

КАРАНТИН РАСТЕНИЙ НАУКА И ПРАКТИКА

ИЮНЬ
2/28/2019

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ ЖУРНАЛ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ДОКЛАД
О КАРАНТИННОМ ФИТОСАНИТАРНОМ СОСТОЯНИИ
ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2018 ГОДУ стр. 2

МЕТОД СЕКВЕНИРОВАНИЯ В ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ
КАРАНТИННЫХ ВРЕДНЫХ ОРГАНИЗМОВ стр. 31

ОСОБО ОПАСНЫЕ ГРИБНЫЕ БОЛЕЗНИ СОИ, ИМЕЮЩИЕ
ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ СТРАН – ИМПОРТЕРОВ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ
ПРОДУКЦИИ стр. 38

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИИ
ИНВАЗИОННОГО ВИДА МУРАВЬЕВ *LINERITHEMA HUMILE* стр. 48

NATIONAL REPORT ON QUARANTINE PHYTOSANITARY
SITUATION ON THE TERRITORY OF THE RUSSIAN FEDERATION
IN 2018 page 2

SEQUENCING METHOD IN IDENTIFICATION
OF SPECIES OF QUARANTINE PESTS page 35

HIGHLY DANGEROUS SOYA FUNGAL DISEASES,
CRUCIAL FOR COUNTRIES
THAT IMPORT DOMESTIC PRODUCTS page 42

SOME BIOLOGICAL FEATURES OF INVASIVE SPECIES
OF ANTS *LINERITHEMA HUMILE* page 50

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL

PLANT HEALTH RESEARCH AND PRACTICE

JUNE
2/28/2019

ISSN 2306-9767

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ ЦЕНТР КАРАНТИНА РАСТЕНИЙ» (ФГБУ «ВНИИКР»)



— Научное и методическое обеспечение деятельности Россельхознадзора, его территориальных управлений и подведомственных ему учреждений в сфере карантина и защиты растений



— Установление карантинного фитосанитарного состояния подкарантинных материалов и территории Российской Федерации путем проведения лабораторных экспертиз и мониторингов



— Научное сотрудничество с национальными и международными организациями в области карантина растений

• ФГБУ «ВНИИКР» — партнер международной программы по координации научных исследований в области карантина растений EUPHRESKO II (EUropean PHYtosanitary RESearch COordination)

• Ведущее научно-методическое учреждение в составе Координационного совета по карантину растений государств — участников СНГ

• Головное научно-методическое учреждение по реализации Плана первоочередных мероприятий, направленных на гармонизацию карантинных фитосанитарных мер государств — членов Таможенного союза

• Ведущее учреждение в Российской Федерации по синтезу и применению феромонов для выявления карантинных вредных организмов

• В ФГБУ «ВНИИКР» создан и действует Технический комитет по стандартизации ТК 42 «Карантин и защита растений»

• Имеет 21 филиал на территории Российской Федерации

Россия, 140150, Московская область, Раменский район,
пос. Быково, ул. Пограничная, д. 32
Тел./факс: 8 (499) 707-22-27
e-mail: office@vniikr.ru, <http://www.vniikr.ru>

«КАРАНТИН РАСТЕНИЙ. НАУКА И ПРАКТИКА»

ДВУЯЗЫЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ №2 (28) 2019 г.

Главный редактор:
А.Я. Сапожников,
директор ФГБУ «ВНИИКР»

Шеф-редактор:
Светлана Зиновьева,
начальник отдела по связям
с общественностью
и СМИ ФГБУ «ВНИИКР»

Выпускающий редактор:
Анна Колотиюк,
e-mail: karantin_vniikr@yandex.ru

**Редакционная коллегия
журнала «Карантин растений.
Наука и практика»:**

Швабаускене Ю.А. — заместитель
Руководителя Россельхознадзора

Асагурова А.М. — кандидат
биологических наук, врио директора
Всероссийского НИИ биологической
защиты растений

Ганнибал Ф.Б. — кандидат
биологических наук,
врио директора Всероссийского
НИИ защиты растений

Орлинский А.Д. — доктор
биологических наук,
научный советник ЕОКЗР

Павлюшин В.А. — академик РАН,
профессор, доктор биологических
наук, заведующий лабораторией
микробиологической защиты
растений Всероссийского
НИИ защиты растений

Санин С.С. — академик РАН,
доктор биологических наук,
профессор, заведующий
отделом эпидемиологии и
фитосанитарных болезней зерновых
культур Всероссийского
НИИ фитопатологии

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

Ханну Кукконен — директор
подразделения фитосанитарного
надзора, EVIRA (Финляндия)

Упадышев М.Т. — доктор
сельскохозяйственных наук,
член-корреспондент РАН,
профессор РАН, заведующий
отделом биотехнологии и защиты
растений ФГБНУ «Всероссийский
селекционно-технологический
институт садоводства и
питомниководства»

Сагитов А.О. — доктор
биологических наук,
Генеральный директор ТОО
«Казахский НИИ защиты
и карантина растений»

Сорока С.В. — кандидат
сельскохозяйственных наук,
директор РУП «Институт
защиты растений» НАН
Республики Беларусь

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

Абасов М.М. — доктор
биологических наук,
заместитель директора
ФГБУ «ВНИИКР»

Добровольская О.Б. — доктор
биологических наук, заместитель
директора ФГБУ «ВНИИКР»

Корнев К.П. — кандидат
биологических наук, заместитель
директора ФГБУ «ВНИИКР»

Камаев И.О. — кандидат
биологических наук, старший
научный сотрудник научно-
методического отдела энтомологии
ФГБУ «ВНИИКР»

РЕДАКЦИЯ:
Волкова Е.М. — кандидат
биологических наук,
заведующая лабораторией
сорных растений

Волков О.Г. — начальник
отдела биометода

Кулинич О.А. — доктор
биологических наук,
начальник отдела лесного карантина

Приходько Ю.Н. — кандидат
сельскохозяйственных наук,
ведущий научный сотрудник
научно-методического отдела
вирусологии и бактериологии

Скрипка О.В. — кандидат
биологических наук, ведущий
научный сотрудник
научно-методического отдела
микологии и гельминтологии

Быков И.И. — переводчик
отдела фитосанитарных рисков
и международного взаимодействия

Беломестнова А.А. — переводчик
отдела фитосанитарных рисков
и международного взаимодействия

Красилова О.Л. — переводчик
отдела фитосанитарных рисков и
международного взаимодействия

Дизайн и верстка:
Роман Солоха

Корректоры:
Татьяна Артемьева
Ольга Тренева

**Менеджер по подписке
и дистрибуции:**
Павел Сафронов
+7 903 505 33 23

Журнал «Карантин растений. Наука и практика» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор), свидетельство о регистрации ПИ № ФС77-52594 от 25 января 2013 г.

Учредитель: ООО «ИАЦ «Агробезопасность», выпускается по заказу Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»)

Издатель: ООО «У-Строй»

Адрес редакции: 115551, г. Москва, Шипиловский проезд, дом 39, корпус 2, этаж 15, помещение 53

Номер отпечатан в ООО «Юнион Принт», г. Нижний Новгород, Окский съезд, д. 2, тел.: (831) 416-01-68

Дата подписания в печать 30.06.2019 г. Тираж 3000 экземпляров. Подписной индекс 70195 в Каталоге Агентства «Роспечать»

Журнал входит в Перечень изданий, рекомендованных ВАК для публикации научных трудов соискателей ученых степеней, Распоряжение Минобрнауки РФ № 21-р от 12 февраля 2019 г.

ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

Журнал «Карантин растений. Наука и практика»

*приглашает авторов для публикации
своих научных работ*

Редакция журнала «Карантин растений. Наука и практика» 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 «Карантин растений. Наука и практика» 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 10-12 страниц – но не менее 5 (при одинарном интервале и размере шрифта 12). Оптимальный объем статьи: до 20 тыс. знаков (включая пробелы).

СТРУКТУРА ПРЕДОСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ*

1. Название статьи.

2. Имя, отчество, фамилия автора.

3. Место работы автора, должность, ученая степень, адрес электронной почты.

4. Аннотация (краткое точное изложение содержания статьи, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): около 7-8 строк (300-500 знаков с пробелами).

5. Ключевые слова (5-6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи.

6. Материалы и методы.

7. Результаты и обсуждения.

8. Выводы и заключение.

9. Список литературы (т. е. список всей использованной литературы, ссылки на которую даются в самом тексте статьи): правила составления – ГОСТ Р 7.05-2008.

10. Иллюстративные материалы (фотографии, рисунки) допускаются хорошей контрастности, с разрешением не ниже 300 точек на дюйм (300 dpi), оригиналы прикладываются к статье отдельными файлами в формате tiff или jpeg (иллюстрации, не соответствующие требованиям, будут исключены из статей, поскольку достойное их воспроизведение типографским способом невозможно).

11. Рецензия на статью (доктор наук) и решение экспертной комиссии учреждения.

*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, размеры рисунка в см не больше размеров печатного поля страницы. Название таблицы – над таблицей; название рисунка/графика – под рисунком/графиком.

