/taxon/ASSVD0 (last accessed: 27.07.2025).

41. NCBI Primer-BLAST [Electronic resource]. URL: https://www. ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/ (last accessed: 08.08.2025).

42. Oligo Calculator, 2025. Oligonucleotide Properties Calculator [Electronic resource]. URL: http://oligocalc.eu/ (last accessed: 08.08.2025).

43. Thermo Fisher Scientific Inc., 2025. Multiple Primer Analyzer [Electronic resource]. URL: https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html (last accessed: 08.08.2025).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ida Bashkirova, PhD in Biology, Researcher, Research and Methodology Department of Virology, Leading Researcher, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID ID: 0000-0001-9014-4179,
e-mail: bashkirovaid@mail.ru

Yuri Prikhodko, PhD in Agriculture, Leading Researcher, Research and Methodology Department of Virology, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID ID: 0009-0004-9176-407X,
e-mail: prihodko_yuri59@mail.ru

Yuri Shneyder, PhD in Biology, Head of Research and Methodology Department of Virology, Leading Researcher, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; Associate Professor of Plant Protection Department, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia;
ORCID ID: 0000-0002-7565-1241,
e-mail: yury.shneyder@mail.ru

Evgenya Lozovaya, Researcher, Postgraduate Study Department, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID ID: 0000-0001-8612-5127,
e-mail: evgeniyaf@mail.ru

Tatyana Zhivaeva, Researcher, Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID ID: 0009-0008-8312-2666,
e-mail: zhivaeva.vniikr@mail.ru

Sergey Selyavkin, Junior Researcher, Voronezh Branch of FGBU “VNIIKR”, Voronezh, Voronezh Oblast, Russia;
ORCID ID: 0000-0001-7647-5799,
e-mail: selyavkin91@mail.ru

DOI 10.69536/FKR.2025.38.65.004
УДК 595.763.51

Идентификация гобийского кожееда (*Attagenus gobicola* J. Frivaldszky, 1892) – потенциального вредителя запасов в европейской части России

*Коваленко Я.Н.[1], Коваленко М.Г.[2]

[1,2] ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150

[1] *ORCID ID: 0000-0002-2572-9522, e-mail: sinodendron.rus@gmail.com*

[2] *ORCID 0000-0001-7824-9277, e-mail: bush_zbs@mail.ru*

АННОТАЦИЯ

Статья посвящена диагностике инвазивного для европейской части России вида – гобийского кожееда (*Attagenus gobicola* J. Frivaldszky, 1892). Также в статье приводятся данные о распространении этого вида и освещается история его инвазии в Европу. Подчеркивается, что риск дальнейшей инвазии гобийского кожееда имеет высокий уровень неопределенности и на настоящий момент крайне трудно прогнозировать, будет ли данный вид проявлять себя как опасный складской вредитель или же его вклад будет несущественным. Необходим дальнейший мониторинг данной инвазии, для чего и был составлен упрощенный диагностический ключ. Основой для проведенной работы послужила коллекция семейства кожеедов (Dermestidae) энтомологического фонда Всероссийского центра карантина растений, включающая богатые и достоверно определенные сборы одного из ведущих специалистов по кожеедам – Е. А. Соколова. В работе приведен адаптированный иллюстрированный ключ, позволяющий дифференцировать гобийского кожееда от иных видов кожеедов, связанных с продуктами запасов. Подсемейство Attageninae из вредителей запасов включает только род *Attagenus* Latreille, 1802. Основные признаки, позволяющие диагностировать гобийского кожееда, следующие: беспорядочно разбросанные шипики на задней поверхности передних голеней; длинная передняя голень (длина превышает ширину в 4–5 раз); одноцветные надкрылья без пятен и перевязей, а также строение вершинного членика усиков самца, который длиннее двух предыдущих,

IDENTIFICATION

DOI 10.69536/FKR.2025.38.65.004
УДК 595.763.51

Identification of *Attagenus gobicola* J. Frivaldszky, 1892 – a potential storage pest in the European part of Russia

*Yakov N. Kovalenko[1], Margarita G. Kovalenko[2]

[1,2] All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU "VNIIKR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150

[1] *ORCID ID: 0000-0002-2572-9522, e-mail: sinodendron.rus@gmail.com*

[2] *ORCID 0000-0001-7824-9277, e-mail: bush_zbs@mail.ru*

ABSTRACT

This article is devoted to the diagnostics of *Attagenus gobicola* J. Frivaldszky, 1892, a species invasive to the European part of Russia. The article also presents data on the distribution of this species and elucidates the history of its invasion in Europe. It is emphasized that the risk of further invasion of *A. gobicola* is highly uncertain, and it is currently extremely difficult to predict whether this species will prove to be a dangerous storage pest or whether its impact will be insignificant. Further monitoring of this invasion is necessary, for which purpose a simplified diagnostic key has been compiled. This work is based on the collection of the Dermestidae family in the entomological collection of the All-Russian Plant Quarantine Center, which includes extensive and reliably identified collections by one of the leading specialists in carpet beetles, E. A. Sokolov. The article provides an adapted illustrated key, allowing for the differentiation of *A. gobicola* from other species of carpet beetles associated with stored products. The subfamily Attageninae of storage pests includes only the genus *Attagenus* Latreille, 1802. The key characteristics for diagnosing *A. gobicola* are: randomly located spines on the posterior surface of the fore tibiae; a long fore tibia (length 4–5 times longer than width); uniformly colored elytra without spots or bands, as well as the structure of the apical вместе взятых, в 6–7 раз. Ключ проиллюстрирован оригинальными фотографиями. Сформированный ключ позволит значительно облегчить идентификацию гобийского кожееда и будет полезен специалистам в области защиты и карантина растений.

Ключевые слова. Coleoptera, Dermestidae, жесткокрылые, жуки, инвазии, вредители запасов, диагностика.

ВВЕДЕНИЕ

Гобийский кожеед (*Attagenus gobicola* J. Frivaldszky, 1892) – складской вредитель, повреждающий животную и растительную продукцию, в том числе зернопродукцию. Естественным ареалом данного вида, по мнению ряда исследователей, считаются такие азиатские регионы, как Тянь-Шань, Памиро-Алай, Забайкалье, Монголия, Северный и Западный Китай, а также восточная часть Казахстана (Жантиев, 1976; Li et al., 2018). В конце XX века впервые зафиксирован перехват гобийского кожееда в Европе: вид был отмечен в Швеции (Åkerlund, 1995). В 2002 г. *A. gobicola* был найден в европейской части России (Негробова, Негробов, 2002), где впоследствии отмечался и позже (Коваленко, 2019), в 2017 г. он был зарегистрирован в Белоруссии (Ostrovsky, 2020).

В Европе вид занимает нишу обитателя отапливаемых помещений (Åkerlund, 1995; Негробова, Негробов, 2002; Коваленко, 2019; Ostrovsky, 2020), однако вредоносность проявлял пока только в азиатских государствах (Мордкович, Соколов, 1999). Общая оценка риска дальнейшего развития инвазии в европейской части России характеризуется высоким уровнем неопределенности: предсказать, изменится ли ее характер на негативный (то есть способный привести к существенному экономическому ущербу) или останется практически нейтральным, на настоящем этапе затруднительно (Коваленко, Коваленко, 2024). Необходим дальнейший мониторинг инвазии *A. gobicola* на указанной территории, для чего требуется возможность его точной идентификации. На настоящее время существуют работы, позволяющие идентифицировать виды семейства Dermestidae (Жантиев, 1976; Мордкович, Соколов, 1999), однако зачастую они требуют высокой квалификации специалиста. Нами был составлен адаптированный иллюстрированный ключ, позволяющий существенно упростить дифференциацию гобийского кожееда от других синантропных представителей семейства Dermestidae, связанных с запасами растительного происхождения. К основным морфологическим признакам этого семейства относятся следующие: пятичлениковые лапки, округлые передние тазики, разделенные отростком груди (см. рис. 1, a), поперечные задние тазики с бедренными покрышками (см. рис. 1, b), надкрылья с шовной бороздой (см. рис. 1, c) и овальная форма тела (см. рис. 2, d) (Крыжановский, 1965).

antennal segment of the male, which is 6–7 times longer than the previous two segments combined. The key is illustrated with original photographs. The resulting key will significantly facilitate the identification of *A. gobicola* and will be useful to plant protection and quarantine specialists.

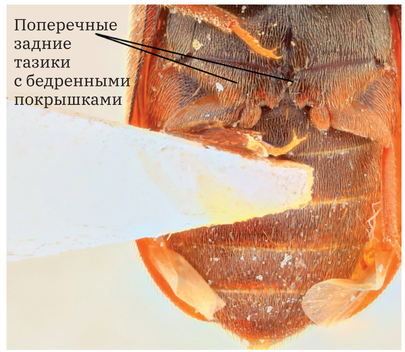
Key words. Coleoptera, Dermestidae, Coleoptera, beetles, infestations, storage pests, diagnosis.

INTRODUCTION

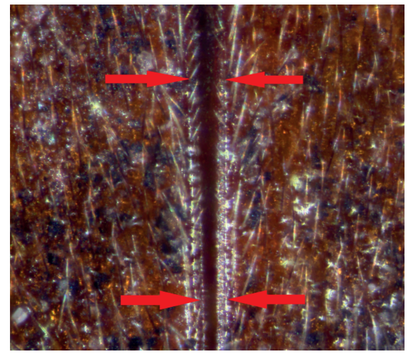
Attagenus gobicola J. Frivaldszky, 1892 is a storage pest damaging animal and plant products, including grain products. According to some researchers, the natural range of this species is considered to be Asian regions such as the Tien Shan, Pamir-Alai, Transbaikalia, Mongolia, Northern and Western China, as well as the eastern part of Kazakhstan (Zhantiev, 1976; Li et al., 2018). At the end of the 20th century, *A. gobicola* was first recorded in Europe: the species was detected in Sweden (Åkerlund, 1995). In 2002, *A. gobicola* was reported in the European part of Russia (Negrobova, Negrobov, 2002), where it was subsequently detected later (Kovalenko, 2019), in 2017 it was registered in Belarus (Ostrovsky, 2020).

In Europe, the species occurs in heated premises (Åkerlund, 1995; Negrobova, Negrobov, 2002; Kovalenko, 2019; Ostrovsky, 2020), but has so far shown harmfulness only in Asian countries (Mordkovich, Sokolov, 1999). The general assessment of the further invasion risk in the European part of Russia is characterized by a high level of uncertainty: it is difficult to predict whether its nature will change to negative (i.e. capable of leading to significant economic damage) or will remain practically neutral at this stage (Kovalenko, Kovalenko, 2024). Further monitoring of the *A. gobicola* invasion in the specified territory is necessary, which requires the possibility of its accurate identification. Currently, there are studies that allow the identification of species of the Dermestidae family (Zhantiev, 1976; Mordkovich, Sokolov, 1999), but they often require highly qualified specialists. We have compiled an adapted illustrated key that significantly simplifies the differentiation of *A. gobicola* from other synanthropic representatives of the family Dermestidae associated with plant-based stores. The main morphological characters of this family include the following: five-segmented tarsi, rounded fore coxae separated by a prosternal process (see Fig. 1, a), transverse hind coxae with femoral plates (see Fig. 1, b), elytra with a sutural groove (see Fig. 1, c), and an oval body shape (see Fig. 2, d) (Kryzhanovsky, 1965).

a



b



c

d

Рис. 1. Морфологические признаки жуков семейства Кожееды (Dermestidae): a – передние тазики, разделенные выростом переднегруди; b – задние поперечные тазики с бедренными покрышками; c – шовная борозда на надкрыльях (отмечена стрелками), d – овальная форма тела; a, c, d – *Attagenus gobicola*, b – *Attagenus unicolor simulans* Solsky, 1876 (фото: М. Г. Коваленко)

Fig. 1. Morphological characters of the Dermestidae family beetles: a – anterior coxae separated by a prosternal process; b – posterior transverse coxae with femoral plates; c – sutural groove on the elytra (indicated by arrows), d – oval body shape; a, c, d – *Attagenus gobicola*, b – *Attagenus unicolor simulans* Solsky, 1876 (photos: M. G. Kovalenko)

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалами для проведения исследований послужила коллекция кожеедов ФГБУ «ВНИИКР», включающая в том числе сборы одного из ведущих специалистов по данной группе жуков Е. А. Соколова. Морфологические признаки жесткокрылых фотографировали послойно при помощи цифровой зеркальной фотокамеры Canon EOS 6D (Япония, Canon) с объективом Canon MP-E 65 mm f/2.8 1-5X (Япония, Canon), установленным на стационарном копировальном столе Kaiser Copy Stand RS 2 XA (Германия, Kaiser). Результирующие изображения получены с помощью Zerene Stacker (v. 1.04 Build T2024-11-18-1210). При составлении ключа были использованы следующие работы: Жантиев (1976), Мордкович, Соколов (1999) и Háva (2015).

КЛЮЧ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ГОБИЙСКОГО КОЖЕЕДА (*ATTAGENUS GOBICOLA*) ОТ ДРУГИХ ВИДОВ DERMESTIDAE, СВЯЗАННЫХ С ХРАНЯЩЕЙСЯ ПРОДУКЦИЕЙ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

1. Ключ для дифференциации подсемейства Attageninae от прочих подсемейств Dermestidae

1. Лоб без простого глазка (см. рис. 2, а)............ ....**Dermestinae**

– Лоб с простым глазком (см. рис. 2, b).............**2**

2. Тело голое (см. рис. 3, а).................................. ....**прочие подсемейства Dermestidae**

– Тело покрыто волосками и чешуйками (см. рис. 3, b) **3**

3. Переднегрудь с воротничком (см. рис. 4, а) ....**Megatominae**

– Переднегрудь без воротничка (см. рис. 4, b) ....**Attageninae, род *Attagenus***

(в настоящее время среди вредителей запасов в подсемействе Attageninae не известно ни одного

MATERIALS AND METHODS

The materials for the research were the beetle collection of FGBU "VNIIKR", including collections of one of the leading specialists in this group of beetles, E. A. Sokolov. Morphological characters of the beetles were photographed layer by layer using a Canon EOS 6D digital SLR camera (Japan, Canon) with a Canon MP-E 65 mm f / 2.8 1-5X lens (Japan, Canon), mounted on a Kaiser Copy Stand RS 2 XA stationary copy table (Germany, Kaiser). The resulting images were obtained using Zerene Stacker (v. 1.04 Build T2024-11-18-1210). The following works were used in compiling the key: Zhantiev (1976), Mordkovich, Sokolov (1999) and Háva (2015).

A KEY TO DIFFERENTIATION OF *ATTAGENUS GOBICOLA* FROM OTHER DERMESTIDAE SPECIES ASSOCIATED WITH STORED PLANT PRODUCTS

1. Key to differentiating the subfamily Attageninae from other subfamilies of Dermestidae

1. Frons without ocellus (see Fig. 2, a)..................... ....**Dermestinae**

– Frons with ocellus (see Fig. 2,b)........................**2**

2. Body without setae (see Fig. 3, a)...................... ....**other subfamilies Dermestidae**

– Body covered with simple and scale-like setae (see Fig. 3, b)..**3**

3. Prothorax with a collar (see Fig.). 4, a)................ .... **Megatominae**

– Prothorax without a collar (see Fig. 4, b)........... ....**Attageninae, genus *Attagenus***

(Currently, no genus other than *Attagenus* is known among the storage pests in the subfamily Attageninae, so other genera are not included in the key).

a b

Рис. 2. a – лоб без простого глазка у *Dermestes maculatus* DeGeer, 1774; b – с простым глазком (отмечен стрелкой) у *Attagenus smirnovi* Zhantiev, 1973 (фото: М. Г. Коваленко)

Fig. 2. a – frons without ocellus, *Dermestes maculatus* DeGeer, 1774; b – with ocellus (indicated by arrow), *Attagenus smirnovi* Zhantiev, 1973 (photos: M. G. Kovalenko)

рода, кроме *Attagenus*, поэтому другие роды в ключ не включены).

2. Ключ для дифференциации гобийского кожееда от иных видов рода *Attagenus*

1. На задней поверхности передних голеней снаружи имеется тонкий острый кантик с направленными наружу шипиками (см. рис. 5, a)...***A. lobatus* Rosenhauer, 1856**

– На задней поверхности передних голеней нет острого кантика, их наружный край более-менее закруглен, шипики в нем расположены беспорядочно или сгруппированы в несколько рядов (см. рис. 5, b)......**2**

2. Длина передних голеней (без шпор) превышает их ширину (вместе с шипами) не более чем в 3 раза...
..........................**прочие виды рода *Attagenus***

– Длина передних голеней (без шпор) превышает их ширину (вместе с шипиками) более чем в 3 раза (обычно в 4–5 раз) (см. рис. 5, b)..**3**

3. Надкрылья с контрастным рисунком в виде пятен и перевязей (см. рис. 6, a). Если без рисунка, то жук черный.............
..........................**прочие виды рода *Attagenus***

– Надкрылья одноцветные, без пятен или перевязей, иногда с малозаметной косой перевязью. Жук коричневый, переднеспинка темнее, чем надкрылья (см. рис. 6, b)...**4**

4. Вершинный членик усиков самца длиннее двух предыдущих, вместе взятых, не более чем в 4 раза (см. рис. 7, a).............................
....**иные виды рода *Attagenus***

– Вершинный членик усиков самца длиннее двух предыдущих, вместе взятых, в 6–7 раз (см. рис. 7, b)..................***A. gobicola* (гобийский кожеед)**

a b

Рис. 3. a – голое тело *Orphilus niger* (Rossi, 1790); b – тело, покрытое волосками *Attagenus gobicola* (фото: М. Г. Коваленко)

Fig. 3. a – body without setae, *Orphilus niger* (Rossi, 1790); b – body with setae, *Attagenus gobicola* (photos: M. G. Kovalenko)

a b

Рис. 4. a – переднегрудь с воротничком у *Megatoma conspersa* Solsky, 1876 (показан стрелкой); b – без воротничка у *Attagenus gobicola* (фото: М. Г. Коваленко)

Fig. 4. a – prothorax with a collar, *Megatoma conspersa* Solsky, 1876 (indicated by arrow); b – without a collar, *Attagenus gobicola* (photos: M. G. Kovalenko)

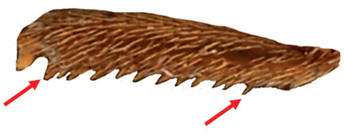
ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подготовлен иллюстрированный ключ для дифференциации гобийского кожееда (*A. gobicola*) от иных видов кожеедов, связанных с запасами. Ключ позволяет существенно упростить идентификацию данного инвазивного вида и будет полезен для специалистов в области защиты и карантина растений.

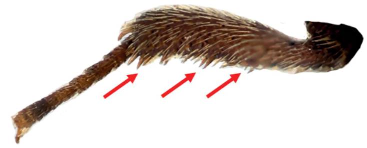
2. A key to differentiating *Attagenus gobicola* from other species of the genus *Attagenus*

1. On the posterior surface of the fore tibiae there is a thin sharp edge with outward-pointing spines (see Fig. 5, a) ....***A. lobatus* Rosenhauer, 1856**

– On the posterior surface of the fore tibiae there is no sharp edge; their outer margin is more or less rounded, with spines arranged irregularly or grouped into several rows (see Fig. 5, b)...................................**2**



a



b

Рис. 5. а –передняя голень у *Attagenus lobatus* с рядом шипиков (показаны стрелками); b – с беспорядочными шипиками (показаны стрелками) у *A. gobicola* (фото: М. Г. Коваленко)

Fig. 5. a – *Attagenus lobatus* fore tibiae with a row of spines (indicated by arrows); b – with irregular spines (indicated by arrows) in *A. gobicola* (photos: M. G. Kovalenko)

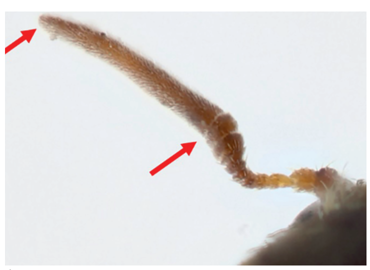
a

b

Рис. 6. а – надкрылья с пятнами у *Attagenus pictus Ballion,* 1871; b – однотонные у *A. gobicola* (фото: М. Г. Коваленко)

Fig. 6. a – elytra with spots, *Attagenus pictus Ballion,* 1871; b – no spots, *A. gobicola* (photos: M. G. Kovalenko)

a



b

Рис. 7. а – вершинный членик усика (показан стрелками) у *A. smirnovi*; b – *A. gobicola* (фото: М. Г. Коваленко)

Fig. 7. a – terminal antennal segment (indicated by arrows), *A. smirnovi;* b – *A. gobicola* (photos: M. G. Kovalenko)

2. The length of the fore tibiae (excluding spurs) exceeds their width (including spines) by no more than 3 times.................................... ....**other *Attagenus* species**

– The length of the front tibiae (excluding spurs) exceeds their width (including spines) by more than 3 times (usually 4–5 times) (see Fig. 5, b)..**3**

3. Elytra with a contrasting pattern of spots and bands (see Fig. 6, a). If the elytra are without pattern, then the beetle is black........... ....**other *Attagenus* species**

– Elytra are uniform in color, without spots or bands, sometimes with a faint oblique band. The beetle is brown, the pronotum is darker than the elytra (see Fig. 6, b).............**4**

4. The terminal antennal segment of the male is no more than 4 times longer than the two preceding segments combined (see Fig. 7, a).....................**other *Attagenus* species**

– The terminal antennal segment of the male is 6–7 times longer than the two preceding segments combined (see Fig. 7, b)....... ....***A. gobicola***

CONCLUSION

An illustrated key has been prepared to differentiate *A. gobicola* from other species of carpet beetles associated with storage crops. The key significantly simplifies the identification of this invasive species and will be useful for plant protection and quarantine specialists.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to Yu. A. Lovtsova, Senior Researcher at the Research and Methodology Department of Entomology at FGBU "VNIIKR", for consultations on photography techniques.

The work was carried out within the framework of R&D 124030100152-9.

REFERENCES

1. Zhantiev R.D. Beetles of the family Dermestidae of the USSR fauna. [Zhukikozheedy (semeystvo Dermestidae) fauny SSSR]. Moscow: Moscow State University Publishing, 1976, 182 p. (In Russ.)

2. Kovalenko Ya.N. 2019. Dermestidae beetles [Electronic resource] // Handbook of alien beetles of the European part of Russia. Pp. 274–316. URL: https://www.zin.ru/animalia/coleoptera/rus/invguide.htm (last accessed: 19.09.2025). (In Russ.)

3. Kovalenko Ya.N., Kovalenko M.G. Possible prospects of invasion of *Attagenus gobicola* Frivaldszky, 1892) (Coleoptera, Dermestidae) in European part of Russia. [O veroyatnykh perspektivakh razvitiya invazii gobiyksogo kozheeda (*Attagenus gobicola* Frivaldszky, 1892) (Coleoptera, Dermestidae) v yevropeyskoy chasti Rossii] // Plant Health and Quarantine. 2024; S4-2 (20B): 47–48 (In Russ.)

БЛАГОДАРНОСТЬ

Авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику НМО энтомологии ФГБУ «ВНИИКР» Ю. А. Ловцовой за консультации по технике фотографирования.

Работа выполнена в рамках НИОКТР 124030100152-9.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жантиев Р.Д. Жуки-кожееды (семейство Dermestidae) фауны СССР. М.: Изд-во МГУ, 1976, 182 с.

2. Коваленко Я.Н. 2019. Кожееды – Dermestidae [Электронный ресурс] // Справочник по чужеродным жесткокрылым европейской части России. С. 274–316. URL: https://www.zin.ru/animalia/coleoptera/rus/invguide.htm (дата обращения: 19.09.2025).

3. Коваленко Я. Н., Коваленко М. Г. О вероятных перспективах развития инвазии гобийского кожееда (*Attagenus gobicola* Frivaldszky, 1892) (Coleoptera, Dermestidae) в европейской части

России // Фитосанитария. Карантин растений. 2024. № S4-2 (20). С. 47–48.

4. Крыжановский О.Л. Определительная таблица семейств / Определитель насекомых Европейской части СССР в пяти томах. II. Жесткокрылые и Веерокрылые. М.-Л.: Наука, 1965. С. 15–23.

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

6. Негробова Е.А., Негробов С.О. 2002. Жуки-кожееды (Coleoptera, Dermestidae) Воронежской области // Приспособления организмов к действию экстремальных экологических факторов. Материалы VII Международной научно-практической экологической конференции. Белгород, 2002. С 60–61.

7. Åkerlund M. Ängern *Attagenus augustatus gobicola* (Coleoptera, Dermestidae) – ett nytt skadedjur eller bara en tillfällig gäst? // Entomologisk Tidskrift. 1995. Vol. 116. P. 68.

8. Háva J. World Catalogue of Insects: Dermestidae (Coleoptera). Vol. XXVI. Leiden – Boston: Bril., 2015, 419 p.

9. Li D., Mu Z., Guo D., Yan X., Zhou Q. 2018. Investigation on the Species and Distribution of Stored Grain Insects in Northwest China (p. 211–216.). – Materials of 12th International Working Conference on Stored Product Protection (IWCSPP), 2018, Berlin, Germany, October 7–11.

10. Ostrovsky A.M. *Attagenus gobicola* Frivaldszky, 1892 and *Anthrenus picturatus* Solskij, 1876 (Coleoptera: Dermestidae) — The New Invasive Species of Carpet Beetles in the Fauna of Belarus // Russian Journal of Biological Invasions. 2020. Vol. 11. P. 265–267. DOI: 10.1134/S207511172003008X

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Коваленко Яков Николаевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НМО энтомологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID ID: 0000-0002-2572-9522,
e-mail: sinodendron.rus@gmail.com

Коваленко Маргарита Григорьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологии и генетики насекомых и клещей НМО энтомологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID ID: 0000-0001-7824-9277,
e-mail: bush_zbs@mail.ru

4. Kryzhanovsky O.L. Identification key of families / Insect key of the European part of the USSR in five volumes. [Opredelitelnaya tablitsa semeistv / Opredelitel' nasekomykh Yevropeyskoy chasti SSSR v pyati tomakh] II. Beetles and Plecopterans. Moscow-Leningrad: Nauka, 1965. Pp. 15–23. (In Russ.)

5. Mordkovich Ya.B., Sokolov E.A. (eds.). Handbook – identification key of quarantine and other dangerous pests of raw materials, stocks, and seed material. [Spravochnik – opredelitel' karantinnykh i drugikh opasnykh vrediteley syr'ya, produktov zapasa i posevnogo materiala] Moscow: Kolos, 1999, 384 p. (In Russ.)

6. Negrobova E.A., Negrobov S.O. 2002. Dermestid beetles (Coleoptera, Dermestidae) of Voronezh Oblast [Zhuki-kozheedy (Coleoptera, Dermestidae) Voronezhskoy oblasti] // Adaptations of organisms to the effects of extreme ecological factors. Proceedings of the VII International scientific-practical ecological conference. Belgorod, 2002. Pp. 60–61. (In Russ.)

7. Åkerlund M. Ängern *Attagenus augustatus gobicola* (Coleoptera, Dermestidae) – ett nytt skadedjur eller bara en tillfällig gäst? // Entomologisk Tidskrift. 1995. Vol. 116. P. 68.

8. Háva J. World Catalogue of Insects: Dermestidae (Coleoptera). Vol. XXVI. Leiden – Boston: Bril., 2015, 419 p.

9. Li D., Mu Z., Guo D., Yan X., Zhou Q. 2018. Investigation on the Species and Distribution of Stored Grain Insects in Northwest China (p. 211–216.). – Materials of 12th International Working Conference on Stored Product Protection (IWCSPP), 2018, Berlin, Germany, October 7–11.

10. Ostrovsky A.M. *Attagenus gobicola* Frivaldszky, 1892 and *Anthrenus picturatus* Solskij, 1876 (Coleoptera: Dermestidae) — The New Invasive Species of Carpet Beetles in the Fauna of Belarus // Russian Journal of Biological Invasions. 2020. Vol. 11. P. 265–267. DOI: 10.1134/S207511172003008X

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yakov Kovalenko, PhD in Biology, Senior Researcher, Research and Methodology Department of Entomology, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID ID: 0000-0002-2572-9522,
e-mail: sinodendron.rus@gmail.com

Margarita Kovalenko, PhD in Biology, Senior Researcher, Laboratory of Ecology and Genetics of Insects and Mites of the Research and Methodology Department of Entomology, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID ID: 0000-0001-7824-9277,
e-mail: bush_zbs@mail.ru

DOI 10.69536/FKR.2025.46.28.005
УДК 579.64

Характеристика штамма VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici*, выделенного из ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare* L.)

* Словарева О.Ю.[1], Авдеев И.С.[2], Яремко А.Б.[3], Панченко К.В.[4]

[1, 2, 3, 4] ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150
[1, 2] Российский университет дружбы народов (РУДН), г. Москва, Россия, 117198
[1] *ORCID 0000-0001-6022-5955, e-mail: slovareva.olga@gmail.com*
[2] *ORCID 0009-0006-9266-7073, e-mail: avdeevfey@mail.ru*
[3] *ORCID 0000-0003-3295-8080, e-mail: an_ya94@mail.ru*
[4] *ORCID 0009-0007-1308-8645, e-mail: ksushik96@mail.ru*

АННОТАЦИЯ

Erwinia rhapontici (Millard 1924) Burkholder 1948 – это фитопатогенная бактерия, вызывающая розовый бактериоз зерна у зерновых и зернобобовых культур, а также различные виды гнилей и другие симптомы у широкого перечня ценных сельскохозяйственных растений, и для полного понимания патогенного потенциала этой бактерии необходимо детально изучить максимально возможное число штаммов. Целью данной работы является создание комплексной характеристики бактериального штамма VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici*, выделенного из ячменя обыкновенного озимого (*Hordeum vulgare* L.), происхождение – Республика Крым. В работе представлены его морфологические свойства, которые были изучены с помощью микроскопии клеток, а также фотографии колоний бактериальных культур на питательной среде R2A. Клетки данного штамма палочковидной формы, их размер 0,8–1,5 мкм в длину, 0,2–0,4 мкм в ширину. Бактериальные колонии штамма VNIIKR-B-0035 на среде R2A – беловатого цвета, слизистые, однородные, имеют круглую выпуклую форму, гладкую и блестящую поверхность, непрозрачны, а выработка водорастворимых пигментов отсутствует. Биохимические особенности были изучены набором для идентификации *Enterobacteriaceae* и физиологических сходных бактерий API 20E (Biomerieux, Франция). Бактерии этого штамма способны сбраживать многие виды сахаров, восстанавливают нитриты, не продуцируют аргининдигидролазу, лизиндекарбоксилазу, орнитиндекарбоксилазу, уреазу,

DOI 10.69536/FKR.2025.46.28.005
UDC 579.64

Characteristics of the strain VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* isolated from common barley (*Hordeum vulgare* L.)

* Olga Yu. Slovareva[1], Ivan S. Avdeev[2], Anastasia B. Yaremko[3], Ksenia V. Panchenko[4]

[1, 2, 3, 4] All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU “VNIIKR”), Bykovo, Ramwnskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150
[1, 2] Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia, 117198
[1] *ORCID 0000-0001-6022-5955, e-mail: slovareva.olga@gmail.com*
[2] *ORCID 0009-0006-9266-7073, e-mail: avdeevfey@mail.ru*
[3] *ORCID 0000-0003-3295-8080, e-mail: an_ya94@mail.ru*
[4] *ORCID 0009-0007-1308-8645, e-mail: ksushik96@mail.ru*

ABSTRACT

Erwinia rhapontici (Millard 1924) Burkholder 1948 is a phytopathogenic bacterium that causes pink grain of cereals and legumes, as well as various types of rot and other symptoms in a wide range of valuable agricultural plants, and to fully understand the pathogenic potential of this bacterium, it is necessary to study in detail as many strains as possible. The aim of this work is to create a comprehensive characterization of the bacterial strain VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici*, isolated from common winter barley (*Hordeum vulgare* L.), origin – Republic of Crimea. The paper presents its morphology studied using cell microscopy, as well as photographs of bacterial colonies cultured on R2A nutrient medium. The cells of this strain are rod-shaped, measuring 0.8–1.5 µm long and 0.2–0.4 µm wide. Bacterial colonies of strain VNIIKR-B-0035 on R2A medium are whitish, slimy, and uniform. They have a round, convex shape, a smooth, shiny surface, and are opaque. They do not produce water-soluble pigments. Biochemical characteristics were studied using the API 20E kit for the identification of *Enterobacteriaceae* and physiologically similar bacteria (Biomerieux, France). Bacteria of this strain are capable of fermenting many types of индол, ацетоин, желатиназу и H_2S, а также не способны утилизировать цитраты. Молекулярно-генетическая характеристика проведена с использованием четырех ПЦР-тестов на различные гены, специфичных для данной фитопатогенной бактерии. Штамм VNIIKR-B-0035 идентифицирован с использованием ПЦР-тестов с праймерами TSU01/TSU02, ERH-1A/ERH-1B и isoRF/isoRR, а также путем секвенирования участка гена *rpoD*. Это первая молекулярно-генетическая идентификация *E. rhapontici* в России. Эта работа подтвердила, что ячмень обыкновенный (*Hordeum vulgare* L.) может служить источником изоляции *E. rhapontici*.

Ключевые слова. Коллекция, бактерии, бактериоз зерновых, идентификация, *rpoD*, розовый бактериоз, ПЦР, защита растений, карантин растений.

sugars, reduce nitrites, do not produce arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, urease, indole, acetoin, gelatinase and H2S, and are also unable to utilize citrates. Molecular genetic characterization was conducted using four PCR tests for various genes specific to this phytopathogenic bacterium. Strain VNIIKR-B-0035 was identified using PCR tests with primers TSU01/TSU02, ERH-1A/ERH-1B, and isoRF/isoRR, as well as by sequencing a portion of the *rpoD* gene. This is the first molecular genetic identification of *E. rhapontici* in Russia. This study confirmed that common barley (*Hordeum vulgare* L.) can serve as a source of *E. rhapontici* isolation.

Key words. Collection, bacteria, cereal bacteriosis, identification, rpoD, pink grain of cereals, PCR, plant protection, plant quarantine.