БОЛЕЕ ПОДРОБНЫЕ УСЛОВИЯ ПУБЛИКАЦИИ СТАТЕЙ ВЫ МОЖЕТЕ УЗНАТЬ В НАШЕЙ РЕДАКЦИИ:

Адрес: 140150, Московская область, Раменский район,
пос. Быково, ул. Пограничная, д. 32
Контактное лицо: Зиновьева Светлана Григорьевна
Телефон: +7 499 707 22 27

СОДЕРЖАНИЕ CONTENT

Национальный доклад о карантинном фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации в 2018 году Министерство сельского хозяйства Российской Федерации Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору	National Report on Quarantine Phytosanitary Situation on the Territory of the Russian Federation in 2018 Ministry of Agriculture of the Russian Federation Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance
2	2

Диагностика неповируса кольцевой пятнистости томата (ToRSV) методом ПЦР в реальном времени Ю.Н. Приходько, ведущий научный сотрудник НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР» Т.С. Живаева, научный сотрудник НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР»	Tomato Ringspot Virus (ToRSV) Diagnosis Using RT-PCR Yu.N. Prikhodko, Leading Researcher of RMDVB of FGBU "VNIKCR" T.S. Zhivaeva, Researcher of RMDVB of FGBU "VNIKCR"
13	18

Возбудитель угловой пятнистости листьев земляники <i>Xanthomonas fragariae</i> Kennedy & King Е.Ю. Шнейдер, старший научный сотрудник НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР» Е.В. Каримова, старший научный сотрудник НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР»	Causal Organism of Angular Leaf Spot of Strawberry <i>Xanthomonas fragariae</i> Kennedy & King E.Yu. Shneyder, Senior Researcher of RMDVB of FGBU "VNIKCR" E.V. Karimova, Senior Researcher of RMDVB of FGBU "VNIKCR"
22	27

Метод секвенирования в видовой идентификации карантинных вредных организмов Д.Л. Белкин, заместитель начальника ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР» Г.Н. Бондаренко, начальник ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР» А.Б. Яремко, младший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР» Д.А. Уварова, младший научный сотрудник научного отдела молекулярно- генетических методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР»	Sequencing Method in Identification of Species of Quarantine Pests D.L. Belkin, Deputy Head of the TLC of FGBU "VNIKCR" G.N. Bondarenko, Head of the TLC of FGBU "VNIKCR" A.B. Iaremko, Junior Researcher of the Scientific Department for Molecular Genetic Diagnostic Methods of FGBU "VNIKCR" D.A. Uvarova, Junior Researcher of the Scientific Department for Molecular Genetic Diagnostic Methods of FGBU "VNIKCR"
31	35

Особо опасные грибные болезни сои, имеющие значение для стран – импортеров отечественной продукции Е.Р. Ручков, младший научный сотрудник лаборатории микологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР» Т.А. Сурина, заведующая лабораторией микологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР»	Highly Dangerous Soya Fungal Diseases, Crucial for Countries that Import Domestic Products E.R. Ruchkov, Junior Researcher of the Mycology Laboratory of the TLC of FGBU "VNIKCR" T.A. Surina, Head of the Mycology Laboratory of the TLC of FGBU "VNIKCR"
38	42

Буряя монилиозная гниль Д.И. Шухин, младший научный сотрудник лаборатории микологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР» А.А. Кузнецова, старший научный сотрудник лаборатории микологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР»	Brown Rot of Stone Fruits D.I. Shukhin, Junior Researcher of the Mycology Laboratory of the TLC of FGBU "VNIKCR" A.A. Kuznetsova, Senior Researcher of the Mycology Laboratory of the TLC of FGBU "VNIKCR"
44	46

Некоторые особенности биологии инвазионного вида муравьев <i>Linepithema humile</i> Н.А. Гревцова, младший научный сотрудник научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР»	Some Biological Features of Invasive Species of Ants <i>Linepithema humile</i> N.A. Grevtsova, Junior Researcher of Entomological Research and Methodology Department of FGBU "VNIKCR"
48	50

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ДОКЛАД О КАРАНТИННОМ ФИТОСАНИТАРНОМ СОСТОЯНИИ ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2018 ГОДУ

Москва, 2019

Введение

Национальный доклад о карантинном фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации в 2018 году (далее – национальный доклад) подготовлен Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору в соответствии со статьей 12 Федерального закона от 21 июля 2014 г. № 206-ФЗ «О карантине растений» (далее – Федеральный закон «О карантине растений») на основании данных мониторинга карантинного фитосанитарного состояния территории Российской Федерации.

Национальный доклад содержит информацию о распространении карантинных объектов на территории Российской Федерации, об установлении и об упразднении в 2018 году карантинных фитосанитарных зон на территории Российской Федерации по каждому ограниченно распространенному карантинному объекту.

В соответствии со статьей 2 Федерального закона «О карантине растений» карантинное фитосанитарное состояние территории Российской Федерации – наличие или отсутствие на территории Российской Федерации карантинных объектов. Информация о наличии или отсутствии карантинных объектов основывается на результатах мониторинга карантинного фитосани-

тарного состояния территории Российской Федерации.

Согласно статье 10 Федерального закона «О карантине растений», мониторинг карантинного фитосанитарного состояния территории Российской Федерации, на основании данных которого подготавливается национальный доклад, представляет собой систему наблюдений, анализа, оценки и прогноза распространения по территории Российской Федерации карантинных объектов. Порядок организации мониторинга карантинного фитосанитарного состояния территории Российской Федерации утвержден приказом Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 23 января 2018 г. № 23 «Об утверждении порядка организации мониторинга карантинного фитосанитарного состояния территории Российской Федерации». В Российской Федерации охрану территории страны от проникновения и распространения карантинных объектов обеспечивает Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (далее – Россельхознадзор). В соответствии с постановлением Правительства Российской Федерации от 29 мая 2006 г. № 329 «Об официальной национальной организации по карантину и защите растений» Россельхознадзор является официальной национальной организацией

по карантину и защите растений, ответственной за выполнение обязанностей, предусмотренных статьей IV Международной конвенции по карантину и защите растений, пересмотренный текст которой одобрен на 29-й сессии Конференции Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций в ноябре 1997 г.

Важнейшей составной частью продовольственной безопасности Российской Федерации является карантинная фитосанитарная безопасность, направленная на защиту территории Российской Федерации от рисков, связанных с проникновением, распространением и акклиматизацией вредных организмов. Основной путь непреднамеренной интродукции (проникновения и акклиматизации) вредных организмов – импорт сельскохозяйственной продукции.

В 2018 году Россельхознадзором проконтролировано около 13,5 млн тонн и 2,45 млрд единиц различной ввозимой в Российскую Федерацию растительной подкарантинной продукции. В такой продукции из 62 стран мира был предотвращен ввоз 54 видов карантинных объектов в 6 834 случаях (в 2017 году предотвращен ввоз 38 видов карантинных объектов в 4 521 случае).

Проникновение, распространение и акклиматизация карантинных

вредных организмов на территории Российской Федерации приводят к значительным потерям урожая сельскохозяйственных культур и большим затратам на мероприятия по борьбе с ними, а также к косвенным потерям – снижению качества урожая, сокращению возможностей экспорта и т.д.

Российская Федерация в настоящее время является одним из основных мировых производителей зерна. По данным Росстата, в Российской Федерации посевные площади зерновых культур в 2018 году составили 43,6 млн га. Из зерновых культур важнейшей сельскохозяйственной культурой является пшеница, посевные площади которой в Российской Федерации в 2018 году составили 27,3 млн га, урожайность – 27,2 ц/га, а валовой сбор – 72,1 млн тонн. Российская Федерация является одним из крупнейших мировых производителей высококачественного зерна пшеницы. Вместе с тем сохраняется и импорт данной продукции из других стран.

С зерновыми культурами связаны многие вредные организмы, включенные в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза, утвержденный Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 30 ноября 2016 г. № 158 «Об утверждении Единого перечня карантинных объектов Евразийского экономического союза» (далее – Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС), потенциальное воздействие которых для территории Российской Федерации оценено как большое – более 1 млрд рублей в год.

Высокий фитосанитарный риск при импорте зерновых культур связан с такими отсутствующими в Российской Федерации карантинными объектами, как возбудитель индийской головни пшеницы (*Neovossia indica* (Mitra) Mundkur), возбудители диплоидоза кукурузы (*Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton, *Stenocarpella maydis* (Berkeley) Sutton), бактериального увядания (вилта) кукурузы (*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* (Smith) Mergaert et al.), бактериального ожога риса (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama) Swings et al.), бактериальной полосатости риса (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Fang et al.)

Swings et al.), желтого слизистого бактериоза пшеницы (*Rathayibacter tritici* (Carlson & Vidaver) Zgurskaya et al.), капровый жук (*Trogoderma granarium* Ev.), западный кукурузный жук диабротика (*Diabrotica virgifera* LeConte), сорные растения – череда волосистая (*Bidens pilosa* L.), ипомея ямчатая (*Ipomoea lacunosa* L.), ипомея плющевидная (*Ipomoea hederacea* L.), бузинник пазушный (*Iva axillaris* Pursh.), паслен каролинский (*Solanum carolinense* L.) и другие.

Кроме того, с импортируемыми в Российскую Федерацию зерновыми культурами на территорию страны могут попасть и новые виды карантинных объектов, внесенные в Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС, связанные с данной продукцией и отсутствующие в Российской Федерации, – пшеничный клоп (*Blissus leucopterus* (Say)), широкохоботный амбарный долгоносик (*Caulophilus latinasus* (Say)), кукурузный трипс (*Frankliniella williamsi* Hood), американская кукурузная совка (*Helicoverpa zea* (Boddie)), гриб, вызывающий пятнистость листьев кукурузы (*Cochliobolus carbonum* R.R. Nelson).

Второй по важности сельскохозяйственной культурой в Российской Федерации является картофель.

С картофелем связан риск интродукции многих видов отсутствующих в стране карантинных вредных организмов, включенных в Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС, потенциальные потери от которых оцениваются в 1 млрд рублей в год. Это – картофельный жук – блошка клубневая (*Epitrix tuberis* Gentner), андийские картофельные долгоносики (*Premnotrypes* spp.), гриб – возбудитель головни картофеля (*Thecaphora solani* Thirum. et O'Brien), возбудители вирусных заболеваний – андийский латентный тимовирус картофеля (Andean potato latent tumovirus), андийский комовирус крапчатости картофеля (Andean potato mottle comovirus), теповирус Т картофеля (Potato T terovirus), альфамовирус пожелтения картофеля (Potato yellowing alfamovirus), бледная картофельная нематода (*Globodera pallida* (Stone) Behrens), колумбийская галловая нематода (*Meloidogyne chitwoodi* Golden et al.), возбудитель бактериального

заболевания – бурая гниль картофеля (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.) и другие.

Фитосанитарный риск импортирования плодовых и плодово-ягодных культур связан в первую очередь с интродукцией отсутствующих на территории Российской Федерации карантинных объектов, включенных в Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС, потенциальный ущерб от которых был оценен от 100 млн до 24,9 млрд рублей. Это вредители растений – тутовая щитовка (*Pseudaulacaspis pentagona* Targ.-Toz.), яблонная муха (*Rhagoletis pomonella* Walsh), восточная вишневая муха (*Rhagoletis cingulata* Loew.), восточная фруктовая муха (*Bactrocera dorsalis* Hend.), фитопlasма золотистого пожелтения винограда (*Candidatus Phytoplasma vitis*), возбудители вирусных заболеваний – черавирус рашпилевидности листьев черешни (Cherry rasp leaf virus), вириод латентной мозаики персика (Peach latent mosaic viroid), неповирус розеточной мозаики персика (Peach rosette mosaic nepovirus), а также новые для Российской Федерации карантинные виды, включенные в Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС, – инжировая восковая ложнощитовка (*Ceroplastes rusci* (L.)), азиатская ягодная дрозифила (*Drosophila suzukii* (Matsumura)), черничная пестрокрылка (*Rhagoletis mendax* Curran), яблоневый круглоголовый усач-скрипун (*Saperda candida* Fabricius), гриб – возбудитель вязкой гнили черники (*Diaporthe vaccinii* Shear), фитопlasма пролиферации яблони (*Candidatus Phytoplasma mali*), фитопlasма истощения груши (*Candidatus Phytoplasma pyri*).

Серьезный экономический ущерб Российской Федерации могут нанести отсутствующие на территории Российской Федерации карантинные объекты, включенные в Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС, – американские шелкопряды рода *Malacosoma* (американский коконопряд и лесной кольчатый шелкопряд). Эти виды наносят огромный ущерб большинству лиственных деревьев – лесным породам, декоративным растениям и плодовым деревьям. Экономические потери, наносимые американскими шелкопрядами, могут соста-

вить десятки миллиардов рублей в год.

Реальную фитосанитарную угрозу для развития садоводства и питомниководства Российской Федерации представляет еще один американский вид – скошеннополосая листовертка (*Choristoneura rosaceana* Har.). Этот карантинный объект повреждает многие виды плодовых деревьев. При этом гусеницы листовертки питаются не только листьями, но и плодами, оставляя на них глубокие уродливые рубцы. Ущерб заключается в потере плодами товарного вида и качества, уменьшении их размера и преждевременном опадении. В настоящее время в Северной Америке скошеннополосая листовертка является основным вредителем плодовых культур. Интродукция данного вида на территорию России вызовет не только прямые многомиллиардные убытки, но и значительно затруднит развитие целой отрасли отечественного растениеводства.

Фитосанитарный риск для территории Российской Федерации представляют карантинные виды мух, связанные с плодовой продукцией. Наиболее вероятна акклиматизация на территории страны плодовых мух североамериканского происхождения: восточной вишневой мухи (*Rhagoletis cingulata* Loew.), черничной пестрокрылки (*Rhagoletis mendax* Curran), яблонной мухи (*Rhagoletis pomonella* Walsh). Благодаря наличию зимующей стадии эти виды мух способны акклиматизироваться на значительной части территории Российской Федерации.

Для южных регионов Российской Федерации высокий фитосанитарный риск представляет азиатская ягодная дрозифила (*Drosophila suzukii* (Matsumura)). Данный вид, происходящий из Восточной Азии, в последние годы стремительно распространился в странах Европы, Северной и Южной Америки. В 2018 году Россельхознадзором вид выявлен при проведении карантинного фитосанитарного досмотра в 7 партиях импортируемой подкарантинной продукции. Азиатская ягодная дрозифила повреждает широкий спектр плодовых и ягодных культур, таких как земляника, персик, слива, вишня, черника, малина и другие. В Японии зафиксировано пораже-

ние этим видом до 75% – 80% плодов вишни. В США наблюдалось снижение урожая черники в среднем на 40%, ежевики и малины – на 55%.

На основании проведенных обследований установлено, что на территории Российской Федерации отсутствуют многие опасные вредные организмы, связанные с овощными и бахчевыми культурами, впервые регулируемые в Российской Федерации в качестве карантинных объектов, – африканская дынная муха (*Bactrocera cucurbitae* (Coquillett)), томатный трипс (*Frankliniella schultzei* (Trybom)), американский луковый минер (*Liriomyza nitzkei* Spencer), бактерии, вызывающие бактериальную пятнистость тыквенных культур (*Acidovorax citrulli* (Shaad et al.) и листовой ожог лука (*Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* (Roumagnac et al.)).

Чрезвычайно важно для отечественного овощеводства отсутствие на территории Российской Федерации бегомовируса желтой курчавости листьев томата (Tomato yellow leaf curl begomovirus), поражающего томат, перец, фасоль, тыкву и ряд других культурных растений. Естественный ареал вируса находится в Восточном Средиземноморье, однако в настоящее время вирус распространился в большинстве регионов мира и вызывает потери урожая, исчисляемые сотнями миллионов долларов. В ряде стран широкое распространение этого вируса привело к сокращению площадей под культурой томата до 50%.

Особую группу карантинных объектов образуют вредители и болезни растений защищенного грунта.

В Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС включены 15 видов вредителей закрытого грунта, которые выявляются при импорте подкарантинной продукции. Воздействие группы карантинных объектов защищенного грунта оценивается как большое в связи со спецификой производства в нем растительной продукции. Это такие вредители растений, как американский клеверный минер (*Liriomyza trifolii* Burg.), западный цветочный (калифорнийский) трипс (*Frankliniella occidentalis* Perg.), американский табачный трипс (*Frankliniella fusca* (Hinds)), вест-индский цветочный трипс (*Frankliniella insularis* (Franklin)), та-

бачная белокрылка (*Bemisia tabaci* Gen.), южноамериканская томатная моль (*Tuta absoluta* (Povolny)), возбудители грибных заболеваний – аскохитоза хризантем (*Didymella ligulicola* (K.F. Baker, Dimock & Davis) von Arx), белой ржавчины хризантем (*Puccinia horiana* Henn.) и другие виды.

В 2018 году карантинные объекты защищенного грунта были выявлены в импортируемой в страну продукции в 1 332 случаях.

В последние годы в Российской Федерации растет импорт лесодекоративных и кустарниковых декоративных культур.

К новым для Российской Федерации видам, связанным с импортированием данной подкарантинной продукции, относятся опасные вредные организмы Единого перечня карантинных объектов ЕАЭС – бронзовая березовая златка (*Agrilus anxius* Gory), клоп дубовая кружевница (*Corythucha arcuata* (Say)), западный сосновый лубоед (*Dendroctonus brevicornis* LeConte), еловый лубоед (*Dendroctonus rufipennis* (Kirby)), рыжий сосновый лубоед (*Dendroctonus valens* LeConte), оregonский сосновый короed (*Ips pini* (Say)), калифорнийский короed (*Ips plastographus* (LeConte)), сосновый семенной клоп (*Leptoglossus occidentalis* Heidemann), грибы, вызывающие суховершинность ясеня (*Chalara fraxinea* T. Kowalski), цветочный ожог камелий (*Ciborinia camelliae* Koch) и другие виды.

Высокий фитосанитарный риск импортирования различной подкарантинной продукции связан с еще одним карантинным насекомым-вредителем – многоядной мухой-горбаткой (*Megaselia scalaris* (Loew)). Этот вид отличается способностью развиваться на самых разных субстратах, является потенциальным многоядным вредителем запасов: повреждает различные продукты питания, в частности муку, сою, картофель, бананы, дыню, сыр, вяленую рыбу. Муха-горбатка способна наносить существенный вред грибным плантациям, повреждая мицелий и плодовые тела вешенки (*Pleurotus* spp.), шампиньонов (*Agaricus bisporus*), трюфелей (*Tuber* spp.) и других видов грибов. Занос мухи-горбатки на территорию Российской Федерации возможен со

многими видами подкарантинной продукции, а также с грузами, на прямую не связанными с продуктами питания.

Чрезвычайно важным является решение о карантинном регулировании на территории Евразийского экономического союза (далее – ЕАЭС) возбудителя болезни Пирса (*Xylella fastidiosa* Wells et al.). Этот бактериоз поражает более 200 видов древесных, кустарниковых и травянистых растений, наиболее экономически значимыми из которых являются виноград, косточковые плодовые и лесные культуры. Единственная известная эффективная мера борьбы с указанным карантинным объектом – полное уничтожение зараженных растений в очаге, а также потенциально восприимчивых растений в буферной зоне.

Одним из приоритетных направлений реализации Государственной программы развития сельского хозяйства и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия, утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 14 июля 2012 г. № 717, является увеличение объема экспорта продукции агропромышленного комплекса.