ВВЕДЕНИЕ

Фитопатогенная бактерия *Erwinia rhapontici* (Millard 1924) Burkholder 1948 вызывает розовый бактериоз зерна у зерновых (Dutrecq et al., 1990; Roberts, 1974) и зернобобовых культур (Huang et al., 2007; Schroeder et al., 2002), а также различные виды гнили у овощных (Kahala et al., 2012; Wang et al., 2022), плодовых культур (Kotan et al., 2006; Wang et al., 2017), лекарственных (Tharreau et al., 1992) и других хозяйственно-ценных растений (Ramírez-Rojas et al., 2016). Основой для осуществления контроля заболеваний растений, вызываемых фитопатогенами, являются углубленные знания об их биологических и молекулярно-генетических особенностях (Никитинский, Никитинская, 2025). Получение таких знаний требует наличия как можно большего числа штаммов с установленными культурально-морфологическими, биохимическими и молекулярно-генетическими характеристиками. Штамм VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici,* был выделен в 2021 г. из растения ячменя обыкновенного озимого (*Hordeum vulgare* L.) сорта Восход (суперэлита) в рамках научно-исследовательской работы ФГБУ «ВНИИКР» и предварительно идентифицирован секвенированием фрагмента гена 16S рРНК с использованием праймеров 8UA/519B, о чем сделано краткое упоминание в публикации Мувинги с коллегами (Muvingi et al., 2023). Полученная последовательность участка 16S рРНК при Nucleotide BLAST анализе (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) показала максимальное сходство (98,77% при 100% покрытии) с образцами *E. rhapontici.* Депонирование штамма в исследовательскую коллекцию научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «ВНИИКР» осуществлено по результатам идентификации только по фрагменту 16S рРНК, что не позволяет с достаточной степенью достоверности подтвердить видовую принадлежность штамма к *E. rhapontici*.

INTRODUCTION

The phytopathogenic bacterium *Erwinia rhapontici* (Millard 1924) Burkholder 1948 causes pink grain of cereals (Dutrecq et al., 1990; Roberts, 1974) and legumes (Huang et al., 2007; Schroeder et al., 2002), as well as various types of rot in vegetables (Kahala et al., 2012; Wang et al., 2022), fruit crops (Kotan et al., 2006; Wang et al., 2017), medicinal (Tharreau et al., 1992) and other economically valuable plants (Ramírez-Rojas et al., 2016). The basis for monitoring plant diseases caused by phytopathogens is in-depth knowledge of their biological and molecular genetic characteristics (Nikitinsky, Nikitinskaya, 2025). Obtaining such knowledge requires the availability of as many strains as possible with established cultural, morphological, biochemical, and molecular genetic characteristics. The *E. rhapontici* strain VNIIKR-B-0035 was isolated in 2021 from the Voskhod (superelite) variety of common winter barley (*Hordeum vulgare* L.) as part of research at the FGBU "VNIIKR". It was preliminarily identified by sequencing a fragment of the 16S rRNA gene using primers 8UA/519B, as briefly mentioned in the publication by Muvingi (Muvingi et al., 2023). The resulting 16S rRNA sequence, when analyzed by Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), showed the highest similarity (98.77% at 100% coverage) to *E. rhapontici* samples. The deposition of the strain in the research collection of the Research and Methodology Department of Bacteriology of FGBU "VNIIKR" was carried out based on the identification results only by the 16S rRNA fragment, which does not allow us to confirm with a sufficient degree of certainty the species affiliation of the strain to *E. rhapontici*.

Цель исследования заключалась в идентификации штамма VNIIKR-B-0035 с использованием комплекса молекулярно-генетических тестов и в уточнении его культурально-морфологических и биохимических свойств.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом исследования являлся штамм VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici*. Штамм хранится в исследовательской коллекции научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «ВНИИКР» в морозильной камере при температуре -80 °C в двух формах: в виде суспензии в 15%-м растворе глицерина и в виде исходной бактериальной культуры на стенке криопробирки.

Чистую культуру штамма VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici* использовали для характеристики колоний и клеток бактерии, а также для проведения молекулярно-генетической характеристики с использованием видоспецифичных ПЦР-тестов. Для посева штамма VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici* использовали агаризованную питательную среду общего назначения R2A (Reasoner, Geldreich, 1985). Культивирование штамма проводили при температуре 27 °C. Морфологические признаки колоний описывали в соответствии с общепринятыми методами (Практикум по микробиологии, 2005). Фотофиксацию колоний проводили на фотоаппарате (Canon EOS 6D Mark II, Япония), а также с использованием камеры (Canon EOS RP, Япония) в сочетании со стереомикроскопом (Zeiss stereoDiscovery V20, Германия). Фотофиксацию клеток бактерии проводили на голотомографическом микроскопе HT-X1 (Tomocube, Республика Корея).

Молекулярно-генетическую идентификацию проводили, используя ПЦР-тесты, перечисленные в табл. 1.

The aim of the study was to identify the VNIIKR-B-0035 strain using a set of molecular genetic tests and to clarify its cultural, morphological and biochemical properties.

MATERIALS AND METHODS

The study material was the *E. rhapontici* strain VNIIKR-B-0035. The strain is stored in the research collection of the Research and Methodology Department of Bacteriology of FGBU "VNIIKR" in a freezer at -80°C in two forms: as a suspension in a 15% glycerol solution and as the original bacterial culture on the wall of the cryotube.

A pure culture of the *E. rhapontici* strain VNIIKR-B-0035 was used to characterize bacterial colonies and cells, as well as to conduct molecular genetic characterization using species-specific PCR tests. General-purpose agar nutrient medium R2A (Reasoner and Geldreich, 1985) was used to inoculate the *E. rhapontici* strain VNIIKR-B-0035. Cultivation of the strain was carried out at a temperature of 27 °C. The morphological characters of the colonies were described in accordance with generally accepted methods (Practical Guide to Microbiology, 2005). Photographic recording of the colonies was performed using a camera (Canon EOS 6D Mark II, Japan), as well as a camera (Canon EOS RP, Japan) in combination with a stereomicroscope (Zeiss stereoDiscovery V20, Germany). Photographic imaging of bacterial cells was performed using a HT-X1 holotomographic microscope (Tomocube, Republic of Korea).).

Molecular genetic identification was performed using the PCR tests listed in Table 1.

To confirm the absence of inhibition of the amplification reaction, additional PCR testing with an internal positive control (IPC) was performed according to the method described by Mazurin et al.

Табл. 1. Молекулярно-генетические тесты, использованные для идентификации штамма VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici*

Table 1. Molecular genetic tests used to identify the strain VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici*

Тест Test	**Праймер** Primer	**Последовательность 5`-3`** Sequence 5`-3`	**Мишень** Aim	**Длина ПЦР-продукта** Length of PCR product	**Источник** Source
TSU01/TSU02	TSU01	CCCTGAAGCCATCACTTATT	rpoD	466	Tsuji et al., 2020
	TSU02	AACACACAGCTTCAGGATG			
isoRF/isoRR	isoRF	CCTGCAGTGCCGGGCCAGAT	NX-5	1600	Thapa et al., 2012
	isoRR	AGTGTGACTGTTGTTTTCAG			
recA_8/recA_8c	recA_8	TTGGGCGTGGATATCGAC	recA	419	Gehring, Geider, 2012
	recA_8c	CACTTTAACGCGGGTCTCA			
ERH-1A/ERH-1B	ERH-1A	AGTGGCGGTCCTGGTAAAAG	ampC	736	Naas et al., 2004
	ERH-1B	AAGCATCTCCCAGCCAAGTC			

**rpoD* – фрагмент β-субъединицы бактериальной РНК-полимеразы; *NX-5* – фрагмент гена сахарозоизомеразы; *recA* – фрагмент гена ДНК-рекомбиназы А; *ampC* – фрагмент гена β-лактамазы класса С.

* *rpoD* - a fragment of the β-subunit of bacterial RNA polymerase; *NX-5* - a fragment of the sucrose isomerase gene; *recA* - a fragment of the DNA recombinase A gene; *ampC* - a fragment of the class C β-lactamase gene.

Для подтверждения отсутствия ингибирования реакции амплификации проводили дополнительное ПЦР-тестирование с внутренним положительным контролем (ВПК) согласно методике, описанной Мазуриным с соавторами (Мазурин и др., 2012). Полученные ПЦР-продукты визуализировали путем электрофореза в 1,5%-м агарозном геле в стандартном трис-боратном (ТВЕ) буфере с окраской красителем бромистым этидием и документировали при помощи системы ChemiDoc™ XRS+, BIO-RAD, США.

В целях повышения достоверности молекулярно-генетической идентификации и подтверждения видовой принадлежности исследуемого штамма была определена последовательность фрагментов гена *rpoD* (Tsuji et al., 2020) с помощью секвенирования по Сэнгеру (Белкин и др., 2021). Полученные нуклеотидные последовательности использовали для поиска гомологичных образцов при помощи программы BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) и выравнивали алгоритмом CLASTAL W в пакете программ BioEdit 7.2.

При изучении биохимических особенностей использовали набор для идентификации *Enterobacteriaceae* и других неприхотливых грамотрицательных палочек API 20E (Biomerieux, Франция) в соответствии с инструкциями производителя с одним исключением: инкубирование планшетов с микролунками после их инокуляции бактериальной суспензией проводили при 27 °С в течение 24 часов, а не при 36 °С ± 2 °С, поскольку данный штамм не может быть культивирован при температуре выше 30 °С. Тестирование проводили в пятикратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические свойства

В результате анализа 2D-изображений, созданных на голотомографическом микроскопе HT-X1 (Tomocube, Республика Корея), установлено, что клетки штамма VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici* имеют форму палочек размером 0,2–0,4 мкм в ширину и 0,8–1,5 мкм в длину (см. рис. 1).

Морфология колоний штамма VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici* представлена на рис. 2 (Canon EOS 6D Mark II, Япония) и на рис. 3. (стереомикроскоп Zeiss stereoDiscovery V20, Германия, с камерой Canon EOS RP, Япония).

Морфологические признаки колоний штамма VNIIKR-B-0035, описанные в соответствии с общепризнанными методиками (Практикум по микробиологии, 2005), представлены в табл. 2.

В результате проведения ПЦР-тестирования ДНК штамма VNIIKR-B-0035 с праймерами TSU01/TSU02, ERH-1A/ERH-1B, isoRF/isoRR и электрофореза ПЦР-продуктов в агарозном геле визуализированы фрагменты ожидаемой длины 466 п.о., 736 п.о., 1600 п.о. соответственно (см. рис. 4А, 4Б, 4В). На рис. 4Г у ДНК штамма VNIIKR-B-0035 ПЦР-продукты отсутствовали. Наличие ПЦР-продукта ожидаемой длины 419 п.о. (см. рис. 4Г) у положительного контроля амплификации, а также отсутствие ингибирования ПЦР, подтвержденное получением ПЦР-продукта длиной 714 п.о. у ВПК (см. рис. 5), свидетельствует о корректном прохождении ПЦР.

(Mazurin et al., 2012). The resulting PCR products were visualized by electrophoresis in a 1.5% agarose gel in a standard Tris-borate (TBE) buffer stained with ethidium bromide dye and documented using the ChemiDoc™ XRS+, BIO-RAD, USA.

To increase the reliability of molecular genetic identification and confirm the species affiliation of the studied strain, the *rpoD* gene fragments (Tsuji et al., 2020) were sequenced using Saenger sequencing (Belkin et al., 2021). The resulting nucleotide sequences were used to search for homologous samples using the BLAST software (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) and aligned using the CLASTAL W algorithm in the BioEdit 7.2 software package.

For the study of biochemical characteristics, the API 20E kit for the identification of *Enterobacteriaceae* and other unfastidious gram-negative rods (Biomerieux, France) was used in accordance with the manufacturer's instructions, with one exception: incubation of microwell plates after their inoculation with a bacterial suspension was carried out at 27 °C for 24 hours, and not at 36 °C ± 2 °C, since this strain cannot be cultivated at temperatures above 30 °C. Testing was carried out in 5 replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

Morphology

As a result of the analysis of 2D images created on the HT-X1 holotomographic microscope (Tomocube, Republic of Korea), it was established that the cells of the VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici* strain are rod-shaped, 0.2–0.4 μm in width and 0.8–1.5 μm long (see Fig. 1).

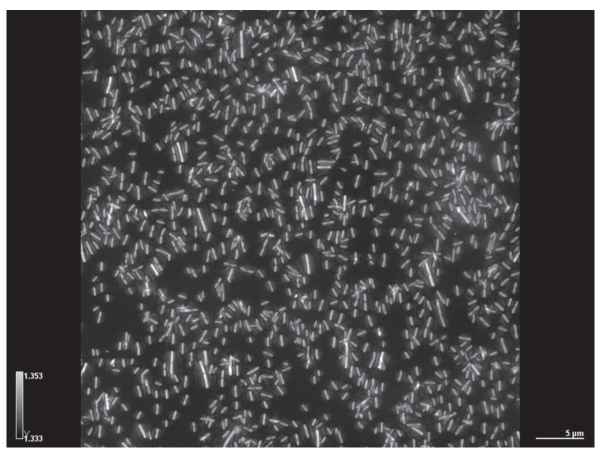


Рис. 1. 2D-изображение бактериальных клеток штамма VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici*, сделанное на голотомографическом микроскопе HT-X1 (Tomocube, Республика Корея)

Fig. 1. 2D image of bacterial cells of the VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* strain taken on an HT-X1 holotomographic microscope (Tomocube, Republic of Korea)

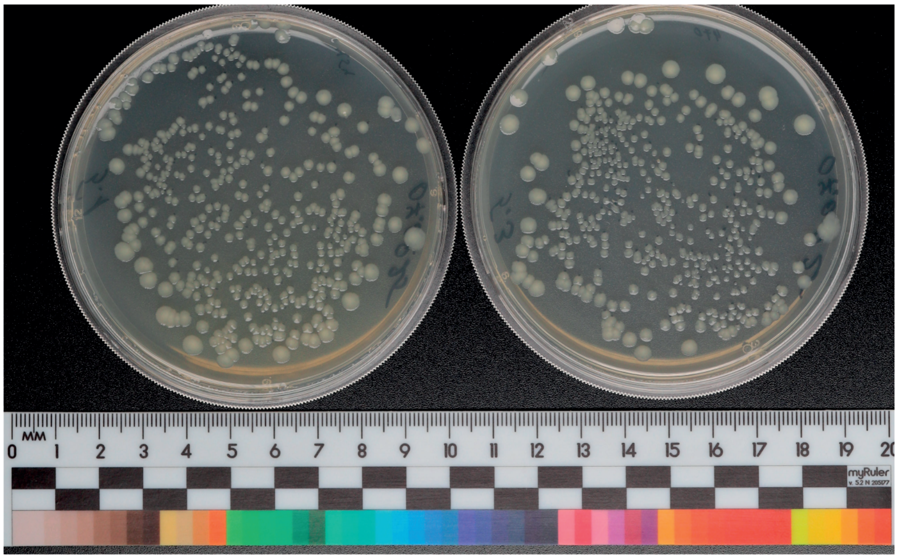


Рис. 2. Колонии штамма VNIIKR-B-0035 Erwinia rhapontici спустя четверо суток инкубирования при 27 °С на среде R2A

Fig. 2. Colonies of the VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* strain after four days of incubation at 27 °C on R2A medium

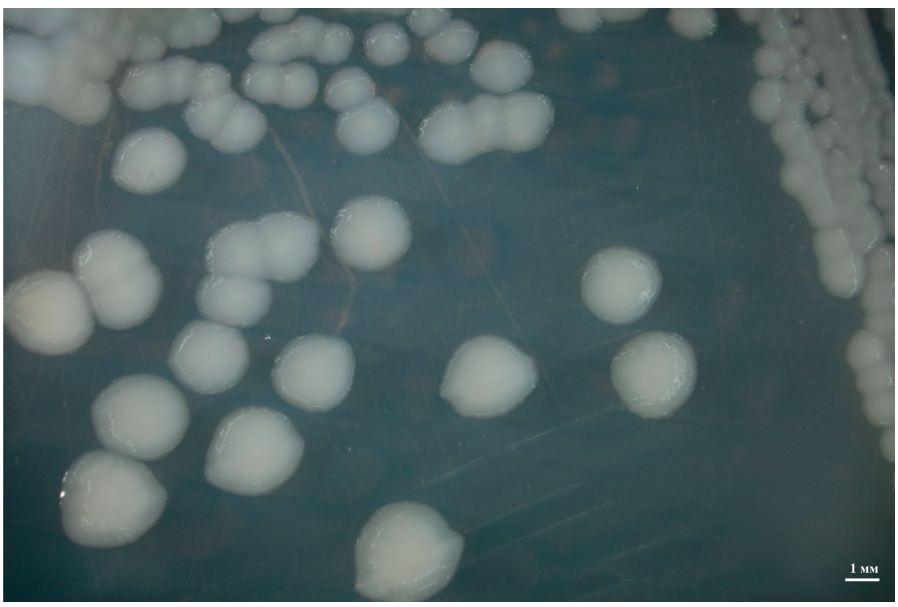


Рис. 3. Колонии штамма *Erwinia rhapontici* VNIIKR-B-0035 спустя четверо суток инкубирования при температуре 27 °С на среде R2A

Fig. 3. Colonies of the VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* strain after four days of incubation at 27 °C on R2A medium

Полученный результат может указывать на недостаточную комплементарность генетической мишени праймеров recA_8/recA_8c у штамма VNIIKR-B-0035.