Российская Федерация является крупнейшим мировым экспортером зерна. На экспортный потенциал зерна из Российской Федерации в значительной степени влияет карантинное фитосанитарное состояние ее территории в связи с тем, что страны – импортеры российского зерна выдвигают фитосанитарные требования к производству данной подкарантинной продукции в зонах, свободных от определенных вредных организмов, включая сорные растения. Так, основные страны – импортеры российского зерна предъявляют фитосанитарные требования по отсутствию в данной продукции таких карантинных для государств – членов ЕАЭС вредных организмов, как амброзия полыннолистная, горчак ползучий, индийская головня, капоровый жук и другие.

Россия является одной из богатейших стран мира по лесным ресурсам и крупнейшим экспортером лесопроductии на международном рынке. Экспорт леса и лесоматериалов связан с выполнением целого

ряда фитосанитарных требований стран-импортеров. В карантинные перечни стран-импортеров включены более 100 видов вредителей и возбудителей болезней леса, большая часть которых способна распространяться с деловой древесиной, пиломатериалами и упаковочной древесиной.

С целью предотвращения фитосанитарных рисков и своевременного выявления карантинных объектов проводится мониторинг карантинного фитосанитарного состояния территории Российской Федерации.

В мировой фитосанитарной практике одним из основных способов получения достоверных данных о распространении вредных организмов является феромонный мониторинг (феромониторинг), основанный на применении синтетических феромонов насекомых-вредителей (феромоны насекомых – это биологически активные химические вещества, вырабатываемые ими для передачи информации особям своего вида и вызывающие у воспринимающих организмов специфические поведенческие или физиологические реакции). В настоящее время феромониторинг – это наиболее верный путь обнаружения и оценки численности вредителей по сравнению с другими известными методами, так как дает возможность оценить масштабы и локализацию очагов вредителей, изучить сезонную активность вредителя и тем самым определить сроки и объемы истребительных мероприятий, заметно повысить их эффективность.

В случае, если плотность выявленной популяции вредителя невысока, но выше экономического порога вредоносности, борьба с ним возможна также с помощью феромонов – путем массового отлова насекомых в ловушки или использования метода дезориентации.

Таким образом, использование феромонов в карантине растений позволяет оперативно получать достоверную информацию о карантинном фитосанитарном состоянии обследуемых объектов, своевременно применять меры по локализации и ликвидации очага выявленного карантинного вредителя и контролировать качество проводимых ликвидационных мероприятий в карантинной фитосанитарной зоне.

В Российской Федерации при проведении феромониторингов используются феромоны не только карантинных видов вредителей, но и 32 опасных вредителей некарантинного значения – таких как яблонная плодожорка, сливовая плодожорка, каштановая минирующая моль, гроздевая листовертка, мельничная огневка, трогодерма черная, трогодерма изменчивая и других видов.

Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС включает 233 карантинных объекта, из них 132 объекта – насекомые и клещи. Для проведения мониторинга в России синтезированы и используются феромоны 20 карантинных видов насекомых. С помощью феромонных ловушек только за 2018 год были выявлены 15 карантинных видов насекомых в 4 962 случаях. Среди них такие опасные вредители, как восточная плодожорка, калифорнийская щитовка, томатная моль, американская белая бабочка. Благодаря применению феромониторинга специалистами Россельхознадзора в 2011-2012 годах были своевременно выявлены единичные экземпляры кукурузного жука в граничащих с Украиной регионах, что позволило предотвратить интродукцию данного вида.

Раздел 1 Распространение карантинных объектов на территории Российской Федерации

Карантинные организмы имеют потенциальное экономическое значение для территории Российской Федерации или государств – членов ЕАЭС, в которых они пока отсутствуют, или присутствуют, но ограниченно распространены и служат объектом официальной борьбы.

С 1 июля 2017 г. на территории государств, входящих в ЕАЭС, действует Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС.

С 30 апреля 2018 г. вступило в силу Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 30 марта 2018 г. № 25 «О внесении изменений в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза», в соответствии с которым один карантинный объект исключен из Единого перечня карантинных объектов ЕАЭС, а 52

карантинных объекта в него включены.

Таким образом, на 1 января 2019 г. Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС включает в себя 233 карантинных объекта, относящихся к следующим таксономическим группам:

- насекомые и клещи – 132;
- грибы – 36;
- вирусы и вириоды – 20;
- растения – 20;
- бактерии и фитоплазмы – 16;
- нематоды – 9.

Карантинные объекты, распространенные на территории Российской Федерации, включают 42 объекта: 23 вида насекомых, 2 вида нематод, 5 видов грибов, 2 вида бактерий, 2 вида вирусов и вириодов и 8 видов сорных растений.

Из 55 объектов Единого перечня карантинных объектов ЕАЭС, входящих в раздел II «Карантинные вредные организмы, ограниченно распространенные на территории Евразийского экономического союза» указанного перечня, в Российской Федерации распространены только 36. По 19 карантинным объектам карантинные фитосанитарные зоны на территории Российской Федерации отсутствуют.

Раздел 2

Установление карантинных фитосанитарных зон на территории Российской Федерации

По состоянию на 1 января 2019 г. на территории Российской Федерации установлены карантинные фитосанитарные зоны в отношении 42 видов карантинных объектов из 233 видов, включенных в Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС (18% от общего числа карантинных объектов Единого перечня карантинных объектов ЕАЭС).

Большое значение для обеспечения зерна российского производства, свободного от карантинных объектов, имеют мероприятия по ликвидации популяций ограниченно распространенных в Российской Федерации 8 карантинных видов сорных растений. В соответствии с данными обследований и мониторинга территории страны в 2018 году по сравнению с 2017 годом не изменилась площадь установлен-

ных карантинных фитосанитарных зон амброзии многолетней, увеличилась площадь карантинных фитосанитарных зон амброзии полыннолистной, паслена колючего и паслена трехцветкового. По остальным 4 карантинным объектам в 2018 году площади карантинных фитосанитарных зон уменьшились.

С картофелем может быть связано 26 видов и 1 таксономическая группа вредных организмов, включенных в Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС. На территории Российской Федерации на 1 января 2019 г. установлены карантинные фитосанитарные зоны только по 4 карантинным объектам – картофельная моль (*Phthorimaea operculella* (Zeller)), рак картофеля (*Synchytrium endobioticum* (Schilbersky) Percival), золотистая картофельная нематода (*Globodera rostochiensis* (Wollenweber) Behrens) и вириод клубней картофеля (*Potato spindle tuber viroid*). Наибольшее фитосанитарное значение имеет золотистая картофельная нематода, карантинные фитосанитарные зоны которой установлены в 59 субъектах Российской Федерации в 778 муниципальных районах на общей площади 1 120 413,3 га.

Ограниченное распространение в России имеют 8 связанных с плодовыми культурами видов вредных организмов – американская белая бабочка (*Hyphantria cunea* Drury), восточная плодовая жук (*Grapholita molesta* (Busck)), японский жук (*Popillia japonica* Newman), персиковая плодовая жук (*Carposina niponensis* Walgshingham), калифорнийская щитовка (*Quadraspidiotus perniciosus* Comst.), филлоксеры (*Viteus vitifoliae* Fitch.), возбудитель бактериального ожога плодовых культур (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.), потивирус шарки (оспы) слив (*Plum pox potyvirus*). Из указанных карантинных объектов наиболее распространены: калифорнийская щитовка (карантинные фитосанитарные зоны установлены в 194 муниципальных районах 15 субъектов Российской Федерации на площади 90,9 тыс. га); американская белая бабочка (карантинные фитосанитарные зоны установлены в 153 муниципальных районах 13 субъектов Российской Федерации на площади 445,4 тыс. га); восточная

плодовая жук (карантинные фитосанитарные зоны установлены в 114 муниципальных районах 16 субъектов Российской Федерации на площади 38,7 тыс. га).

Из карантинных объектов закрытого грунта на территории Российской Федерации наиболее распространен западный цветочный (калифорнийский) трипс – площадь установленных карантинных фитосанитарных зон в 57 муниципальных районах составляет 493,7 га.

По состоянию на 1 января 2019 г. на территории России распространены такие карантинные виды вредителей леса, как азиатский подвид непарного шелкопряда (*Lymantria dispar asiatica* Vnukovskij), сибирский шелкопряд (*Dendrolimus sibiricus* Chetverikov), большой черный еловый усач (*Monochamus urusovi* (Fischer v. Waldheim), малый черный еловый усач (*Monochamus sutor* Linnaeus) и другие.

В результате проведенных в 2018 году Россельхознадзором обследований на выявление карантинных вредителей лесных и лесодекоративных культур впервые были установлены карантинные фитосанитарные зоны для следующих 4 карантинных объектов – клоп дубовая кружевница (*Corythucha arcuata* (Say)), клоп платановая кружевница (*Corythucha ciliata* Say), уссурийский полиграф (*Polygraphus proximus* Blandford) и ясеневая изумрудная златка (*Agrius planipennis* Fairmaire).

К основным растениям, повреждаемым клопом дубовая кружевница, относятся различные виды дуба (*Quercus*). Данный вид способен не только существенно ослаблять повреждаемые деревья, но и вызывать их гибель. Экономические потери, связанные с реализацией мероприятий по механической, химической и биологической защите дубовых насаждений от вредителя, а также по их восстановлению могут измеряться сотнями миллионов рублей.

Основными растениями – хозяевами клопа платановая кружевница являются растения рода Платан (*Platanus*). Вредитель наносит значительный ущерб насаждениям платана вплоть до гибели поврежденных деревьев. На территории Российской Федерации данный карантинный объект способен заселить все районы,

в которых произрастает его основное растение-хозяин. Заметный ущерб может проявиться в насаждениях платана в озеленительных посадках Крыма и отдельных регионах юга европейской части России.

Кормовыми растениями уссурийского полиграфа являются различные виды пихт, сосен, в том числе кедр корейский (*Pinus koraiensis*), а также ель и лиственница. Установлено, что в Сибири заселенные короедом пихты погибают в течение 4-5 лет после заселения.

В 2018 году при проведении карантинного фитосанитарного мо-

нитинга впервые на территории Российской Федерации был выявлен опасный для многих сельскохозяйственных культур карантинный объект – коричнево-мраморный клоп (*Halyomorpha halys* Stal). В местах своего природного обитания в странах Азии клоп питается 300 видами растений, предпочитая плодовые, ягодные и овощные культуры, прежде всего яблоню, сливу, вишню, черешню, грушу, виноград, шиповник, облепиху, томаты, огурцы, перец, баклажаны, фасоль. Кроме того, клоп повреждает зерновые и зернобобовые

культуры (кукурузу, пшеницу, сою, ячмень, горох), а также декоративные древесные культуры (магнолию, падуб, платан и другие).

По подсчетам специалистов, потенциальные потери при расселении такого клопа только в Краснодарском и Ставропольском краях, Ростовской области и Республике Дагестан могут составить около 2 млрд рублей в год.

Информация об установленных карантинных фитосанитарных зонах на территории Российской Федерации представлена в таблице 1.

Таблица 1

Установленные карантинные фитосанитарные зоны на территории Российской Федерации (по состоянию на 1 января 2019 г.)

Название карантинного объекта	Количество субъектов Российской Федерации	Количество муниципальных районов и городских округов	Площадь установленных карантинных фитосанитарных зон, га
I. Насекомые			
1. Американская белая бабочка (<i>Hyphantria cunea</i> Drury)	13	153	445 367,52
2. Большой черный еловый усач (<i>Monochamus urusovi</i> Fisch.)	44	527	380 636 065
3. Восточная плодоярка (<i>Grapholita molesta</i> (Busck))	16	114	38 754,7
4. Восточная каштановая орехотворка (<i>Dryocosmus kuriphilus</i> Yas.)	1	1	22 351,2
5. Западный цветочный (калифорнийский) трипс (<i>Frankliniella occidentalis</i> Perg.)	32	57	493,66
6. Калифорнийская щитовка (<i>Quadraspidiotus perniciosus</i> Comst.)	15	194	90 895,18
7. Картофельная моль (<i>Phthorimaea operculella</i> Zell.)	8	46	11 448,17
8. Клоп дубовая кружевница (<i>Corythucha arcuata</i> (Say))	2	3	3 701,99
9. Клоп платановая кружевница (<i>Corythucha ciliata</i> Say)	2	2	150,78
10. Коричнево-мраморный клоп (<i>Halyomorpha halys</i> Stal)	2	2	185 125,71
11. Малый черный еловый усач (<i>Monochamus sutor</i> L.)	48	551	328 171 576,37

12. Персиковая плодоярка (<i>Carposina niponensis</i> Wlsgl.)	4	21	1 144,83
13. Азиатский подвид непарного шелкопряда (<i>Lymantria dispar asiatica</i> Vnukovskij)	9	116	47 730 693,1
14. Сибирский шелкопряд (<i>Dendrolimus sibiricus</i> Chetv.)	19	280	180 539 942
15. Табачная белокрылка (<i>Bemisia tabaci</i> Gen.)	2	2	1,12
16. Черный бархатно-пятнистый усач (<i>Monochamus saltuarius</i> Gebl.)	7	124	76 017 578
17. Черный крапчатый усач (<i>Monochamus impluviatus</i> Mot.)	5	83	122 573 786
18. Черный сосновый усач (<i>Monochamus galloprovincialis</i> (Oliv.))	47	590	279 944 755,85
19. Филлоксера (<i>Viteus vitifoliae</i> Fitch.)	9	79	17 586,27
20. Уссурийский полиграф (<i>Polygraphus proximus</i> Blandford)	3	13	317 893,4
21. Южноамериканская томатная моль (<i>Tuta absoluta</i> (Povolny))	6	9	723,37
22. Ясенева изумрудная златка (<i>Agrilus planipennis</i> Fairmaire)	2	3	10 802,3
23. Японский жук (<i>Popillia japonica</i> Newm.)	1	1	2 000
II. Нематоды			
1. Золотистая картофельная нематода (<i>Globodera rostochiensis</i> (Woll.) Behrens)	59	778	1 120 413,27
2. Соевая цистообразующая нематода (<i>Heterodera glycines</i> Ichinohe)	1	7	27 012,16
III. Грибы			
1. Аскохитоз хризантем (<i>Didymella ligulicola</i> (K.F. Baker, Dimock & Davis) von Arx)	1	1	0,05
2. Антракноз земляники (<i>Colletotrichum acutatum</i> Simmonds (= <i>C. xanthii</i> Halsted))	2	2	53,95
3. Белая ржавчина хризантем (<i>Puccinia horiana</i> Henn.)	2	2	0,56
4. Рак картофеля (<i>Synchytrium endobioticum</i> (Schilb.) Percival)	11	31	1 304,56
5. Фомопсис подсолнечника (<i>Diaporthe helianthi</i> Munt.-Cvet. et al.)	10	125	164 388,61
IV. Бактерии и фитоплазмы			
1. Бактериальный ожог плодовых культур (<i>Erwinia amylovora</i> (Burrill) Winslow et al.)	13	43	225 804,83

2. Бактериальное увядание винограда (<i>Xylophilus ampelinus</i> (Panagopoulos) Willems et al. (= <i>Xanthomonas ampelina</i> Panagopoulos)	2	2	741,33
V. Вирусы и виroidы			
1. Виroid веретеновидности клубней картофеля (Potato spindle tuber viroid)	1	1	442
2. Потивирус шарки (оспы) слив (Plum pox potyvirus)	18	32	14 731,02
VI. Растения			
1. Амброзия многолетняя (<i>Ambrosia psilostachya</i> DC.)	7	13	27 953,87
2. Амброзия полыннолистная (<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.)	31	356	7 356 593,56
3. Амброзия трехраздельная (<i>Ambrosia trifida</i> L.)	22	107	2 694 381,83
4. Горчак ползучий (<i>Acroptilon repens</i> DC.)	19	192	1 885 590,01
5. Паслен колючий (<i>Solanum rostratum</i> Dun.)	6	33	49 365,32
6. Паслен трехцветковый (<i>Solanum triflorum</i> Nutt.)	3	9	705 416,27
7. Повилики (<i>Cuscuta</i> spp.)	67	640	3 006 142,47
8. Ценхрус длинноколючковый (<i>Cenchrus longispinus</i> (Hack.) Fern.)	5	14	720,38

Раздел 3

Упразднение карантинных фитосанитарных зон на территории Российской Федерации в 2018 году

В соответствии со статьей 19 Федерального закона «О карантине растений» решение об отмене карантинного фитосанитарного режима (упразднении карантинных фитосанитарных зон) принимается Россельхознадзором после ликвидации популяции карантинного объекта.

На ликвидацию популяций карантинных вредных организмов даже при своевременном и правильном применении мер борьбы нередко требуется не одно десятилетие. Например, на ликвидацию популяции колумбийской галловой нематоды может потребоваться 7-10 лет, кар-

тофельной цистообразующей нематоды – до 15 лет при исходной низкой и средней степени зараженности почвы, возбудителя рака картофеля – не менее 20-25 лет. Таким образом, ликвидация очагов карантинных объектов является достаточно длительным процессом.

В результате проведения карантинных фитосанитарных мер и мероприятий по локализации очагов и ликвидации популяций карантинных объектов в 2018 году на территории Российской Федерации упразднено 3 847 карантинных фитосанитарных зон общей площадью 27 655 184,5 га по 25 видам карантинных объектов, в том числе упразднены карантинные фитосанитарные зоны по 4 видам вредителей леса. При этом 97,5% общей площади упраздненных карантинных

фитосанитарных зон приходится на азиатский подвид непарного шелкопряда – 26 958 583 га.

В 2018 году упразднено 2 850 карантинных фитосанитарных зон золотистой картофельной нематоды.

Кроме того, в 2018 году отменен карантинный фитосанитарный режим в ряде очагов 7 видов сорных растений. Общая площадь упраздненных карантинных фитосанитарных зон составляет 456 043,3 га.

На территории Российской Федерации в 2018 году полностью упразднены карантинные фитосанитарные зоны по азиатской хлопковой совке.

Информация об упразднении карантинных фитосанитарных зон на территории Российской Федерации в 2018 году представлена в таблице 2.