При выравнивании в Nucleotide BLAST NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) последовательности, полученной в ходе секвенирования участка гена *rpoD*, она имела максимальное сходство с геном референтного штамма *E. rhapontici* BY21311 (полногеномная последовательность GCA_020683125.1) с идентичностью 97,84% (покрытие 100%). Полученные результаты молекулярно-генетической идентификации подтверждают видовую принадлежность штамма VNIIKR-B-0035 к виду *E. rhapontici.*

Биохимические свойства

Результаты биохимического тестирования набором API 20E после 24 часов инкубирования

The morphology of the colonies of the VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici* strain is shown in Fig. 2 (Canon EOS 6D Mark II, Japan) and in Fig. 3 (Zeiss stereo-Discovery V20 stereo microscope, Germany, with a Canon EOS RP camera, Japan).

The morphological characteristics of the colonies of strain VNIIKR-B-0035, described in accordance with generally accepted methods (Microbiology Workshop, 2005), are presented in Table 2.

Molecular genetic identification

The results of molecular genetic identification are presented in Fig. 4.

As a result of PCR testing of DNA of strain VNIIKR-B-0035 with primers TSU01/TSU02, ERH-1A/ERH-1B, isoRF/isoRR and electrophoresis of PCR products in agarose gel, fragments of the expected lengths of 466 bp, 736 bp, 1600 bp, respectively, were visualized (see Fig. 4A, 4B, 4C). In Fig. 4D, PCR products were absent from DNA of strain VNIIKR-B-0035. The presence of a PCR product of the expected length of 419 bp (see Fig. 4D) in the positive amplification control, as well as the absence of PCR inhibition, confirmed by obtaining a PCR product of 714 bp in length for IPC (see Fig. 5), indicates that the PCR was performed correctly.

The obtained result may indicate insufficient complementarity of the genetic target of recA_8/recA_8c primers in the VNIIKR-B-0035 strain.

When aligned in NCBI Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) with the sequence obtained during sequencing of the *rpoD* gene region, it had the highest similarity to the gene of the reference strain *E. rhapontici* BY21311 (whole genome sequence GCA_020683125.1) with an identity of 97.84% (100% coverage). The obtained results of molecular genetic identification confirm the species affiliation of strain VNIIKR-B-0035 to the species *E. rhapontici.*

Biochemical properties

The results of biochemical testing with the API 20E kit after 24 hours of incubation of microwell plates at 27 °C are shown in Fig. 6.

Табл. 2. Морфологические признаки колоний штамма VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* спустя трое–четверо суток инкубирования на среде R2A

Table 2. Morphological characteristics of colonies of the VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* strain after three to four days of incubation on R2A medium

Признак Aspects	**Свойства VNIIKR-B-0035** VNIIKR-B-0035 properties	**Свойства типового штамма DSM 4484*** Properties of the type strain DSM 4484*
Форма Shape	**Круглая** Round	**Круглая** Round
Размер Size	**До 10 мм** Up to 10 mm	**До 10 мм** Up to 10 mm
Поверхность Surface	**Гладкая** Smooth	**Гладкая** Smooth
Профиль Profile	**Выпуклый** Convex	**Выпуклый** Convex
Блеск Brilliance	**Блестящая** Shiny	**Блестящая** Shiny
Прозрачность Transparency	**Непрозрачная** Opaque	**Непрозрачная** Opaque
Цвет Color	**Беловатый** Whitish	**Беловатый** Whitish
Пигментация среды Medium Pigmentation	**Отсутствует** Absent	**Отсутствует/розовый** Absent/Pink
Край Edge	**Гладкий** Smooth	**Гладкий** Smooth
Структура Structure	**Однородная** Homogeneous	**Однородная** Homogeneous
Консистенция Consistency	**Слизистая** Mucous	**Слизистая** Mucous

**по описанию вида*
**according to the species description*

Молекулярно-генетическая идентификация

Результаты молекулярно-генетической идентификации представлены на рис. 4.

Molecular genetic identification

The results of molecular genetic identification are presented in Fig. 4.

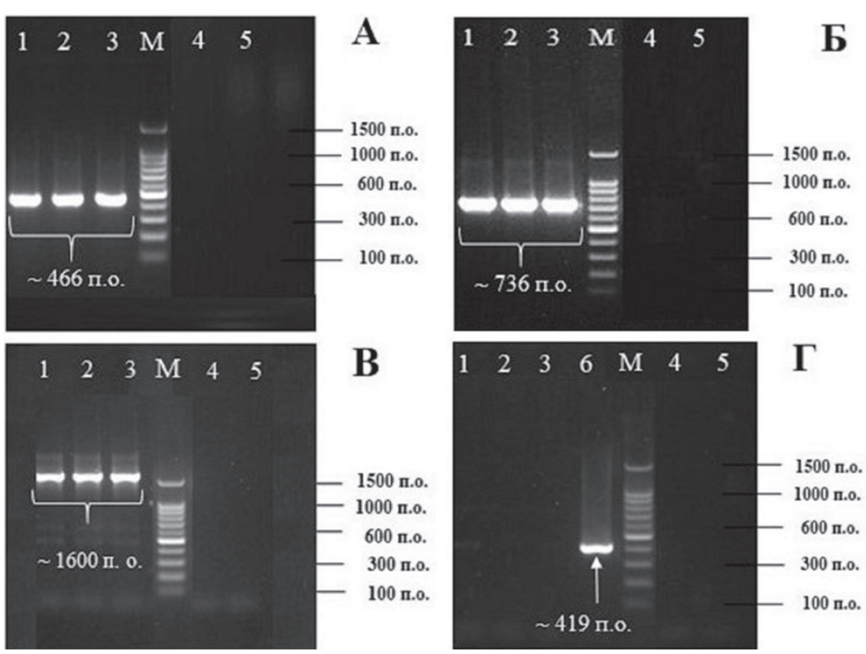


Рис. 4. Электрофореграмма результатов тестов ПЦР с ДНК штамма VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* (дорожки 1–3), где А – тест TSU01/TSU02, Б – тест ERH-1A/ ERH-1B, В – тест isoRF/isoRR, Г – тест recA_8/recA_8c, 4–5 – отрицательный контроль амплификации, 6 – положительный контроль амплификации, М – маркер длин ДНК 100+ bp, «Евроген» (Россия)

Fig. 4. Electropherogram of the PCR tests results with DNA of the VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* strain (tracks 1–3), where A is the TSU01/TSU02 test, B is the ERH-1A/ERH-1B test, C is the isoRF/isoRR test, G is the recA_8/recA_8c test, 4–5 are negative amplification controls, 6 are positive amplification controls, M is a DNA length marker of 100+ bp, Evrogen (Russia)

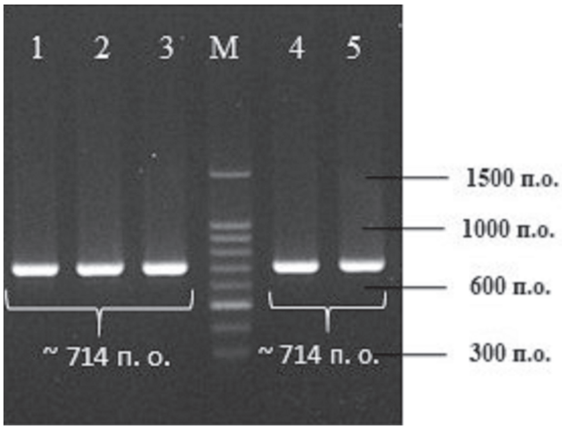


Рис. 5. **Электрофореграмма результатов теста Mus 714 R/F, где дорожки 1–3 – ДНК штамма VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici*, 4–5 – отрицательный контроль амплификации, M – маркер длин ДНК 100+ bp, «Евроген»**

Fig. 5. Electropherogram of the Mus 714 R/F test results, where tracks 1–3 are DNA of the VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* strain, 4–5 are negative amplification control, M is a DNA length marker of 100+ bp, "Eurogen"

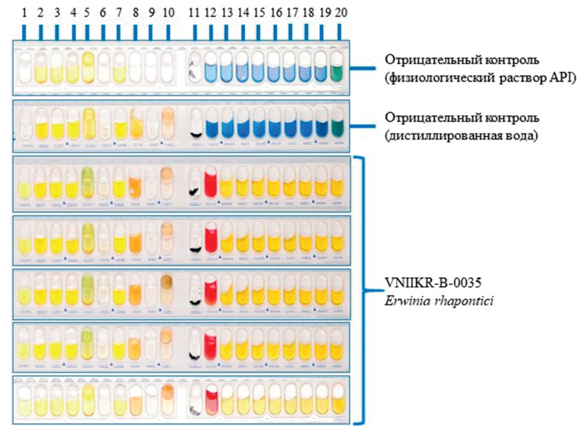


Рис. 6. **Результаты биохимического тестирования штамма VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* набором для идентификации *Enterobacteriaceae* и других грамотрицательных бактерий API 20E (Biomerieux, Франция)**

Fig. 6. Results of biochemical testing of the VNIIKR-B-0035 *Erwinia rhapontici* strain using the API 20E kit for identification of *Enterobacteriaceae* and other gram-negative bacteria (Biomerieux, France)

планшетов с микролунками при температуре 27 °С представлены на рис. 6.

Установлено, что бактерии штамма VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici* вырабатывают ферменты ß-галактозидазу и триптофандеаминазу, могут сбраживать глюкозу, маннит, инозит, сорбит, рамнозу, сахарозу, мелибиозу, амигдалин, арабиозу, восстанавливают нитраты до нитритов. Они не продуцируют аргининдигидролазу, лизиндекарбоксилазу, орнитиндекарбоксилазу, уреазу, индол, ацетоин, желатиназу и H_2S, а также не способны утилизировать цитраты. Типовой штамм *E. rhapontici* DSM 4484^T не вырабатывает ферменты ß-галактозидазу, триптофандеаминазу, не сбраживает сорбит, продуцирует ацетоин и утилизирует цитраты (Schober et al., 2025). Таким образом, штамм VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici* обладает уникальными биохимическими характеристиками по сравнению с типовым штаммом этого вида.

В результате проведенной характеристики составлена карточка штамма, содержащая ключевую информацию о его происхождении и основных свойствах (см. табл. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были определены культурально-морфологические особенности исследуемого штамма. С помощью голотомографического микроскопа HT-X1 (Tomocube, Республика Корея) мы установили, что клетки штамма VNIIKR-B-0035 имеют палочковидную форму, их размер 0,8–1,5 мкм в длину и 0,2–0,4 мкм в ширину. При культивировании бактерии на агаризованной среде R2A вырастают слизистые, однородные, круглой выпуклой формы, с гладкой и блестящей поверхностью колонии, они непрозрачны и не вырабатывают водорастворимых пигментов.

С помощью использования набора для идентификации *Enterobacteriaceae* и других неприхотливых грамотрицательных палочек API 20E (Biomerieux, Франция) установлено, что

It has been established that the VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici* strain produces the enzymes ß-galactosidase and tryptophan deaminase and can ferment glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, sucrose, melibiose, amygdalin, and arabionose, and reduce nitrates to nitrites. They do not produce arginine dihydrolase, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, urease, indole, acetoin, gelatinase, or H_2S, and are unable to utilize citrates. The type strain of *E. rhapontici* DSM 4484T does not produce the enzymes ß-galactosidase and tryptophan deaminase, does not ferment sorbitol, produces acetoin, and utilizes citrates (Schober et al., 2025). Thus, the VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici* strain has unique biochemical characteristics compared to the type strain of this species.

As a result of the conducted characterization, a strain profile was compiled containing key information about its origin and main properties (see Table 3).

CONCLUSION

As a result of the study, the cultural and morphological characteristics of the studied strain were determined. Using an HT-X1 holotomographic microscope (Tomocube, Republic of Korea), we found that the cells of the VNIIKR-B-0035 strain are rod-shaped, measuring 0.8–1.5 µm in length and 0.2–0.4 µm in width. When cultivated on R2A agar medium, the bacteria produce slimy, uniform, round, convex colonies with a smooth and shiny surface. They are opaque and do not produce water-soluble pigments.

Using the API 20E (Biomerieux, France) kit for identification of *Enterobacteriaceae* and other unpretentious gram-negative rods, it was established that the bacteria of the VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici* strain have noticeable differences from the type strain DSM 4484^T in the profile of the synthesized enzymes.

Табл. 3. Карточка штамма VNIIKR-B-0035 Erwinia rhapontici
Table 3. Profile of the VNIIKR-B-0035 Erwinia rhapontici strain

Название коллекции, в которой депонирован штамм Name of the collection in which the strain is deposited	**Научная коллекция бактерий научно-методического отдела бактериологии** Scientific collection of bacteria of the Research and Methodology Department of Bacteriology
Адрес коллекции Collection address	**МО, м. о. Раменский, пгт Быково, ул. Пограничная, 32, 140150** Moscow Oblast, Ramenskoye, Bykovo, 32 Pogranichnaya, 140150
Дата введения в коллекцию Date of introduction into the collection	**01.06.2021**
Номер штамма Strain number	**VNIIKR-B-0035**
Научное название организма Scientific name of the organism	**Erwinia *rhapontici* (Millard 1924) Burkholder 1948**
Географическое происхождение Geographical origin	**Россия, Республика Крым, Белогорский район** Russia, Republic of Crimea, Belogorsky District
Типовой штамм Type strain	☐ **Да** Yes ☑ **Нет** No
Источник изоляции Source of isolation	**Ячмень обыкновенный озимый, сорт Восход (суперэлита), *Hordeum vulgare* L.** Common winter barley, Voskhod variety (super elite), *Hordeum vulgare* L.
Ф. И. О. лица, произведшего выделение штамма Full name of the person who isolated the strain	**Словарева О. Ю.** Slovareva O. Yu.
Год изоляции Year of isolation	**2021**
Проведенные методы идентификации Identification methods used	**Секвенирование участков 16S рРНК (праймеры 8UA/519B) и участок гена *rpo*D (праймеры TSU01/TSU02), ПЦР-тестирование с праймерами TSU01/TSU02 (Tsuji et al., 2020), ERH-1A/ERH-1B (Naas et al., 2004) и isoRF/isoRR (Thapa et al., 2012)** Sequencing of 16S rRNA regions (primers 8UA/519B) and the *rpo*D gene region (primers TSU01/TSU02), PCR testing with primers TSU01/TSU02 (Tsuji et al., 2020), ERH-1A/ERH-1B (Naas et al., 2004) and isoRF/isoRR (Thapa et al., 2012)

бактерии штамма VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici* имеют заметные отличия от типового штамма DSM 4484^{T} по профилю синтезируемых ферментов.

При ПЦР-тестировании ДНК VNIIKR-B-0035 *E. rhapontici* с праймерами recA_8/recA_8c (Gehring, Geider, 2012) ПЦР-продукты отсутствовали, что свидетельствует о недостаточной комплементарности генетической мишени праймеров recA_8/recA_8c у штамма VNIIKR-B-0035. В результате проведения других видоспецифичных ПЦР-тестов исследуемого штамма с праймерами TSU01/TSU02 (Tsuji et al., 2020), ERH-1A/ERH-1B (Naas et al., 2004) и isoRF/isoRR (Thapa et al., 2012) получены продукты ожидаемой длины 466 п.о., 736 п.о., 1600 п.о. соответственно. Секвенирование участка гена *rpoD* также указывает на принадлежность штамма VNIIKR-B-0035 к виду *E. rhapontici*.

Это первая молекулярно-генетическая идентификация *E. rhapontici* в России, проведенная с использованием видоспецифичных праймеров TSU01/TSU02, ERH-1A/ERH-1B и isoRF/isoRR, а также путем секвенирования участка *rpoD*. Полученные результаты подтверждают принадлежность штамма VNIIKR-B-0035 к виду *E. rhapontici*. Ранее, насколько нам известно, отсутствовали достоверные сведения о том, что ячмень может быть источником изоляции *E. rhapontici*. Упоминание об изоляции бактерии рода *Erwinia* из ячменя двурядного (*Hordeum vulgare* L. var. *distichon*) размещено на сайте Научно-

PCR testing of *E. rhapontici* VNIIKR-B-0035 DNA with recA_8/recA_8c primers (Gehring, Geider, 2012) did not yield any PCR products, indicating insufficient complementarity of the recA_8/recA_8c primer genetic target in strain VNIIKR-B-0035. Other species-specific PCR tests of the strain under study with TSU01/TSU02 (Tsuji et al., 2020), ERH-1A/ERH-1B (Naas et al., 2004), and isoRF/isoRR (Thapa et al., 2012) primers yielded products of the expected lengths of 466 bp, 736 bp, and 1600 bp, respectively. Sequencing of the *rpoD* gene region also indicates that strain VNIIKR-B-0035 belongs to the species *E. rhapontici*.

This is the first molecular genetic identification of *E. rhapontici* in Russia, conducted using the species-specific primers TSU01/TSU02, ERH-1A/ERH-1B, and isoRF/isoRR, as well as by sequencing the *rpoD* region. The results confirm that strain VNIIKR-B-0035 belongs to the species *E. rhapontici*. As far as we know, previously there was no reliable information that barley could be a source of *E. rhapontici* isolation. A mention of the isolation of a bacterium of the genus *Erwinia* from the barley (*Hordeum vulgare* L. var. distichon) was posted on the website of the Research Center for Genetic Resources of the National Organization for Agricultural and Food Research, where, based on a study of the 650 bp *gyrB* gene sequence, the bacterium was identified as *E. rhapontici* (NARO исследовательского центра генетических ресурсов Национальной организации сельскохозяйственных и продовольственных исследований, где на основании исследования последовательности гена *gyrB* длиной 650 п.о. бактерию идентифицировали как *E. rhapontici* (NARO Genebank project). Учитывая, что выравнивание этой последовательности в Nucleotide BLAST NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) не позволяет установить максимальное сходство именно с *E. rhapontici,* поскольку использованная последовательность гена *gyrB* консервативна с другим видом *E. persicina*, сообщение в NARO Genebank project нельзя считать достоверным до получения дополнительных сведений. Таким образом, наше исследование является первым подтверждением того, что *E. rhapontici* может быть выделена из ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare* L.).