Таблица 2

Упразднение карантинных фитосанитарных зон на территории Российской Федерации в 2018 году

Название карантинного объекта	Количество субъектов Российской Федерации	Количество муниципальных районов	Площадь упраздненных карантинных фитосанитарных зон, га
I. Насекомые			
1. Американская белая бабочка (<i>Hyphantria cunea</i> Drury)	6	44	5 175,43
2. Азиатская хлопковая совка (<i>Spodoptera litura</i> Fabr.)	1	19	4 221,94
3. Большой черный еловый усач (<i>Monochamus urussovi</i> Fisch.)	2	2	4,3
4. Восточная плодоярка (<i>Grapholita molesta</i> (Busck))	2	3	216,4
5. Западный цветочный (калифорнийский) трипс (<i>Frankliniella occidentalis</i> Perg.)	9	10	31,71
6. Калифорнийская щитовка (<i>Quadraspidiotus perniciosus</i> Comst.)	6	22	2 247,64
7. Картофельная моль (<i>Phthorimaea operculella</i> (Zell.))	2	5	388,34
8. Малый черный еловый усач (<i>Monochamus sutor</i> L.)	2	3	59,3
9. Персиковая плодоярка (<i>Carposina niponensis</i> Wlsglh.)	1	33	145 546,72
10. Азиатский подвид непарного шелкопряда (<i>Lymantria dispar asiatica</i> Vnukovskij)	1	12	26 958 583
11. Черный сосновый усач (<i>Monochamus galloprovincialis</i> (Oliv.))	2	2	170,6
12. Табачная белокрылка (<i>Bemisia tabaci</i> Gen.)	2	2	11
13. Филлоксера (<i>Viteus vitifoliae</i> Fitch.)	2	5	786,5
II. Нематоды			
1. Золотистая картофельная нематода (<i>Globodera rostochiensis</i> (Woll.) Behrens)	29	179	78 792,87

III. Грибы			
1. Рак картофеля (<i>Synchytrium endobioticum</i> (Schilb.) Percival)	2	4	3,3
2. Фомопсис подсолнечника (<i>Diaporthe helianthi</i> Munt.-Cvet. et al.)	3	4	2 881
IV. Бактерии и фитоплазмы			
1. Бактериальный ожог плодовых культур (<i>Erwinia amylovora</i> (Burrill) Winslow et al.)	1	1	12,38
V. Вирусы и вириды			
1. Потивирус шарки (оспы) слив (Plum pox potyvirus)	2	2	8,8
VI. Растения			
1. Амброзия полыннолистная (<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.)	11	24	26 339,35
2. Амброзия трехраздельная (<i>Ambrosia trifida</i> L.)	5	15	14 389,43
3. Повилики (<i>Cuscuta</i> spp.)	27	76	231 521,56
4. Горчак ползучий (<i>Acroptilon repens</i> DC.)	7	7	180 743,08
5. Паслен трехцветковый (<i>Solanum triflorum</i> Nutt.)	1	1	2 929
6. Паслен колючий (<i>Solanum rostratum</i> Dun.)	1	1	119
7. Ценхрус длинноколючковый (<i>Cenchrus longispinus</i> (Hack.) Fern.)	1	1	1,89

Заключение

В Российской Федерации с 1 июля 2017 г. действует Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС. С 30 апреля 2018 г. вступило в силу Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 30 марта 2018 г. № 25 «О внесении изменений в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза», в соответствии с которым

один карантинный объект исключен из Единого перечня карантинных объектов ЕАЭС и 52 карантинных объекта в него включены.

Расширение Единого перечня карантинных объектов ЕАЭС позволяет предотвратить интродукцию на территорию Российской Федерации новых опасных видов при импортировании подкарантинной продукции. Кроме того, регулирование данных видов, включенных в

карантинные перечни других стран, повышает степень доверия к фитосанитарному состоянию российской продукции и обеспечивает более надежное выполнение фитосанитарных требований стран при экспорте из Российской Федерации.

Таким образом, Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС по состоянию на 1 января 2019 г. включает в себя 233 карантинных объекта, из которых 178 карантинных объектов

относятся к карантинным вредным организмам, отсутствующим на территории ЕАЭС (раздел I Единого перечня карантинных объектов ЕАЭС), а 55 – к карантинным вредным организмам, ограниченно распространенным на территории ЕАЭС (раздел II указанного перечня).

В 2018 году Россельхознадзором проконтролировано около 13,5 млн тонн и 2,45 млрд единиц различной растительной подкарантинной продукции, ввозимой в Российскую Федерацию. В такой продукции из 62 стран мира был предотвращен ввоз 54 видов карантинных объектов в 6 834 случаях (в 2017 году предотвращен ввоз 38 видов карантинных объектов в 4 521 случае). Ввоз на территорию Российской Федерации зараженной подкарантинной продукции был предотвращен.

По состоянию на 1 января 2019 г. на территории Российской Федерации установлены карантинные фитосанитарные зоны для 42 карантинных объектов: 23 видов вредителей растений, 9 видов возбудителей болезней растений, 2 видов нематод и 8 видов сорных растений.

Из 55 объектов Единого перечня карантинных объектов ЕАЭС, входящих в раздел II «Карантинные вредные организмы, ограниченно распространенные на территории Евразийского экономического союза» указанного перечня, в результате проведения карантинного фитосанитарного мониторинга выявлено 36 карантинных объектов, 19 карантинных объектов на территории Российской Федерации отсутствуют.

В 2018 году впервые на территории Российской Федерации установлены карантинные фитосанитарные зоны по 6 карантинным объектам, включая 5 видов насекомых (клоп дубовая кружевница, клоп платановая кружевница, коричнево-мраморный клоп, уссурийский полиграф, ясеневая изумрудная златка) и 1 вид нематод (соевая цистообразующая нематода).

Полностью упразднены карантинные фитосанитарные зоны по 1 виду – азиатской хлопковой совке.

Среди ограниченно распространенных карантинных видов вредителей растений в Российской Федерации наиболее распространены:

- калифорнийская щитовка (карантинные фитосанитарные зоны установлены в 194 районах 15 субъектов Российской Федерации);

- американская белая бабочка (карантинные фитосанитарные зоны установлены в 153 районах 13 субъектов Российской Федерации);

- восточная плодовая моль (карантинные фитосанитарные зоны установлены в 114 районах 16 субъектов Российской Федерации).

Из возбудителей болезней растений на территории Российской Федерации наибольшее распространение имеют фомопсис подсолнечника (карантинные фитосанитарные зоны установлены в 125 районах 10 субъектов Российской Федерации) и возбудитель бактериального ожога плодовых культур (карантинные фитосанитарные зоны установлены в 43 районах 13 субъектов Российской Федерации).

Среди карантинных вредных организмов, связанных с картофелем, наибольшее распространение имеет золотистая картофельная нематода (карантинные фитосанитарные зоны установлены в 778 районах 59 субъектов Российской Федерации).

Из карантинных видов сорных растений наибольшее распространение в Российской Федерации имеют:

- повилыки (карантинные фитосанитарные зоны установлены в 640 районах 67 субъектов Российской Федерации);

- амброзия полыннолистная (карантинные фитосанитарные зоны установлены в 356 районах 31 субъекта Российской Федерации);

- горчак ползучий (карантинные фитосанитарные зоны установлены в 192 районах 19 субъектов Российской Федерации).

В соответствии с результатами карантинного фитосанитарного мониторинга в 2018 году по сравнению с 2017 годом не изменилось карантинное фитосанитарное состояние только по 7 карантинным объектам – восточной каштановой орехотворке, черному крапчатому усачу, японскому жуку, возбудителям аскохитоза хризантем и белой ржавчины хризантем, виоиду ветрениковидности клубней картофеля и амброзии многолетней.

Размер карантинных фитосанитарных зон увеличился по 14 карантинным объектам, таким как американская белая бабочка, восточная плодовая моль, южноамериканская томатная моль, возбудитель бактериального ожога плодовых культур, потивирус шарки (оспы) слив, антракноз земляники, а также по 5 видам вредителей лесных культур (большой черный еловый усач, малый черный еловый усач, сибирский шелкопряд, черный бархатно-пятнистый усач, черный сосновый усач) и 3 видам сорных растений (амброзия полыннолистная, паслен колючий, паслен трехцветковый).

Всего на территории Российской Федерации было установлено 378 новых карантинных фитосанитарных зон по 30 карантинным объектам на общей площади 4 511 064,6 га. Из общего количества новых карантинных фитосанитарных зон 64% приходится на сорные растения, 22% – на вредителей растений и 9% – на 2 вида нематод. Остальные новые зоны приходятся на 2 вида бактерий, 1 вид вирусов и 1 вид грибов.

В результате проведения карантинных фитосанитарных мер и мероприятий по локализации очагов и ликвидации популяций карантинных объектов в 2018 году на территории Российской Федерации упразднено 3 847 карантинных фитосанитарных зон общей площадью 27 655 184,5 га по 25 видам карантинных объектов, в том числе упразднены карантинные фитосанитарные зоны по 4 видам вредителей леса на общей площади 26 958 817,2 га. При этом 97,5% общей площади упраздненных карантинных фитосанитарных зон приходится на 1 вид – азиатский подвид непарного шелкопряда (26 958 583 га).

В 2018 году упразднено 2 850 карантинных фитосанитарных зон общей площадью 78 792,9 га по золотистой картофельной нематоде.

Кроме того, в 2018 году упразднены карантинные фитосанитарные зоны общей площадью 456 043,3 га по 7 видам сорных растений.

На территории Российской Федерации в 2018 году полностью упразднены карантинные фитосанитарные зоны по азиатской хлопковой совке.

ДИАГНОСТИКА НЕПОВИРУСА КОЛЬЦЕВОЙ ПЯТНИСТОСТИ ТОМАТА (ToRSV) МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Ю.Н. Приходько, ведущий научный сотрудник НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР»
Т.С. Живаева, научный сотрудник НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР»

Аннотация. Вирус кольцевой пятнистости томата (ToRSV) является карантинным вредным организмом, включенным в списки А2 Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений и Евразийского экономического союза. Вирус имеет чрезвычайно широкий круг растений-хозяев, насчитывающий более 500 видов растений, и вызывает вредоносные болезни различных плодовых, ягодных, овощных и цветочных культур. У ToRSV известно пять серологически и генетически различающихся штаммов, что существенно затрудняет его диагностику.