Работа выполнена в рамках государственного задания, регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 124022800050-6.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белкин Д.Л., Бондаренко Г.Н., Яремко А.Б., Уварова Д.А. Метод секвенирования в видовой идентификации карантинных вредных организмов // Карантин растений. Наука и практика. 2019. Т. 28. № 2. С. 31–34.

2. Мазурин Е.С., Копина М.Б., Шероколава Н.А. Контроль достоверности результатов фитосанитарной экспертизы при использовании молекулярных методов диагностики // Вестник РУДН. Серия: Агрономия и животноводство. 2012. № 3. С. 31–37.

3. Никитинский Д.А., Никитинская Е.В. Молекулярно-генетические методы, применяемые для детекции карантинных объектов. Инновации, вызовы и перспективы. Фитосанитария. Карантин растений. 2025;(3):85-107. https://doi.org/10.69536/FKR.2025.67.86.006.

4. Dutrecq A., Debras P., Stevaux J., Klaessens D. Estimation of bacterial flora on scalded wheat heads // Parasitica. 1990. T. 2-3. No. 46. P. 69–84.

5. Gehring I., Geider K. Identification of *Erwinia* species isolated from apples and pears by differential PCR. // Journal of Microbiological Methods. 2012. Vol. 89. No. 1. P. 57–62. doi: 10.1016/j.mimet.2012.01.018.

6. Genebank project, NARO. Details of microorganism genetic resources. Details of MAFF 150529. URL: ttps://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_search_detail_en.php?maff=150529.

7. Huang H. C., Erickson R. S., Hsieh T. F. Lack of host specificity of strains of *Erwinia rhapontici*, causal agent of pink seed of pulse and cereal crops // Botanical Studies. 2007. Vol. 48. No. 2. P. 181–186.

8. Kahala M., Blasco L., Joutsjoki V. Molecular characterization of spoilage bacteria as a means to observe the microbiological quality of carrot // Journal of Food Protection. 2012. Vol. 75. No. 3. P. 523–532. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-185.

9. Kotan R., Sahin F., Ala A. Identification and pathogenicity of bacteria isolated from pome fruit trees in the Eastern Anatolia region of Turkey // Journal of Plant Diseases and Protection. 2006. Vol. 113. No. 1. P. 8–13.

10. Muvingi M., Slovareva O.Y., Yaremko A.B.,

Genebank project). Given that alignment of this sequence in NCBI Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) does not allow us to establish maximum similarity specifically to *E. rhapontici*, as the *gyrB* gene sequence used is conserved with another species, *E. persicina*, the report in the NARO Genebank project cannot be considered reliable until additional information is obtained. Thus, our study is the first confirmation that *E. rhapontici* can be isolated from common barley (Hordeum vulgare L.).

The work was carried out within the framework of a state assignment, registration number EGISU R&D 124022800050-6.

REFERENCES

1. Belkin D.L., Bondarenko G.N., Yaremko A.B., Uvarova D.A. Sequencing method in species identification of quarantine pests [Metod sekvenirovaniya v vidovoy identifikatsii karantinnykh vrednykh organizmov] // Plant Health. Research and Practice. 2019; 28 (2): 31–34.

2. Mazurin E.S., Kopina M.B., Sherokolava N.A. Control of the reliability of the results of phytosanitary examination using molecular diagnostic methods [Kontrol dostovernosti rezultatov fitosanitarnoy ekspertizy pri ispolzovanii molekulyarnykh metodov diagnostiki] // Bulletin of RUDN. Series: Agronomy and Animal Husbandry. 2012; 3: 31–37. (In Russ.)

3. Nikitinsky D.A., Nikitinskaya E.V. Molecular genetic methods used for detection of quarantine objects. Innovations, challenges and prospects. Plant Health and Quarantine. 2025; (3): 85–107. https://doi.org/10.69536/FKR.2025.67.86.006.

4. Dutrecq A., Debras P., Stevaux J., Klaessens D. Estimation of bacterial flora on scalded wheat heads // Parasitica. 1990. T. 2-3. No. 46. P. 69–84.

5. Gehring I., Geider K. Identification of *Erwinia* species isolated from apples and pears by differential PCR. // Journal of Microbiological Methods. 2012. Vol. 89. No. 1. P. 57-62. doi: 10.1016/j.mimet.2012.01.018.

6. Genebank project, NARO. Details of microorganism genetic resources. Details of MAFF 150529. URL: https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_search_detail_en.php?maff=150529.

7. Huang H. C., Erickson R. S., Hsieh T. F. Lack of host specificity of strains of *Erwinia rhapontici*, causal agent of pink seed of pulse and cereal crops // Botanical Studies. 2007. Vol. 48. No. 2. P. 181–186.

8. Kahala M., Blasco L., Joutsjoki V. Molecular characterization of spoilage bacteria as a means to observe the microbiological quality of carrot // Journal of Food Protection. 2012. Vol. 75. No. 3. P. 523-532. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-185.

9. Kotan R., Sahin F., Ala A. Identification and pathogenicity of bacteria isolated from pome fruit trees in the Eastern Anatolia region of Turkey // Journal of Plant Diseases and Protection. 2006. Vol. 113. No. 1. P. 8–13.

Zargar M., Lyashko, M., Pakina E., Vvedenskiy V. Variations of the Bacterial Community in Wheat (*Triticum aestivum*), Oats (*Avena sativa* L.), Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Triticale (*Triticosecale*) from Three Regions of the Republic of Crimea // Preprints. 2023. doi: 10.20944/preprints202307.1559.v1.

11. Naas T., Aubert D., Vimont S., Nordmann P. Identification of a chromosome-borne class C beta-lactamase from *Erwinia rhapontici* // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2004. Vol. 54. No. 5. P. 932–935. doi: 10.1093/jac/dkh446.

12. Ramírez-Rojas S., Osuna-Canizalez F.J., García-Pérez F., Canul-Ku J., Palacios-Talavera A., Hernández-Romano J., Ornelas-Ocampo K., Landa-Salgado P. Molecular identification of bacteria associated to ornamental plants obtained in vitro // Revista Mexicana de Fitopatología. 2016. Vol. 34. No. 2. P. 173–183. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1511-3.

13. Reasoner D.J., Geldreich E.E., 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Applied and Environmental Microbiology. 1985. Vol. 49. No. 1. P. 1–7. doi: 10.1128/aem.49.1.1-7.1985.

14. Schober I., Koblitz J., Carbasse J.S., Ebeling C., Schmidt M.L., Podstawka A., Gupta R., Ilangovan V., Chamanara J., Overmann J., Reimer L.C., Bac*Dive* in 2025: the core database for prokaryotic strain data, Nucleic Acids Research, 2025. Vol. 53. Issue D1. P. D748–D756. doi: 10.1093/nar/gkae959.

15. Thapa S. P. Cho S. Y., Hur J. H., Lim C. K. Phenotypic and genetic characterization of *Erwinia rhapontici* isolated from diseased Asian pear fruit trees // Phytoparasitica. 2012. Vol. 40. No. 5. P. 507-514. doi: 10.1007/s12600-012-0251-3.

16. Tharreau D., Gaignard J. L., Luisetti J., Gibbon C. B. Presence d'une microflore bacterienne abondante et variee a la surface de trois plantes aromatiques et medicinales. Herba Gallica., 1992. No. 2. 79–89.

17. Tsuji M., Kadota I., Takikawa Y. Genetic and phenotypic characterization of bacterial strains isolated in Japan that resemble *Erwinia rhapontici* and *E. persicinus* // Journal of General Plant Pathoogy. 2020. Vol. 86. No. 1. P. 24–33. doi: 10.1007/s10327-019-00873-7.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Словарева Ольга Юрьевна, старший научный сотрудник – начальник научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия; доцент базовой кафедры фитосанитарной биологии и безопасности экосистем института экологии, РУДН, г. Москва, Россия;
ORCID 0000-0001-6022-5955,
e-mail: slovareva.olga@gmail.com

Авдеев Иван Сергеевич, младший научный сотрудник научно-методического отдела бактериологии, ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия; студент института экологии, РУДН, г. Москва, Россия;
ORCID 0009-0006-9266-7073,
e-mail: avdeevfey@mail.ru

10. Muvingi M., Slovareva O.Y., Yaremko A.B., Zargar M., Lyashko, M., Pakina E., Vvedenskiy V. Variations of the Bacterial Community in Wheat (*Triticum aestivum*), Oats (*Avena sativa* L.), Barley (*Hordeum vulgare* L.) and Triticale (*Triticosecale*) from Three Regions of the Republic of Crimea // Preprints. 2023. doi: 10.20944/preprints202307.1559.v1.

11. Naas T., Aubert D., Vimont S., Nordmann P. Identification of a chromosome-borne class C beta-lactamase from *Erwinia rhapontici* // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2004. Vol. 54. No. 5. P. 932–935. doi: 10.1093/jac/dkh446.

12. Ramírez-Rojas S., Osuna-Canizalez F.J., García-Pérez F., Canul-Ku J., Palacios-Talavera A., Hernández-Romano J., Ornelas-Ocampo K., Landa-Salgado P. Molecular identification of bacteria associated to ornamental plants obtained in vitro // Revista Mexicana de Fitopatología. 2016. Vol. 34. No. 2. P. 173–183. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1511-3.

13. Reasoner D.J., Geldreich E.E., 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Applied and Environmental Microbiology. 1985. Vol. 49. No. 1. P. 1–7. doi: 10.1128/aem.49.1.1-7.1985.

14. Schober I., Koblitz J., Carbasse J.S., Ebeling C., Schmidt M.L., Podstawka A., Gupta R., Ilangovan V., Chamanara J., Overmann J., Reimer L.C., Bac*Dive* in 2025: the core database for prokaryotic strain data, Nucleic Acids Research, 2025. Vol. 53. Issue D1. P. D748–D756. doi: 10.1093/nar/gkae959.

15. Thapa S. P. Cho S. Y., Hur J. H., Lim C. K. Phenotypic and genetic characterization of *Erwinia rhapontici* isolated from diseased Asian pear fruit trees // Phytoparasitica. 2012. Vol. 40. No. 5. P. 507-514. doi: 10.1007/s12600-012-0251-3.

16. Tharreau D., Gaignard J. L., Luisetti J., Gibbon C. B. Presence d'une microflore bacterienne abondante et variee a la surface de trois plantes aromatiques et medicinales. Herba Gallica., 1992. No. 2. 79–89.

17. Tsuji M., Kadota I., Takikawa Y. Genetic and phenotypic characterization of bacterial strains isolated in Japan that resemble *Erwinia rhapontici* and *E. persicinus* // Journal of General Plant Pathoogy. 2020. Vol. 86. No. 1. P. 24–33. doi: 10.1007/s10327-019-00873-7.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Olga Slovareva, Senior Researcher – Head of Research and Methodology Department of Bacteriology, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; Associate Professor of the Basic Department of Phytosanitary Biology and Ecosystem Safety, Institute of Ecology, RUDN University, Moscow, Russia;
ORCID 0000-0001-6022-5955,
e-mail: slovareva.olga@gmail.com

Ivan Avdeev, Junior Researcher, Research and Methodology Department of Bacteriology, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; student at the Institute of Ecology, RUDN University, Moscow, Russia;
ORCID 0009-0006-9266-7073,
e-mail: avdeevfey@mail.ru

Яремко Анастасия Богдановна, младший научный сотрудник центра коллективного пользования «Молекулярная генетика», ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID 0000-0003-3295-8080,
e-mail: an_ya94@mail.ru

Панченко Ксения Владимировна, младший научный сотрудник научно-методического отдела бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID 0009-0007-1308-8645,
e-mail: ksushik96@mail.ru

Anastasia Yaremko, Junior Researcher, Center for Collective Use "Molecular Genetics", FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID 0000-0003-3295-8080,
e-mail: an_ya94@mail.ru

Ksenia Panchenko, Junior Researcher, Research and Methodology Department of Bacteriology, FGBU “VNIIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID 0009-0007-1308-8645,
e-mail: ksushik96@mail.ru

СТЕРИЛИЗАЦИЯ

DOI 10.69536/FKR.2025.29.63.006
УДК 631.53.011.4

Поверхностная стерилизация семян подсолнечника в лабораторных условиях

*** Смирнова А.В.[1], Кузнецова А.А.[2], Сурина Т.А.[3], Костин Н.К.[4]**

[1, 2, 3, 4] **ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия, 140150**

[1] ***ORCID: 0009-0001-4827-1980, e-mail: anna.smirnova2328@yandex.ru***
[2] ***ORCID: 0000-0001-8443-2641, e-mail: kyyznec@bk.ru***
[3] ***ORCID: 0000-0002-0463-5762, e-mail: t.a.surina@yandex.ru***
[4] ***ORCID: 0009-0003-8066-0753, e-mail: kostinwork1@gmail.com***

АННОТАЦИЯ

Поверхностная стерилизация семян подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) является сложной задачей из-за особенностей их морфологии. Шероховатая и пористая поверхность семян способствует адгезии микроорганизмов, что значительно затрудняет процесс обеззараживания. В данной работе проведена комплексная оценка эффективности различных химических агентов, применяемых для поверхностной стерилизации: этанола (C_2H_6O), перекиси водорода (H_2O_2), перманганата калия ($KMnO_4$), гипохлорита натрия (NaClO), нитрата серебра ($AgNO_3$), а также их комбинаций. Результаты показали, что большинство испытанных веществ, включая этанол (70–96%), перекись водорода (1–3%), перманганат калия (0,5–1%) и гипохлорит натрия (1–15%), не обеспечивают полной стерильности семян, независимо от концентрации и времени экспозиции.

STERILIZATION

DOI 10.69536/FKR.2025.29.63.006
UDC 631.53.011.4

Surface sterilization of sunflower seeds in laboratory conditions

***Anna V. Smirnova[1]., Anna A. Kuznetsova[2], Tatiana A. Surina[3], Nikita K. Kostin[4]**

[1, 2, 3, 4] **All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU “VNIIKR”), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia, 140150**

[1] ***ORCID: 0009-0001-4827-1980, e-mail: anna.smirnova2328@yandex.ru***
[2] ***ORCID: 0000-0001-8443-2641, e-mail: kyyznec@bk.ru***
[3] ***ORCID: 0000-0002-0463-5762, e-mail: t.a.surina@yandex.ru***
[4] ***ORCID: 0009-0003-8066-0753, e-mail: kostinwork1@gmail.com***

ABSTRACT

Surface sterilization of sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) is challenging due to their morphological characteristics. The rough and porous surface of the seeds promotes microbial adhesion, significantly complicating the disinfection process. This study comprehensively evaluates the effectiveness of various chemical agents used for surface sterilization: ethanol (C_2H_6O), hydrogen peroxide (H_2O_2), potassium permanganate ($KMnO_4$), sodium

Наибольшую эффективность в устранении поверхностной контаминации продемонстрировал нитрат серебра. При концентрациях 1–5% и времени обработки 7–15 минут данный агент полностью подавлял рост микроорганизмов, не вызывая при этом значительного снижения жизнеспособности семян. Однако в некоторых вариантах опыта наблюдалось частичное повреждение корневой системы проростков, что указывает на необходимость точного подбора параметров стерилизации.

Исследование подтверждает, что для семян подсолнечника требуется индивидуальный подход при разработке протоколов стерилизации, учитывающий баланс между эффективностью обеззараживания и сохранением физиологических характеристик семян. Полученные данные представляют практическую ценность для фитопатологических, микробиологических и биотехнологических исследований, где необходим стерильный растительный материал. Результаты работы могут быть использованы для оптимизации методов предпосевной обработки семян в лабораторных и производственных условиях, а также при разработке новых способов обеззараживания семян с высокой микробной обсемененностью.

Ключевые слова. Предпосевная обработка, химические дезинфектанты, эндопатогены, поверхностная стерилизация, семена подсолнечника, микробная контаминация, *Helianthus annuus*.

ВВЕДЕНИЕ

Поверхностная стерилизация семян является ключевым этапом фитопатологических и микробиологических исследований, направленных на изучение эндогенных патогенов и карантинных объектов (Munkvold, 2009). Поскольку она позволяет дифференцировать эндопатогены от поверхностной бактериально-грибной микробиоты, что особенно значимо при анализе латентно зараженных семян. Однако эффективность стерилизации во многом определяется морфологическими особенностями семян, такими как текстура поверхности, наличием пор и кутикулы (Ding et al., 2013). В частности, семена подсолнечника (*Helianthus annuus* L.) обладают шероховатой и пористой поверхностью, что способствует адгезии микроорганизмов и затрудняет их полное удаление при использовании общепринятых протоколов, например кратковременной обработки этанолом (Inpitak et al., 2021).

Основная задача при разработке метода поверхностной стерилизации заключается в подборе доступных и воспроизводимых методов, которые обеспечивали бы полное устранение поверхностной контаминации без повреждения внутренних тканей семян и без значительного снижения их жизнеспособности (Sikin et al., 2013). Высокая всхожесть после обработки служит не только индикатором сохранности эндогенной

hypochlorite (NaClO), silver nitrate ($AgNO_3$), and their combinations. The results showed that most of the tested substances, including ethanol (70–96%), hydrogen peroxide (1–3%), potassium permanganate (0.5–1%), and sodium hypochlorite (1–15%), do not ensure complete seed sterility, regardless of concentration and exposure time. Silver nitrate demonstrated the greatest effectiveness in eliminating surface contamination. At concentrations of 1–5% and a treatment time of 7–15 minutes, this agent completely inhibited microbial growth without significantly reducing seed viability. However, in some experimental variants, partial damage to the seedling root system was observed, indicating the need for precise sterilization parameters.

This study confirms that sunflower seeds require an individualized approach when developing sterilization protocols, balancing disinfection effectiveness with the preservation of the physiological characteristics of the seeds. The obtained data are of practical value for phytopathological, microbiological, and biotechnological research requiring sterile plant material. The results of this study can be used to optimize pre-sowing seed treatment methods in laboratory and industrial settings, as well as to develop new methods for disinfecting seeds with high microbial loads.

Key words: pre-sowing treatment, chemical disinfectants, endopathogens, surface sterilization, sunflower seeds, microbial contamination, *Helianthus annuus*.

INTRODUCTION

Surface sterilization of seeds is a key step in phytopathological and microbiological studies aimed at studying endogenous pathogens and quarantine objects (Munkvold, 2009). It allows for the differentiation of endopathogens from surface bacterial and fungal microbiota, which is especially important when analyzing latently infected seeds. However, the sterilization effectiveness is largely determined by the morphological features of the seeds, such as surface texture, the presence of pores, and the cuticle (Ding et al., 2013). In particular, sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) have a rough and porous surface, which promotes microbial adhesion and complicates their complete removal using generally accepted protocols, such as short-term ethanol treatment (Inpitak et al., 2021).).

The primary task in developing a surface sterilization method is to identify accessible and reproducible methods that would ensure complete removal of surface contamination without damaging the internal tissues of the seeds or significantly reducing their viability (Sikin et al., 2013). High germination after treatment not only serves as an indicator of the persistence of endogenous infection инфекции, но и особенно важна для последующих экспериментов, включающих проращивание семян в контролируемых условиях (OGM24-05 ISTA, 2024).

Несмотря на существующие исследования, посвященные протравливанию семян подсолнечника (Богданова и др., 2021; Inpitak et al., 2021), до сих пор не разработано универсального метода, гарантирующего 100% стерильность поверхности без существенного угнетения прорастания. В связи с этим актуальным остается поиск оптимизированных протоколов дезинфекции, обеспечивающих баланс между эффективностью обеззараживания и сохранностью жизнеспособности семян.

Химические методы стерилизации представляют собой наиболее доступный вариант для большинства лабораторий, поскольку не требуют специализированного оборудования.

Согласно обзорным исследованиям в области обеззараживания семян (Ding et al., 2013; Sikin et al., 2013), одним из эталонных подходов является обработка семян 2% раствором гипохлорита кальция в течение 10–15 мин, что приводит к снижению микробной нагрузки на 3,08 log КОЕ/г при сохранении 90% всхожести. Однако данный метод не обеспечивает полной элиминации микроорганизмов, что ограничивает его применение в исследованиях, требующих абсолютной стерильности.

Этанол (C_2H_6O) широко применяется для поверхностной дезинфекции (Кузнецова, 2025). Например, экспозиция в 80% этаноле в течение 10 мин значительно снизила контаминацию семян люцерны (*Medicago sativa* L.), но не обеспечила полной стерильности (Beuchat, 1997). Аналогично обработка семян риса 70% этанолом в течение 10 мин привела к частичному подавлению микробиоты, однако также снизила всхожесть (Piernas, 1997). В методических рекомендациях ВНИИКР (например, МР 136–2017, МР 96–2017) предлагается кратковременная (1,5–5 мин) обработка 70% этанолом для дезинфекции семян кукурузы и сои, что полностью обеззараживает поверхность и практически не снижает всхожесть семян.

Перекись водорода (H_2O_2) также является распространенным средством дезинфекции. Так, 3% раствор в течение 30 мин обеспечил полную дезинфекцию семян капусты огородной (*Brassica oleracea* L.) (Sanna, 2022), тогда как менее концентрированные растворы (1%, 10 мин) на семенах риса (*Oryza sativa* L.) (Piernas, 1997) и более длительная экспозиция (3%, 7 ч) на семенах ячменя (*Hordeum vulgare* L.) (Munkager, 2020) привели лишь к значительному снижению, но не полной ликвидации контаминации. Аналогично обработка 8% H_2O_2 в течение 10 мин уменьшила микробную нагрузку на семенах люцерны (*Medicago sativa*) (Holliday, 2001). В то же время в другом исследовании 6% раствор в течение 10 мин не показал значимого эффекта на семенах люцерны (Beuchat, 1997). Также стоит отметить, что перекись водорода способна стимулировать прорастание (Holliday, 2001), что делает ее перспективным компонентом комбинированных протоколов, особенно в сочетании с агентами, оказывающими угнетающее действие на всхожесть.

but is also particularly important for subsequent experiments involving seed germination under controlled conditions (OGM24-05 ISTA, 2024).

Despite existing research on sunflower seed treatment (Bogdanova et al., 2021; Inpitak et al., 2021), a universal method guaranteeing 100% surface sterility without significantly inhibiting germination has yet to be developed. Therefore, the search for optimized disinfection protocols that balance disinfection effectiveness and seed viability remains relevant.

Chemical sterilization methods are the most affordable option for most laboratories as they do not require specialized equipment.

According to review studies in the field of seed disinfection (Ding et al., 2013; Sikin et al., 2013), one of the reference approaches is seed treatment with a 2% calcium hypochlorite solution for 10–15 minutes, which leads to a reduction in microbial load by 3.08 log CFU/g while maintaining 90% germination. However, this method does not ensure complete elimination of microorganisms, which limits its use in studies requiring absolute sterility.

Ethanol (C_2H_6O) is widely used for surface disinfection (Kuznetsova, 2025). For example, exposure to 80% ethanol for 10 minutes significantly reduced contamination of alfalfa (*Medicago sativa* L.) seeds, but did not ensure complete sterility (Beuchat, 1997). Similarly, treatment of rice seeds with 70% ethanol for 10 minutes resulted in partial suppression of microbiota, but also reduced germination (Piernas, 1997). The VNIIKR methodological recommendations (e.g., MR 136-2017, MR 96-2017) suggest short-term (1.5–5 minutes) treatment with 70% ethanol for disinfection of corn and soybean seeds, which completely disinfects the surface and has virtually no effect on seed germination.

Hydrogen peroxide (H_2O_2) is also a common disinfectant. For example, a 3% solution for 30 minutes ensured complete disinfection of cabbage (*Brassica oleracea* L.) seeds (Sanna, 2022), whereas less concentrated solutions (1%, 10 min) on rice (*Oryza sativa* L.) seeds (Piernas, 1997) and longer exposure (3%, 7 h) on barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds (Munkager, 2020) resulted only in a significant reduction, but not complete elimination, of contamination. Similarly, treatment with 8% H_2O_2 for 10 minutes reduced the microbial load on alfalfa (*Medicago sativa*) seeds (Holliday, 2001). Meanwhile, in another study, a 6% solution applied for 10 minutes showed no significant effect on alfalfa seeds (Beuchat, 1997). It is also worth noting that hydrogen peroxide can stimulate germination (Holliday, 2001), making it a promising component of combination protocols, especially when combined with agents that inhibit germination.

Calcium hypochlorite ($Ca(ClO)_2$) and sodium hypochlorite (NaClO) also serve as sterilizing agents, Гипохлориты кальция ($Ca(ClO)_2$) и натрия ($NaClO$) тоже служат стерилизующими веществами, но также не гарантируют полного обеззараживания. Например, 1,8–3% гипохлориты кальция и натрия в течение 10 мин сократили популяцию рода *Salmonella.* на семенах люцерны в 1000 раз (Beuchat, 1997). А 3% раствор гипохлорита натрия уменьшил поверхностное заражение семян ячменя (Munkager, 2020). Эти вещества могут оказывать незначительное снижение всхожести при высоких концентрациях.

Нитрат серебра ($AgNO_3$) в концентрации 0,5–10% показал высокую эффективность против грибной и бактериальной микробиоты, обеспечив стерильность семян ячменя около 98% (начиная с концентрации 3% и выше), однако при высоких концентрациях негативно влиял на всхожесть (Munkager, 2020).

Комбинированные методы, включающие последовательную обработку разными агентами, демонстрируют более высокую эффективность. Например, сочетание 5% молочной кислоты (или уксусной) 10 мин и 2% гипохлорита кальция 15 мин значительно снизило контаминацию семян люцерны (Lang et al., 2000), а комбинация нитрата серебра (0,5–10%) с 3% перекисью водорода или 3% гипохлоритом натрия позволила достичь высокой степени стерильности семян ячменя (Munkager, 2020).

Целью данного исследования является оценка эффективности химических средств и их комбинаций для поверхностной стерилизации семян подсолнечника с последующим определением оптимального протокола, обеспечивающего максимальную дезинфекцию без значительного снижения жизнеспособности семян.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено в 2025 г. на базе ФГБУ «ВНИИКР» с использованием семян подсолнечника сорта ВНИИМК-8883 (урожай 2024 г., Краснодарский край).

Семена подсолнечника поверхностно стерилизовали различными химическими агентами: этанолом (C_2H_6O), перекисью водорода (H_2O_2), перманганатом калия ($KMnO_4$), гипохлоритом натрия ($NaClO$), нитратом серебра ($AgNO_3$) и их комбинациями.

Для каждого варианта опыта отбирали 30 семян. Их промывали проточной водой в течение 15 мин и стерилизовали в 40 мл обеззараживающего раствора согласно варианту опыта (см. ниже). Затем промывали три раза стерильной дистиллированной водой, подсушивали на фильтровальной бумаге и раскладывали в чашки Петри с 2% средой КГА по 10 семян в каждую чашку.

Варианты, включающие в себя нитрат серебра, имели дополнительный этап промывки. После стерилизации раствором и перед трехразовой промывкой стерильной водой их промывали один раз 1% NaCl.

Варианты опыта:

Контроль:

Семена не обрабатывались стерилизующими растворами, а только промывались согласно инструкции выше.

but they do not guarantee complete disinfection. For example, 1.8–3% calcium and sodium hypochlorite reduced the *Salmonella* genus population on alfalfa seeds by 1,000 times within 10 minutes (Beuchat, 1997). A 3% sodium hypochlorite solution reduced surface contamination of barley seeds (Munkager, 2020). These substances may slightly reduce germination at high concentrations.

Silver nitrate ($AgNO_3$) at a concentration of 0.5–10% showed high efficacy against fungal and bacterial microbiota, ensuring barley seed sterility of about 98% (starting from a concentration of 3% and above), but at high concentrations it negatively affected germination (Munkager, 2020).

Combination methods involving sequential treatment with different agents demonstrate higher efficiency. For example, a combination of 5% lactic acid (or acetic acid) for 10 min and 2% calcium hypochlorite for 15 min significantly reduced contamination of alfalfa seeds (Lang et al., 2000), and a combination of silver nitrate (0.5-10%) with 3% hydrogen peroxide or 3% sodium hypochlorite achieved a high degree of sterility in barley seeds (Munkager, 2020).

The aim of this study is to evaluate the effectiveness of chemicals and their combinations for surface sterilization of sunflower seeds and then determine the optimal protocol that provides maximum disinfection without significantly reducing seed viability.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted in 2025 at FGBU "VNIIKR" using sunflower seeds of the VNIIMK 8883 variety (harvest 2024, Krasnodar Krai).

Sunflower seeds were surface sterilized with various chemical agents: ethanol (C_2H_6O), hydrogen peroxide (H_2O_2), potassium permanganate ($KMnO_4$), sodium hypochlorite ($NaClO$), silver nitrate (AgNO3) and their combinations.

For each experimental variant, 30 seeds were selected. They were rinsed under running water for 15 minutes and sterilized in 40 ml of a disinfectant solution according to the experimental variant (see below). They were then rinsed three times with sterile distilled water, dried on filter paper, and placed in Petri dishes with 2% PDA medium, 10 seeds per dish.

Variants containing silver nitrate had an additional rinsing step. After sterilization with the solution and before rinsing three times with sterile water, they were rinsed once with 1% NaCl.

Experiment options:

Control:

The seeds were not treated with sterilizing solutions, but were only washed according to the instructions above.

Sterilization with ethanol (C_2H_6O):

70% ethanol solution was used for 2, 10, 15 min, 96% - 2, 10, 15 min.

Стерилизация этанолом (C_2H_6O):

Использовали 70% раствор этанола в течение 2, 10, 15 мин, 96% – 2, 10, 15 мин.

Стерилизация перекисью водорода (H_2O_2):

Использовали 1% раствор перекиси водорода в течение 1, 5, 10 мин, 3% – 1, 5, 10 мин, а также 1, 2, 3 и 4 ч.

Стерилизация перманганатом калия ($KMnO_4$):

Использовали 0,5% раствор перманганата калия в течение 5, 10, 15, 20 мин, 1% – 5, 10, 15, 20 мин.

Стерилизация гипохлоритом натрия (NaClO):

Использовали 1% раствор гипохлорита натрия в течение 1, 5, 10, 15 мин, 5% – 1, 5, 10, 15 мин, 10% – 10, 15 мин, 15% – 10, 15 мин, а также 3% в течение 30 мин, 1 и 2 ч.

Стерилизация нитратом серебра ($AgNO_3$):

Использовали 1% раствор нитрата серебра в течение 5, 10, 15 мин, 5% – 5, 10, 15 мин, 2% – 7, 10 мин, 3% – 7, 10 мин.

Комбинированная стерилизация нитратом серебра ($AgNO_3$) и гипохлоритом натрия (NaClO):

Использовали 2% раствор нитрата серебра в течение 5 и 7 мин, а затем 10% раствор гипохлорита натрия в течение 5 и 10 мин. Также применяли 1% раствор нитрата серебра в течение 5 мин, а затем 19% гипохлорит натрия в течение 5 и 10 мин. И 0,5% раствор нитрата серебра в течение 5 мин, затем 19% гипохлорит натрия в течение 5 и 10 мин.

Комбинированная стерилизация нитратом серебра ($AgNO_3$) и перекисью водорода (H_2O_2):

Использовали 1% раствор нитрата серебра в течение 5 мин, а затем 20% перекись водорода в течение 5 и 10 мин. И 0,5% раствор нитрата серебра в течение 5 мин, затем 20% перекись водорода в течение 5 и 10 мин. Настолько высокая концентрация перекиси водорода использована, поскольку низкие ее концентрации не смогли обеззаразить поверхность семян.

Методика учета энергии прорастания и всхожести семян основана на ГОСТ 12038-84 с модификациями: семена помещали в чашки Петри на среду КГА 2%, инкубировали в термостате при температуре 25 °С. На 3-й день определяли энергию прорастания, на 7-й день – всхожесть семян, на 14-й день смотрели на количество зараженных семян и развитие проростков. В каждом варианте опыта было по 30 семян, разложенных на три чашки Петри по 10 шт.

Всхожесть семян – это их способность прорастать в заданные сроки при определенных условиях. Данный показатель рассчитывается как процентное соотношение количества проросших семян к общему числу высеянных.

Энергия прорастания семян – это показатель, отражающий их способность к дружному и быстрому прорастанию. Он определяется как процент семян, проросших за более короткий промежуток времени по сравнению с периодом, установленным для оценки всхожести.

Энергию прорастания, всхожесть и процент контаминированных семян рассчитывали в процентах на основе трех повторностей для каждого варианта опыта. Для оценки достоверности различий вычисляли 95% доверительные интервалы (ДИ) среднего значения, используя t-распределение. Расчеты проводили в среде Microsoft Excel.

Sterilization with hydrogen peroxide (H_2O_2):

A 1% hydrogen peroxide solution was used for 1, 5, 10 minutes, 3% - 1, 5, 10 minutes, and also 1, 2, 3 and 4 hours.

Sterilization with potassium permanganate ($KMnO_4$):

A 0.5% solution of potassium permanganate was used for 5, 10, 15, 20 minutes, 1% - 5, 10, 15, 20 minutes.

Sterilization with sodium hypochlorite (NaClO):

A 1% solution of sodium hypochlorite was used for 1, 5, 10, 15 min, 5% - 1, 5, 10, 15 min, 10% - 10, 15 min, 15% - 10, 15 min, and 3% for 30 min, 1 and 2 hours.

Sterilization with silver nitrate ($AgNO_3$):

A 1% solution of silver nitrate was used for 5, 10, 15 min, 5% - 5, 10, 15 min, 2% - 7, 10 min, 3% - 7, 10 min

Combined sterilization with silver nitrate ($AgNO_3$) and sodium hypochlorite (NaClO):

A 2% silver nitrate solution was used for 5 and 7 minutes, followed by a 10% sodium hypochlorite solution for 5 and 10 minutes. A 1% silver nitrate solution was also used for 5 minutes, followed by 19% sodium hypochlorite for 5 and 10 minutes. A 0.5% silver nitrate solution was also used for 5 minutes, followed by 19% sodium hypochlorite for 5 and 10 minutes.

Combined sterilization with silver nitrate ($AgNO_3$) and hydrogen peroxide (H_2O_2):

A 1% silver nitrate solution was applied for 5 minutes, followed by 20% hydrogen peroxide for 5 and 10 minutes. A 0.5% silver nitrate solution was applied for 5 minutes, followed by 20% hydrogen peroxide for 5 and 10 minutes. This high concentration of hydrogen peroxide was used because lower concentrations were unable to disinfect the seed surface.