В статье приводятся результаты испытания и валидации нескольких пар специфичных праймеров и зондов, используемых в мировой практике для диагностики ToRSV методом ПЦР в реальном времени, а также результаты экспериментов с праймерами и зондом, разработанными авторами к консервативному участку генома ToRSV.

Ключевые слова. Карантинный вредный организм, вирус кольцевой пятнистости томата, полимеразная цепная реакция, специфичные праймеры, специфичность, воспроизводимость, чувствительность.

Неповирус кольцевой пятнистости томата (ToRSV), имеющий североамериканское происхождение, представляет серьезную угрозу для сельского хозяйства Европы, поэтому внесен в Списки А2 карантинных объектов ЕОКЗР и ЕАЭС.

Подробные сведения о круге растений-хозяев, симптоматологии вызываемых болезней и биологии ToRSV приведены в № 4 (6) журнала «Карантин растений. Наука и практика» за

2013 год, а результаты исследований по диагностике этого вируса методом классической ПЦР – в № 2 (24) и 3 (25) указанного журнала за 2018 год.

В настоящее время методы, основанные на принципе полимеразной цепной реакции (ПЦР), заняли одно из ведущих мест в лабораторной диагностике фитопатогенов. Чаще всего используется классическая ПЦР с детекцией результатов (продуктов амплификации) посредством электрофореза в агарозном геле. Как известно, основными проблемами электрофореза являются вероятность контаминации ампликонами, использование канцерогенного бромистого этидия, сравнительно высокая трудоемкость и продолжительность проведения анализа. Многие из этих проблем позволяет устранить метод ПЦР в реальном времени, все более широко использующийся для проведения массовых скрининговых тестов.

В действующем диагностическом протоколе ЕОКЗР РМ 7/49 (1) (ЕРРО, 2005), регламентирующем методы выявления и идентификации ToRSV, метод ПЦР в реальном времени отсутствует, что существенно ограничивает возможности лабораторной экспресс-диагностики этого патогена.

По рассматриваемой проблеме проведено ограниченное количество исследований.

В США для выявления ToRSV методом ПЦР в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR Green были разработаны праймеры ToRSV1f/ToRSV1r и ToRSV2f/ToRSV2r (Stewart et al., 2007), а также праймеры ToRSV-1590f/ToRSV-1661r и TaqMan-зонд ToRSV-1610p (Osman et al., 2008). Все эти праймеры специфичны к участкам гена белка оболочки изоля-

тов ToRSV, вызывающих пожелтение жилок винограда, и реагируют преимущественно лишь с изолятами этого штамма.

В Новой Зеландии апробированы праймеры ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr и TaqMan-зонд ToRSV-UTRp, специфичные к высоко консервативным 3'-концевым нетранслируемым участкам (UTRs) РНК-1 и РНК-2 ToRSV. Эти праймеры выявляли все изучаемые изоляты ToRSV различной штаммовой принадлежности с чувствительностью до 12 копий целевого объекта (разведение 10^{-7}) и не реагировали с нецелевыми неповирусами подгрупп А, В и С (Tang et al., 2014).

В научно-методическом отделе фитопатологии ФГБУ «ВНИИКР» для выявления ToRSV методом ПЦР в реальном времени разработаны праймеры ToRSV-P6F/ToRSV-P6R и зонд ToRSV-P6P к этому же участку генома изолята ToRSV Chickadee. Компьютерный анализ с использованием программы Primer BLAST показал, что последовательность нуклеотидов разработанных нами праймеров соответствует последовательности нуклеотидов многочисленных изолятов ToRSV, депонированных в базе данных GenBank NCBI и относящихся к различным штаммам этого вируса.

Материалы и методы исследований

В работе были использованы следующие изоляты ToRSV: PV-0049, PV-0380 и PV-0381 DSMZ, положительные контроли для ИФА к ToRSV фирм Adgen Ltd, Bioreba AG и Loewe Biochemica GmbH.

Специфичность испытуемых праймеров оценивали с референтными изолятами следующих вирусов из кол-

Поз.	Описание	Реактор	Тип	α FAM	α R6G
A1	ПКО	ToRSV	ПКО	13,22	-
A2	ОКО	ToRSV	ОКО	-	-
A3	ОКО-В	ToRSV	ОКО-в	-	-
A4	ToRSV pv-0049	ToRSV	ИО	15,09	-
A5	ToRSV pv-0380	ToRSV	ИО	12,52	-
A6	ToRSV pv-0381	ToRSV	ИО	12,54	-
A7	ToRSV, +К, Bioreba	ToRSV	ИО	-	-
A8	ToRSV, +К, Adgen	ToRSV	ИО	14,95	-
B1	ToRSV, +К, Loewe	ToRSV	ИО	15,38	-

Лунка	Флуор.	Мишень	Содерж.	Проба	Cq	Среднее Cq	Стандартное отклонение Cq
B02	FAM		Неизвестно	ToRSV pv-0049	14,46	14,46	0,000
B04	FAM		Неизвестно	ToRSV pv-0380	11,85	11,85	0,000
B06	FAM		Неизвестно	ToRSV pv-0381	11,12	11,12	0,000
B08	FAM		Неизвестно	+К, Bioreba	29,56	29,56	0,000
B10	FAM		Неизвестно	+К, Adgen	14,23	14,23	0,000
D02	FAM		Неизвестно	+К, Loewe	14,55	14,55	0,000
D04	FAM		Неизвестно	-К1	Н/О	0,00	0,000

Рис. 1. Выявление изолятов ToRSV методом двухэтапной ОТ-ПЦР-РВ с использованием праймеров ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr, зонда ToRSV-UTRp (Tang et al., 2014), комплекта реагентов qPCRMix-HS (Евроген) и амплификаторов АНК-32 и CFX:

а) АНК-32 (Синтол) б) CFX (Bio-Rad)

Выделение РНК – набором «Проба-НК» (Агродиагностика), реакция ОТ – с набором для обратной транскрипции First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific) и праймерами Random dN₆ + Oligo(dT)₁₈

Образцы: 1) изолят ToRSV PV-0049 DSMZ4; 2) изолят ToRSV PV-0380 DSMZ4; 3) изолят ToRSV PV-0381 DSMZ4; 4) положительный контроль для ИФА к ToRSV фирмы Bioreba; 5) положительный контроль для ИФА к ToRSV фирмы Adgen; 6) положительный контроль для ИФА к ToRSV фирмы Loewe; 7) отрицательный контроль (вода)

Fig. 1. Detection of ToRSV isolates by two-step real-time RT-PCR using ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr primers, ToRSV-UTRp probe (Tang et al., 2014), qPCRMix-HS reagent kit (Evrogen) and ANC-32 and CFX amplifiers:

а) ANC-32 (Sintol) б) CFX (Bio-Rad)

RNA isolation – “Proba-NK” set (Agrodiagnostika), RT reaction – with First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific) and Random dN₆ + Oligo(dT)₁₈ primers

Samples: 1) isolate ToRSV PV-0049 DSMZ4; 2) isolate ToRSV PV-0380 DSMZ4; 3) isolate ToRSV PV-0381 DSMZ4; 4) positive control for ELISA to ToRSV produced by Bioreba; 5) positive control for ELISA to ToRSV produced by Adgen; 6) positive control for ELISA to ToRSV produced by Loewe; 7) negative control (water)

лекции DSMZ: неповирусом скручивания листьев черешни (CLR), мозаики резухи (AgMV), черной кольчатости томата (TBRV), кольцевой пятнистости малины (RpRSV), черной кольцевой пятнистости картофеля (PBRV), кольцевой пятнистости табака (TRSV), садавируса латентной кольцевой пятнистости земляники (SLRSV), триховируса хлоротической пятнистости листьев яблони (ACLSV), капилловируса бороздчатости древесины яблони (ASGV), альфамовируса мозаики люцерны (AMV), иларвируса мозаики яблони (ArMV), иларвируса американского линейного узора сливы (APLPV), иларвируса некротической кольцевой пятнистости косточковых (PNRSV), иларвируса карликовости сливы (PDV), потивируса шарки слив (PPV).

В качестве отрицательного контроля использовали различные здоровые растения.

Выделение РНК изучаемых вирусов проводили комплектами реагентов для выделения нуклеиновых кислот отечественных производителей: «Проба-НК» фирмы ООО «Агродиагностика» (Россия), «НК-М-Сорб», «Фито-Сорб» и «М-Сорб-Туб-Автомат» фирмы ЗАО «Синтол» (Россия).

Наборы использовали согласно инструкциям фирм-производителей.

Реакцию обратной транскрипции для синтеза первой цепи кДНК ToRSV проводили со следующими наборами реагентов для обратной транскрипции: MMLV RT Kit (Евроген, Россия), Sensiscript RT Kit и Omniscript RT Kit (Qiagen, Нидерланды), First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, США) и фирмы Агродиагностика.

Для выявления ToRSV методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) были испытаны следующие праймеры и зонды: ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr, зонд ToRSV-UTRp (Tang et al., 2014), ToRSV-P6F/ToRSV-P6R, зонд ToRSV-P6P (ВНИИКР), ToRSV-1f/ToRSV-1r и ToRSV-2f/ToRSV-2r (Stewart et al., 2007), а также набор реагентов для выявления ToRSV методом ПЦР в реальном времени фирмы Агродиагностика.