The method for measuring seed germinative energy and viability is based on GOST 12038-84 with modifications: seeds were placed in Petri dishes on a 2% PDA medium and incubated in a thermostat at 25°C. Germinative energy was determined on day 3, seed germination on day 7, and the number of infected seeds and seedling development were assessed on day 14. Each experimental setup included 30 seeds, distributed among 3 Petri dishes with 10 seeds each.

Seed germination is the ability of seeds to germinate within a specified timeframe under given conditions. This indicator is calculated as the percentage of germinated seeds relative to the total number sown.

Seed germinative energy is an indicator of a seed's ability to germinate rapidly and uniformly. It is defined as the percentage of seeds that germinate within a shorter period of time than the period established for evaluating germination.

Germinative energy, germination rate, and percentage of contaminated seeds were calculated as percentages based on three replicates for each experimental treatment. To assess the significance of

Доверительный интервал – это диапазон значений, в который с определенной вероятностью (уровнем доверия) попадает истинное значение параметра генеральной совокупности.

Поправка на t-распределение использована, поскольку число повторностей в опыте было небольшим.

Идентификация грибов, выделенных с поверхности семян, проведена методом микроскопирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования показали, что большинство стерилизующих веществ не способны полностью обеззаразить поверхность семян независимо от концентрации и времени экспозиции. С поверхности семян выделены грибы родов *Mucor, Penicillium* и *Aspergillus* (микроскопическая идентификация). Бактериальная контаминация не обнаружена.

Этанол

При обработке 70% этанолом на 14-е сутки доля контаминированных семян составила 100% (ДИ: 100–100%) при различной длительности экспозиции. Всхожесть достигала 100% при экспозиции 2 мин (ДИ: 98–101%), 93% при 10 мин (ДИ: 88–98%), снижаясь до 77% при 15 мин (ДИ: 68–81%). Энергия прорастания оставалась высокой, для 2 мин – 87% (ДИ: 83–91%), для 10 мин 37% (ДИ: 32–42%), за исключением экспозиции 15 мин – 3% (ДИ: -2–9%).

Применение 96% этанола сопровождалось контаминацией 77–100% семян к 14-му дню; при 2- и 10-минутной экспозиции – 100% (ДИ: 100–100%), при 15-минутной – 77% (ДИ: 64–74%). Всхожесть варьировала: 100% (ДИ: 95–103%) для 2 мин экспозиции, 83% (ДИ:76–89%) для 3 мин, снижаясь до 43% (ДИ: 37–50%) при экспозиции 15 мин. Энергия прорастания сохранялась на высоком уровне только при обработке 2 мин – 87% (ДИ: 80–94%).

При концентрации 96 и 70% и временем экспозиции 10 мин и дольше наблюдаются участки корешка с усыханием, что говорит о его повреждении спиртом.

Этанол не подходит для стерилизации семян подсолнечника, поскольку в используемых вариантах не обеспечивает достаточно высокий уровень стерилизации, а при повышении времени экспозиции всхожесть семян продолжит уменьшаться.

Перекись водорода

При экспозициях от 1 до 10 мин энергия прорастания и всхожесть оставались высокими. Однако наблюдалась 100% (ДИ:100–100%) контаминация семян.

При увеличении времени обработки до 1–4 ч количество инфицированных семян по-прежнему оставалось 100% (ДИ: 100–100%). Всхожесть при экспозиции 1 ч – 97% (ДИ: 94–102%), 2 ч – 100% (ДИ: 98–101%), 3 ч – 100% (ДИ: 100–100%), 4 ч – 97% (ДИ: 95–100%). Энергия прорастания: 1 ч – 93% (ДИ: 91–96%), 2 ч – 100% (ДИ: 97–102%), 3 ч – 100% (ДИ: 98–101%), 4 ч – 90% (ДИ: 86–94%).

Перекись водорода неэффективна для стерилизации семян подсолнечника. Однако она

differences, 95% confidence intervals (CI) of the mean values were calculated using the t-distribution. Calculations were performed in Microsoft Excel.

A confidence interval is a range of values within which, with a given probability (confidence level), the true value of a population parameter falls.

A t-distribution correction was used because the number of replicates in the experiment was small.

Identification of fungi isolated from the seed surface was performed using microscopy.

RESULTS AND DISCUSSION

The study results showed that most sterilizing agents are unable to completely disinfect the seed surface, regardless of concentration and exposure time. Fungi of the genera *Mucor*, *Penicillium*, and *Aspergillus* were isolated from the seed surface (microscopic identification). Bacterial contamination was not detected.

Ethanol

When treated with 70% ethanol, on the 14th day, the proportion of contaminated seeds was 100% (CI: 100-100%) at different exposure times. Germination reached 100% with an exposure of 2 minutes (CI: 98-101%), 93% at 10 minutes (CI: 88-98%), decreasing to 77% at 15 minutes (CI: 68-81%). Germination energy remained high, for 2 minutes - 87% (CI: 83-91%), for 10 minutes 37% (CI: 32-42%), with the exception of 15 minutes of exposure - 3% (CI: -2-9%).

Application of 96% ethanol resulted in contamination of 77-100% of seeds by day 14; 100% (CI: 100-100%) with 2 and 10-minute exposures, and 77% (CI: 64-74%) with 15-minute exposure. Germination varied: 100% (CI: 95-103%) for 2 minutes of exposure, 83% (CI: 76-89%) for 3 minutes, decreasing to 43% (CI: 37-50%) with 15 minutes of exposure. Germination energy remained at a high level only with 2-minute treatment - 87% (CI: 80-94%).

At a concentration of 96% and 70% and an exposure time of 10 minutes or longer, areas of the spine with drying are observed, which indicates damage by alcohol.

Ethanol is not suitable for sterilizing sunflower seeds, since in the variants used it does not provide a sufficiently high level of sterilization, and with an increase in exposure time, seed germination will continue to decrease.

Hydrogen peroxide

With exposures from 1 to 10 minutes, germination energy and viability remained high. However, 100% (CI: 100-100%) seed contamination was observed.

When the treatment time was increased to 1-4 hours, the number of infected seeds still remained 100% (CI: 100-100%). Germination at 1 hour exposure was 97% (CI: 94-102%), 2 hours - 100% (CI: 98-101%), 3 hours - 100% (CI: 100-100%), 4 hours - 97% (CI: 95-

обладает эффектом, стимулирующим всхожесть, поэтому будет использована в комбинированных вариантах стерилизации.

Перманганат калия

Семена всех вариантов опыта были полностью контаминированы уже на 3-е сутки. Наименьшая всхожесть и энергия прорастания были при времени экспозиции 20 мин, при 0,5% концентрации – 63% (ДИ: 60–70%) и 63% (ДИ: 60–69%), при 1% концентрации – 67% (ДИ: 62–69%) и 67% (ДИ: 60–70%) соответственно.

Перманганат калия не подходит для стерилизации семян подсолнечника.

Гипохлорит натрия

Во всех экспозициях при концентрации 1 и 5% контаминация семян на 14-е сутки составила 100% (ДИ: 100–100%). При концентрации 10% – 97% контаминация (ДИ для 10 мин: 93–103%, ДИ для 10 мин: 91–102%), при концентрации 15% – 100% контаминация для 10 мин экспозиции (ДИ: 100–100%), для 15 минут – 93% (ДИ: 92–100%). Однако семена зарастали не так быстро, как в предыдущих вариантах. К тому же всхожесть (93%; ДИ: 90–97%) и энергия прорастания (90%; ДИ: 86–94%) оставались высокими даже при 15% концентрации в течение 15 мин.

Вариант с более длительной экспозицией 3% (от 30 мин до 2 ч) также оказался неэффективным. На 14-е сутки зараженные семена составили 100% (ДИ: 100–100%) для всех вариантов. Всхожесть и энергия прорастания по-прежнему остались высокими.

Гипохлорит натрия не эффективен для стерилизации семян, однако способен частично подавлять контаминацию на 3–7-й день, при этом практически не снижает всхожесть. Поэтому он будет использован в комбинированных вариантах стерилизации.

Нитрат серебра

Во многих вариантах нитрат серебра смог полностью устранить поверхностную инфекцию. Например, 1% 15 мин; 2% 7, 10 мин; 3% 7, 10 мин; 5% 10, 15 мин (см. табл. 1 и 2). Наилучшая всхожесть – 93% (ДИ: 93–100%) и энергия прорастания 76% (ДИ: 69–84%) – из вариантов опыта, позволивших полностью обеззаразить поверхность, наблюдались в варианте 1% концентрации с экспозицией 15 мин. При повышении концентрации 2–5% всхожесть и энергия прорастания значительно снижались. Однако во всех перечисленных вариантах корни частично темнели и усыхали вследствие воздействия стерилизующего вещества. Поэтому дальнейшие варианты опыта будут комбинированными, чтобы уменьшить вредоносное воздействие нитрата серебра, сохранив полное обеззараживание семян.

В табл. 1 и 2 указаны доверительные интервалы для значений энергии прорастания (3-й контрольный день), всхожести (7-й день), процента контаминации (14-й день) для каждого варианта опыта.

Нитрат серебра и гипохлорит натрия

Лучший результат показали варианты с нитратом серебра 1% 5 мин и гипохлоритом натрия 19% 10 мин. Однако они не обеспечили полную стерильность семян: процент зараженных семян на 14-е сутки составил 27% (ДИ:

100%). Germination energy: 1 hour - 93% (CI: 91-96%), 2 hours - 100% (CI: 97-102%), 3 hours - 100% (CI: 98-101%), 4 hours - 90% (CI: 86-94%).

Hydrogen peroxide is not effective for sterilizing sunflower seeds. However, it does stimulate germination, so it can be used in combination sterilization methods.

Potassium permanganate

Seeds of all experimental variants were completely contaminated already on the 3rd day. The lowest germination and germination energy were at an exposure time of 20 min, at a 0.5% concentration of 63% (CI: 60-70%) and 63% (CI: 60-69%), at a 1% concentration of 67% (CI: 62-69%) and 67% (CI: 60-70%), respectively.

Potassium permanganate is not suitable for sterilizing sunflower seeds.

Sodium hypochlorite

In all exposures at concentrations of 1 and 5%, seed contamination on the 14th day was 100% (CI: 100-100%). At a concentration of 10% - 97% contamination (CI for 10 min: 93-103%, CI for 10 min: 91-102%), at a concentration of 15% - 100% contamination for 10 minutes of exposure (CI: 100-100%), for 15 minutes - 93% (CI: 92-100%). However, the seeds did not overgrow as quickly as in the previous options. In addition, germination - 93% (CI: 90-97%) and germination energy - 90% (CI: 86-94%) remained high even at a 15% concentration for 15 minutes.

A longer exposure of 3% from 30 minutes to 2 hours also proved ineffective. On the 14th day, the rate of infected seeds was 100% (CI: 100-100%) for all treatments. Germination and germinative energy remained high.

Sodium hypochlorite is not effective for seed sterilization, but it can partially suppress contamination within 3-7 days without significantly reducing germination. Therefore, it will be used in combination sterilization methods.

Silver nitrate

In many variants, silver nitrate was able to completely eliminate surface infection. For example, 1% for 15 minutes, 2% for 7, 10 minutes, 3% for 7, 10 minutes, 5% for 10, 15 minutes (see Tables 1 and 2). The best germination rate of 93% (CI: 93-100%) and germinative energy of 76% (CI: 69-84%), of the experimental variants that allowed complete disinfection of the surface, were observed in the 1% concentration variant with an exposure time of 15 minutes. With an increase in concentration of 2-5%, germination and germinative energy significantly decreased. However, in all of the listed variants, the roots partially darkened and dried out due to the effect of the sterilizing substance. Therefore, further experimental variants will be combined to reduce the harmful effects of silver nitrate while maintaining complete disinfection of the seeds.

Tables 1 and 2 show the confidence intervals (CI) for the values of germinative energy (3rd control day), germination (7th day), and percentage of contamination (14th day) for each experimental variant.

Silver nitrate and sodium hypochlorite:

The best results were shown by the variants with

Табл. 1. Результаты опытов по поверхностному обеззараживанию семян подсолнечника раствором AgNO3 с концентрацией 1 и 5%

Table 1. Results of experiments on surface disinfection of sunflower seeds with a solution of AgNO3 with a concentration of 1 and 5%

$AgNO_3$		**Время экспозиции, мин** Exposure time, min								
		5			10			15		
		Контрольные дни Control days								
Конц. д. в., % Concentration of active ingredient (AI), %	**Показатели, %** Indicators, %	**3д** 3d	**7д** 7d	**14д** 14d	**3д** 3d	**7д** 7d	**14д** 14d	**3д** 3d	**7д** 7d	**14д** 14d
1	**Кол-во зараженных семян** Number of infected seeds	**3**	**100**	**100 ДИ: 100–100** 100 CI: 100–100	**3**	**100**	**100 ДИ: 100–100** 100 CI: 100–100	**0**	**0**	**0 ДИ: 0–0** 0 CI: 0–0
	Кол-во проросших семян Number of germinated seeds	**88 ДИ: 85–92** 88 CI: 85-92	**94 ДИ: 88–102** 94 CI: 88-102	**95**	**82 ДИ: 76–89** 82 CI: 76-89	**94 ДИ: 86–101** 94 CI: 86-101	**94**	**76 ДИ: 69–84** 76 CI: 69-84	**93 ДИ: 89–99** 93 CI: 89-99	**93**
5	**Кол-во зараженных семян** Number of infected seeds	**3**	**50**	**100 ДИ: 100–100** 100 CI: 100-100	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0 ДИ: 0–0** 0 CI: 0-0
	Кол-во проросших семян Number of infected seeds	**46 ДИ: 36–54** 46 CI: 36-54	**50 ДИ: 44–57** 50 CI: 44-57	**51**	**0 ДИ: 0-0** 0 CI: 0-0	**27 ДИ: 21–34** 27 CI: 21-34	**30**	**0 ДИ: 0-0** 0 CI: 0-0	**10 ДИ: 5–15** 10 CI: 5-15	**17**
Отрицательный контроль Negative control	**Кол-во зараженных семян** Number of infected seeds	**100**	**100**	**100 ДИ: 100–100** 100 CI: 100-100	**100**	**100**	**100 ДИ: 100–100** 100 CI: 100-100	**100**	**100**	**100 ДИ:** 100 CI:
	Кол-во проросших семян Number of germinated seeds	**90 ДИ: 87–91** 90 CI: 87-91	**93 ДИ: 86–99** 93 CI: 86-99	**93**	**87 ДИ: 89–91** 87 CI: 89-91	**93 ДИ: 91–99** 93 CI: 91-99	**93**	**87 ДИ: 83–98** 87 CI: 83-98	**90 ДИ: 81–102** 90 CI: 81-102	**93**

23–33%). Всхожесть во всех вариантах оставалась выше 90%, наименьшая энергия прорастания 67% (ДИ: 64–71%) зафиксирована для варианта $AgNO_3$ 1% 5 мин + NaOCl 19% 10 мин, наибольшая – 100% (ДИ: 98–101%) для $AgNO_3$ 0,5% 5 мин + NaOCl 19% 5 мин. Таким образом, при снижении концентрации или времени экспозиции нитрата серебра ниже минимально эффективных схем, установленных в предыдущей части эксперимента, дополнительная обработка высокими концентрациями гипохлорита натрия не справлялась со стерилизацией остаточного заражения. При этом даже при концентрации нитрата серебра 0,5% в течение 7 мин корни имели участки с усыханиями, визуально схожие по размерам с поражениями корней в опытах с большей концентрацией.

Нитрат серебра и перекись водорода

Ни один из вариантов не обеспечил полной стерилизации семян, при этом, так же как и в других опытах, наблюдалось усыхание корня.

Таким образом, раствор нитрата серебра может обеспечить полную поверхностную стерилизацию семян подсолнечника. Однако даже минимальная используемая концентрация (0,5%) и минимальное время экспозиции (5 мин) ведет к усыханию корня. Этот эффект не помешает выделению эндопатогенов семени на питательной среде, однако следует учитывать эту особенность, планируя опыты, включающие в себя последующее проращивание растений. Исходя из проведенной серии опытов, поврежде-

1% silver nitrate for 5 minutes and 19% sodium hypochlorite for minutes. However, they did not ensure complete seed sterility; the percentage of infected seeds on the 14^{th} day was 27% (CI: 23-33%). Germination in all variants remained above 90%, the lowest germinative energy of 67% (CI: 64-71%) was recorded for the variant AgNO3 1% for 5 minutes + NaOCl 19% for 10 minutes, the highest – 100% (CI: 98-101%) for AgNO3 0.5% for 5 minutes + NaOCl 19% for 5 minutes. Thus, when the concentration or exposure time of silver nitrate was reduced below the minimum effective schemes established in the previous part of the experiment, additional treatment with high concentrations of sodium hypochlorite was unable to sterilize residual infestation. Moreover, even with a silver nitrate concentration of 0.5% for 7 minutes, the roots had areas with drying out, visually similar in size to the root lesions in experiments with a higher concentration.

Silver nitrate and hydrogen peroxide

Neither treatment provided complete seed sterilization, and, as in other experiments, root desiccation was observed.

Thus, a silver nitrate solution can provide complete surface sterilization of sunflower seeds. However, even the minimum concentration used (0.5%) and minimum exposure time (5 minutes) led to root desiccation. This effect will not interfere with the

Табл. 2. Результаты опытов по поверхностному обеззараживанию семян подсолнечника раствором AgNO3 с концентрацией 2 и 3%

Table 2. Results of experiments on surface disinfection of sunflower seeds with a solution of AgNO3 with a concentration of 2 and 3%

$AgNO_3$		**Время экспозиции, мин** Exposure time, min					
		5			10		
		Контрольные дни Control days					
Конц. д. в., % Concentration of active ingredient (AI), %	**Показатели, %** Indicators, %	**3д** 3d	**7д** 7d	**14д** 14d	**3д** 3d	**7д** 7d	**14д** 14d
2	**Кол-во зараженных семян** Number of infected seeds	**0**	**0**	**0 ДИ: 0–0** 0 CI: 0-0	**0**	**0**	**0 ДИ: 0–0** 0 CI: 0-0
	Кол-во проросших семян Number of germinated seeds	**30 ДИ: 26–34** 30 CI: 26-34	**63 ДИ: 56–69** 63 CI: 56-69	**77**	**0 ДИ: -3–1** 0 CI: -3-1	**3 ДИ: 0–8** 3 CI: 0-8	**27**
3	**Кол-во зараженных семян** Number of infected seeds	**0**	**0**	**0 ДИ: 0–0** 0 CI: 0-0	**0**	**0**	**0 ДИ: 0–0** 0 CI: 0-0
	Кол-во проросших семян Number of germinated seeds	**17 ДИ: 12–22** 17 CI: 12-22	**40 ДИ: 35–46** 40 CI: 35-46	**53**	**0 ДИ: -3–1** 0 CI: -3-1	**7 ДИ: 1–14** 7 CI: 1-14	**13**
Отрицатель-ный контроль Negative control	**Кол-во зараженных семян** Number of infected seeds	**100**	**100**	**100 ДИ: 100–100** 100 CI: 100-100	**100**	**100**	**100 ДИ: 100–100** 100 CI: 100-100
	Кол-во проросших семян Number of germinated seeds	**93 ДИ: 86-99** 93 CI: 86-99	**97 ДИ: 91–104** 97 CI: 91-104	**97**	**90 ДИ: 81–97** 90 CI: 81-97	**93 ДИ: 85–102** 93 CI: 85-102	**97**

ние корня незначительно мешает развитию проростка в первые две недели.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование продемонстрировало, что методы поверхностной стерилизации семян подсолнечника с использованием этанола, перекиси водорода, перманганата калия и гипохлорита натрия не обеспечивают полного устранения поверхностной контаминации, независимо от концентрации и времени экспозиции. Наиболее эффективным агентом оказался нитрат серебра, который при концентрациях 1–5% и экспозиции 7–15 мин обеспечил полную стерильность семян. Однако его применение сопровождалось частичным повреждением корневой системы, что может ограничивать использование в исследованиях, требующих последующего проращивания.

Полученные результаты указывают на сложность подбора универсального метода стерилизации для семян с пористой и шероховатой поверхностью, таких как семена подсолнечника. Для исследований, требующих абсолютной поверхностной стерильности семян без последующего проращивания, оптимальным решением является применение нитрата серебра. В случае необходимости сохранения высокой жизнеспособности семян предпочтительны схемы с минимально эффективными концентрациями и временем экспозиции. Предложенные схемы,

release of seed endopathogens on the nutrient medium, but it should be taken into account when planning experiments that include subsequent plant germination. Based on the series of experiments conducted, root damage slightly interferes with seedling development during the first two weeks.

CONCLUSION

The study demonstrated that surface sterilization methods for sunflower seeds using ethanol, hydrogen peroxide, potassium permanganate, and sodium hypochlorite do not completely eliminate surface contamination, regardless of concentration and exposure time. Silver nitrate proved to be the most effective agent, ensuring complete seed sterility at concentrations of 1-5% and exposure times of 7-15 minutes. However, its use was accompanied by partial damage to the root system, which may limit its use in studies requiring subsequent germination.

The obtained results indicate the difficulty of selecting a universal sterilization method for seeds with a porous and rough surface, such as sunflower seeds. For studies requiring absolute surface sterility of seeds without subsequent germination, the use of silver nitrate is the optimal solution. When maintaining high seed viability, regimens with minimum несмотря на частичное усыхание корня, также могут быть использованы для опытов с проращиванием семян как минимум в течение двух недель. Однако стоит учитывать то, что они не оптимальны для более длительных экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богданова К.О., Доланбаева Г.Т., Николаева В. Н., Вноровская Е.В. Оптимизация метода стерилизации семенного материала с использованием фитопротравителя // Биологические науки. 2021. № 5. С 14–18.

2. ГОСТ 12038-84 «Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести» // ГОСТ, 1986, 29 с.

3. Кузнецова А. А., Сурина Т. А., Костин Н. К. Определение биологической эффективности фунгицидов против карантинных возбудителей болезней зерновых, бобовых и масличных культур в лабораторных условиях // Фитосанитария. Карантин растений. 2025. № 1 (22). С. 15–25.

4. Beuchat L.R. Comparison of chemical treatments to kill Salmonella on alfalfa seeds destined for sprout production // Intl J Food Microbiol. 1997. № 34. P. 329–333.

5. Ding H., Fu T., Smith M. A. Microbial Contamination in Sprouts: How Effective Is Seed Disinfection Treatment? // Journal of Food Science. 2013. № 4. P. 495–501.

6. Holliday S.L., Scouten A.J., Beuchat L.R. Efficacy of chemical treatments in eliminating Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on scarified and polished alfalfa seeds // J Food Prot. 2001. № 64. P. 1489–1495.

7. Inpitak P., Udompijitkul P. Effect of household sanitizing agents and electrolyzed water on Salmonella reduction and germination of sunflower and roselle seeds // International journal of food microbiology. 2021. № 337. P. 108947.

8. Lang M.M., Ingham B.H., Ingham S.C. Efficacy of novel organic acid and hypochlorite treatments for eliminating Escherichia coli O157:H7 from alfalfa seeds prior to sprouting // Intl J Food Microbiol. 2000. № 58. P. 73–82.

9. Munkager V., Vestergard M., Prieme A., Altenburger A. et al. AgNO3 Sterilizes Grains of Barley (Hordeum vulgare) without Inhibiting Germination-A Necessary Tool for Plant–Microbiome Research // Plants. 2020. № 9. P. 1–16.

10. Munkvold G.P. (2009) Seed Pathology Progress in Academia and Industry // Annual Review of Phytopathology. 2009. № 47. P. 285–311.

11. OGM24-05 «Rules Proposals for the International Rules for Seed Testing 2025 Edition» // ISTA, 2024, 61 p.

12. Piernas V., Guiraud J.P. Disinfection of Rice Seeds Prior to Sprouting // Journal of Food Science. 1997. № 3. P. 611–615.

13. Sanna M., Gilardi G., Gullino M., Mezzalama M. Evaluation of physical and chemical disinfection methods of Brassica oleracea seeds naturally contaminated with Xanthomonas campestris pv. Campestris // Journal of Plant Diseases and Protection. 2022. № 129. P. 1145–1152.

14. Sikin A., Zoellner C., Rizvi S.H. Current Intervention Strategies for the Microbial Safety of Sprouts // Journal of Food Protection. 2013. № 12. P. 2099–2125.

effective concentrations and exposure times are preferred. The proposed regimens, despite partial root desiccation, can also be used for seed germination experiments lasting at least two weeks. However, it should be noted that they are not optimal for longer experiments.

REFERENCES

1. Bogdanova K.O., Dolanbaeva G.T., Nikolaeva V.N., Vnorovskaya E.V. Optimization of the method of sterilization of seed material using a phytoprotectant [Optimizatsiya metoda sterilizatsii semennogo materiala s ispol'zovaniyem fitoprotravitelya] // Biological sciences. 2021; 5: 14-18. (In Russ.)

2. GOST 12038-84 "Seeds of agricultural crops. Methods for determining germination" // GOST, 1986, 29 p.

3. Kuznetsova A. A., Surina T. A., Kostin N. K. Determination of biological efficiency of fungicides against quarantine pests of grain, legume and oil crops in laboratory conditions // Plant Health and Quarantine. 2025; 1 (22): 15-25.

4. Beuchat L.R. Comparison of chemical treatments to kill Salmonella on alfalfa seeds destined for sprout production // Intl J Food Microbiol. 1997. №34. P. 329–333.

5. Ding H., Fu T., Smith M. A. Microbial Contamination in Sprouts: How Effective Is Seed Disinfection Treatment? // Journal of Food Science. 2013. №4. P. 495-501.

6. Holliday S.L., Scouten A.J., Beuchat L.R. Efficacy of chemical treatments in eliminating Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on scarified and polished alfalfa seeds // J Food Prot. 2001. №64. P. 1489–1495.

7. Inpitak P., Udompijitkul P. Effect of household sanitizing agents and electrolyzed water on Salmonella reduction and germination of sunflower and roselle seeds // International journal of food microbiology. 2021. № 337. P. 108947.

8. Lang M.M., Ingham B.H., Ingham S.C. Efficacy of novel organic acid and hypochlorite treatments for eliminating Escherichia coli O157:H7 from alfalfa seeds prior to sprouting // Intl J Food Microbiol. 2000. №58. P. 73–82.

9. Munkager V., Vestergard M., Prieme A., Altenburger A. et al. AgNO3 Sterilizes Grains of Barley (Hordeum vulgare) without Inhibiting Germination-A Necessary Tool for Plant–Microbiome Research // Plants. 2020. №9. P. 1-16.

10. Munkvold G.P. (2009) Seed Pathology Progress in Academia and Industry // Annual Review of Phytopathology. 2009. №47. P. 285–311.

11. OGM24-05 «Rules Proposals for the International Rules for Seed Testing 2025 Edition» // ISTA, 2024, 61 p.

12. Piernas V., Guiraud J.P. Disinfection of Rice Seeds Prior to Sprouting // Journal of Food Science. 1997. №3. P. 611-615.

13. Sanna M., Gilardi G., Gullino M., Mezzalama M. Evaluation of physical and chemical disinfection methods of Brassica oleracea seeds naturally contaminated with Xanthomonas campestris pv.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Смирнова Анна Владимировна, младший научный сотрудник научно-методического отдела микологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия; *ORCID: 0009-0001-4827-1980, e-mail:* anna.smirnova2328@yandex.ru

Сурина Татьяна Александровна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник научно-методического отдела микологии и гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0000-0002-0463-5762,
e-mail: t.a.surina@yandex.ru

Кузнецова Анна Александровна, старший научный сотрудник научно-методического отдела микологии и гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия;
ORCID: 0000-0001-8443-2641,
e-mail: kyyznec@bk.ru

Костин Никита Константинович, младший научный сотрудник научно-методического отдела микологии ФГБУ «ВНИИКР», пгт Быково, м. о. Раменский, Московская обл., Россия; аспирант, Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К. А. Тимирязева, г. Москва, Россия;
ORCID: 0009-0003-8066-075,
e-mail: kostinwork1@gmail.com

Campestris // Journal of Plant Diseases and Protection. 2022. №129. P. 1145-1152.

14. Sikin A., Zoellner C., Rizvi S.H. Current Intervention Strategies for the Microbial Safety of Sprouts // Journal of Food Protection. 2013. №12. P. 2099-2125.

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anna Smirnova, Junior Researcher, Mycology Research and Methodology Department, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID: 0009-0001-4827-1980,
e-mail: anna.smirnova2328@yandex.ru

Tatiana Surina, PhD in Biology, Leading Researcher, Mycology and Helminthology Research and Methodology Department, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID 0000-0002-0463-5762,
e-mail: t.a.surina@yandex.ru.

Anna Kuznetsova, Senior Researcher, Mycology and Helminthology Research and Methodology Department, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia;
ORCID 0000-0001-8443-2641,
e-mail: kyyznec@bk.ru.

Nikita Kostin, Junior Researcher, Mycology Research and Methodology Department, FGBU "VNIIKR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; Post-Graduate Student at Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia;
ORCID 0009-0003-8066-075,
e-mail: kostinwork1@gmail.com.

Здесь может быть ваша статья!

Журнал «Фитосанитария. Карантин растений» приглашает авторов для публикации своих научных работ

Your article can be here!

The journal “Plant Health and Quarantine” invites authors to publish their research papers

Scan for further information →

Редакция журнала «Фитосанитария. Карантин растений» рада предложить вам возможность публикации ваших статей на страницах журнала. Наша цель – привлечение внимания к наиболее актуальным проблемам карантина растений специалистов сельского хозяйства и всех заинтересованных в этом людей.

В журнале рассматриваются основные направления развития науки и передового опыта в области карантина и защиты растений, публикуется важная информация о новых методах и средствах, применяемых как в России, так и за рубежом, а также о фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации.

Мы доносим до широкого круга читателей объективную научно-просветительскую и аналитическую информацию: мнения ведущих специалистов по наиболее принципиальным вопросам карантина растений, данные о значимых новейших зарубежных и отечественных исследованиях, материалы тематических конференций.

Редакция журнала «Фитосанитария. Карантин растений» приглашает к сотрудничеству как выдающихся деятелей науки, так и молодых ученых, специалистов-практиков, работающих в области фитосанитарии, для обмена опытом, обеспечения устойчивого фитосанитарного благополучия и для новых научных дискуссий.

ЗАДАЧИ ЖУРНАЛА

- Изучение основных тенденций развития науки в области карантина растений
- Анализ широкого круга передовых технологий в области мониторинга и лабораторных исследований по карантину растений
- Обсуждение актуальных вопросов карантина растений

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫМ СТАТЬЯМ

К публикации принимаются статьи на двух языках: русском и английском, содержащие результаты собственных научных исследований, объемом до 15 страниц, но не менее 3 (при одинарном интервале и размере шрифта 12). Оптимальный объем статьи – от 1500 слов. Статьи большего объема могут быть приняты по согласованию с редакцией журнала.

СТРУКТУРА ПРЕДОСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ*

1. УДК, название статьи.
2. Инициалы, фамилия автора.
3. Место работы автора, город, страна, ORCID ID, адрес электронной почты.
4. Аннотация (краткое точное изложение содержания статьи, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): 200–250 слов, но не более 2000 знаков с пробелами.
5. Ключевые слова (5–10 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи.
6. Введение.
7. Материалы и методы.
8. Результаты и обсуждения.
9. Выводы/заключение.
10. Список литературы (т. е. список всей использованной литературы, ссылки на которую даются в самом тексте статьи): правила составления направляются автору по запросу.
11. Информация об авторах: приводится полная информация о каждом из авторов (место работы, город, страна, ORCID ID, адрес электронной почты).
12. Иллюстративные материалы (фотографии, рисунки) допускаются хорошей контрастности, с разрешением не ниже 300 точек на дюйм (300 dpi), оригиналы прикладываются к статье отдельными файлами в формате .tiff или .jpeg (иллюстрации, не соответствующие требованиям, будут исключены из статей, поскольку достойное их воспроизведение типографским способом невозможно). Необходимо указать авторство каждой фотографии (Ф. И. О. фотографа или ссылку).
13. В редакцию необходимо предоставить две рецензии на статью («внешнюю» и «внутреннюю»).

** В таком же порядке и структуре предоставляется англоязычный перевод статьи.*

Работа должна быть предоставлена в редакторе WORD, формат DOC, шрифт Times New Roman, размер шрифта – 12, межстрочный интервал – одинарный, размер полей – по 2 см, отступ в начале абзаца – 1 см, форматирование по ширине. Рисунки, таблицы, схемы, графики и пр. должны быть обязательно пронумерованы, иметь источники и помещаться на печатном поле страницы. Название таблицы – над таблицей; название рисунка/графика – под рисунком/графиком.

БОЛЕЕ ПОДРОБНЫЕ УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ СТАТЕЙ ВЫ МОЖЕТЕ УЗНАТЬ В НАШЕЙ РЕДАКЦИИ:

Адрес: 140150, Россия, Московская область, м. о. Раменское, пгт Быково, ул. Пограничная, д. 32
Контактное лицо: Зиновьева Светлана Георгиевна
Телефон: +7 499 707-22-27, e-mail: zinoveva-s@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»)

ВНИИКР

– Научное и методическое обеспечение деятельности Россельхознадзора, его территориальных управлений и подведомственных ему учреждений в сфере карантина и защиты растений

– Установление карантинного фитосанитарного состояния подкарантинных материалов и территории Российской Федерации путем проведения лабораторных экспертиз и мониторингов

– Научное сотрудничество с национальными и международными организациями в области карантина растений

- Ведущее учреждение в Российской Федерации по синтезу и применению феромонов для выявления карантинных и некарантинных вредителей и борьбы с ними
- ФГБУ «ВНИИКР» – партнер международной программы по координации научных исследований в области карантина растений EUPHRESCO II (EUropean PHytosanitary RESearch COordination)
- В ФГБУ «ВНИИКР» создан и действует Технический комитет по стандартизации ТК 42 «Карантин и защита растений»
- Ведущее научно-методическое учреждение в составе Координационного совета по карантину растений государств – участников СНГ
- 12 филиалов на территории Российской Федерации
- Головное научно-методическое учреждение по реализации Плана первоочередных мероприятий, направленных на гармонизацию карантинных фитосанитарных мер государств – членов Таможенного союза

140150, Россия,
Московская область,
м. о. Раменское, пгт Быково,
ул. Пограничная, д. 32

Тел./факс:
8 (499) 707-22-27

e-mail: vniikr@fsvps.gov.ru
http:// www.vniikr.ru