Характеристика всех испытываемых праймеров и зондов представлена в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика праймеров, использованных для отработки диагностики ToRSV методом ПЦР в реальном времени

Название праймера	Мишень в геноме	Последовательность 5'→3'	Длина продукта, п.о.	Tm	Автор
ToRSV-UTRf	3'-UTR	GAATGGTTCCCAGCCACT	110	60	Tang et al., 2014
ToRSV-UTRr		AGTCTCAACTTAACATACCAC			
ToRSV-UTRp		FAM-AGGATCGCTACTCCTCCGTCAAC-BHG			
ToRSV-P6F	3'-UTR	CATGTGTAAGTGTGACGGAGGAGTA	68	60	ВНИИКР
ToRSV-P6R		CGGCCCGGGAATTAC			
ToRSV-P6P		FAM-ATCCTCTACCACGCAGGGCCGG-BHG			
ToRSV-1f	CP	TACCAATTCATGTGTTATTTTCG	130	58,0	Stewart et al., 2007
ToRSV-1r		ACTCAAACCTCCAGTCATCG			
ToRSV-2f	CP	GACTGGAGGTTTGAGTGGC	330	55,0	Stewart et al., 2007
ToRSV-2r		CTCACGTAATGTATGGTTCC			

Для постановки ПЦР-ПВ в экспериментах с ToRSV были испытаны следующие коммерческие наборы реагентов: 2,5x реакционная смесь для проведения ПЦР-ПВ, 2,5x реакционная смесь для проведения ПЦР-ПВ с красителем ROX, 2,5x реакционная смесь для проведения ПЦР-ПВ с красителем SYBR Green-1 (все – Синтол, Россия), qPCRmix-HS, qPCRmix-HS ROX, qPCRmix-HS SYBR + High ROX (все – Евроген, Россия), SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System, SuperScript qRT-PCR SYBR (оба – Invitrogen, США), Express One-Step SuperScript qRT-PCR Kit (Qiagen, США), базовый комплект реагентов № 2 (Агродиагностика, Россия).

Была проведена также валидация «Комплекта реагентов для ПЦР-ПВ кДНК ToRSV» фирмы Агродиагностика (Россия).

ПЦР проводили на амплификаторах АНК-32 (Синтол, Россия), ДТ-лайт (ДНК-Технология, Россия), CFX и JQ-5 (Bio-Rad, США), StepOnePlus™ Instrument (Applied Biosystems, США).

Результаты исследований

ПЦР-ПВ с праймерами ToRSV-P6F/ToRSV-P6R и зондом ToRSV-P6P (Tang et al., 2014) обрабатывали в одноэтапном и двухэтапном форматах.

Двухэтапный формат проведения ПЦР предусматривает раздельное проведение реакций обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Преимуществом данной модификации является возможность

многократного использования синтезированной кДНК, а недостатком является необходимость проведения двух отдельных реакций, что удлиняет время проведения анализов.

В предварительных экспериментах было установлено существенное влияние комплектов реагентов для обратной транскрипции. Наиболее эффективное выявление ToRSV было достигнуто после синтеза кДНК с комплектом реагентов First Strand cDNA Synthesis Kit фирмы ThermoScientific и смесью универсальных праймеров Random dN₆ + Oligo(dT)₁₈. Использование наборов реагентов для обратной транскрипции фирмы Агродиагностика (Россия), MMLV RT Kit фирмы Евроген (Россия) и Omniscript RT Kit фирмы Qiagen (США) не обеспечивало синтез кДНК отдельных испытуемых изолятов ToRSV.

Проведенные эксперименты показали возможность эффективного выявления ToRSV методом ПЦР в режиме реального времени в двухэтапном формате с использованием праймеров ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr, зонда ToRSV-UTRp и нескольких наборов реагентов для ПЦР-ПВ, из которых преимущество в плане выявления всех изучаемых изолятов целевого объекта имели наборы qPCRmix-HS фирмы Евроген, 2,5x реакционная смесь для ПЦР-ПВ фирмы Синтол и базовый комплект реагентов для ПЦР-ПВ № 2 фирмы Агродиагностика.

При проведении тестов на двух различных амплификаторах вос-

производительность результатов составила 92,8% (рис. 1).

Определение аналитической чувствительности двухэтапной ПЦР в реальном времени было проведено для двух референтных изолятов ToRSV (PV-0049 и PV-0380 DSMZ) с кДНК, синтезированной набором для обратной транскрипции фирмы Агродиагностика с использованием 2,5x реакционной смеси для ПЦР-ПВ фирмы Синтол и двух различных амплификаторов. Аналитическая чувствительность выявления изолята PV-0380 составила соответственно 10⁻⁶ и 10⁻⁴ при проведении анализа на амплификаторах ДТ-лайт (ДНК-Технология) и АНК-32 (Синтол) соответственно. Аналитическая чувствительность выявления изолята PV-0049 оказалась несколько менее высокой и составила 10⁻⁴ и 10⁻³ при проведении анализа на амплификаторах ДТ-лайт (ДНК-Технология) и АНК-32 (Синтол) соответственно.

Одноэтапный формат проведения ПЦР предусматривает проведение реакций обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в одной пробирке путем последовательного изменения термоциклических режимов. Преимуществом данной модификации является сокращение времени проведения анализов и минимализация возможности контаминации.

Проведенные эксперименты показали возможность эффективного, высокоспецифичного и высокочувстви-

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fem	Ср, Hex	Результат
A1	ToRSV_pv-0380,конц.	8,6		+
A2	ToRSV_pv-0380,1/10	11,7		+
A3	ToRSV_pv-0380,1/100	15,5		+
A4	ToRSV_pv-380,1/1000	18,5		+
A5	ToRSV_pv-0380,1/10000	22,5		+
A6	ToRSV_pv-0380,1/100000	26,1		+
A7	ToRSV_pv-0380,1/1000000	29,6		+
A8	ToRSV_pv-0380,1/10000000	33,5		+
B1	-K1			-
B2	ToRSV_pv-0049,конц.	14,4		+
B3	ToRSV_pv-0049,1/10	17,8		+
B4	ToRSV_pv-0049,1/100	21,6		+
B5	ToRSV_pv-0049,1/1000	24,8		+
B6	ToRSV_pv-0049,1/10000	28,0		+
B7	ToRSV_pv-0049,1/100000	31,7		+
B8	ToRSV_pv-0049,1/1000000	34,6		+
C1	ToRSV_pv-0049,1/10000000			-
C2	K-			-
C3	K+	9,9		+

Рис. 2. Оценка чувствительности выявления двух референтных изолятов ToRSV методом одноэтапной ОТ-ПЦР-ПВ с набором реагентов «SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit» фирмы Invitrogen, праймерами ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr и зондом ToRSV-UTRp на амплификаторе ДТ-лайт (ДНК-Технология)

Fig. 2. Sensitivity assessment of two ToRSV reference isolates detection by one-step real-time RT-PCR method with SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit reagent set of Invitrogen, ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr primers and ToRSV-UTRp probe on DT-light amplifier (DNK-Technologia)

тельного выявления ToRSV методом ПЦР в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-ПВ) в одноэтапном формате с использованием праймеров ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr, зонда ToRSV-UTRp (Tang et al., 2014) и нескольких наборов реагентов для ПЦР-ПВ.

При этом установлена возможность использования для ОТ-ПЦР-ПВ как полных наборов реагентов, содержащих в своем составе ревертазу MMLV (SuperScript III Platinum One-Step Quantitative System и Express One-Step SuperScript qRT-PCR Kit фирмы Invitrogen), так и наборов для ПЦР-ПВ отечественных фирм-производителей Синтол (наборы 2,5x реакционная смесь для ПЦР-ПВ и 2,5x реакционная смесь для ПЦР-ПВ с красителем ROX) и Евроген (наборы qPCRMix-HS и qPCRMix-HS + ROX), для использования которых в одноэтапном формате необходимо дополнительное внесение в состав реакционной смеси 1 мкл ревертазы MMLV. Эффективное выявление всех изучаемых изолятов ToRSV обеспечивало использование наборов реагентов SuperScript III Platinum One-Step Quantitative

System (Invitrogen), 2,5x реакционной смеси для ПЦР-ПВ и 2,5x реакционной смеси для ПЦР-ПВ с красителем ROX (оба – Синтол). Набор реагентов qPCRMix-HS (Евроген) уступал вышеперечисленным мастер-миксам по чувствительности и воспроизводимости результатов.

При использовании набора реагентов SuperScript III Platinum One-Step Quantitative System Kit фирмы Invitrogen (США) выявление изолята PV-0380 достигалось при разведении кДНК до 10^{-7} , а изолята PV-0039 – при разведении 10^{-6} (рис. 2). В экспериментах с наборами реагентов qPCRMix-HS фирмы Евроген и 2,5x реакционной смесью для проведения ПЦР-ПВ фирмы Синтол чувствительность варьировала от 10^{-2} до 10^{-4} . Таким образом, установлено, что чувствительность выявления ToRSV методом одноэтапной ПЦР-ПВ с праймерами ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr и зондом ToRSV-UTRp напрямую зависит от используемых наборов реагентов.

Установлено, что праймеры ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr и зонд ToRSV-UTRp (Tang et al., 2014) ха-

рактеризуются высокой специфичностью. Эти праймеры реагировали лишь с референтными изолятами ToRSV PV-0049, PV-0380 и PV-0381 и не реагировали с референтными изолятами других неповирусов – ArMV, BRSV, CLRV, GFLV, PBRV, RpRSV, TBRV, TRSV, близкородственного к ним SLRSV, а также других вирусов, заражающих плодовые и ягодные культуры.

Наборы реагентов, содержащих интеркалирующий краситель SYBR Green: 2,5x реакционная смесь для ПЦР-ПВ с красителем SYBR Green-1 фирмы Синтол и qPCRMix-HS SYBR + High ROX фирмы Евроген – индуцировали ложноположительную реакцию в отрицательных контрольных образцах при их испытании как в одноэтапном, так и в двухэтапном формате. Ввиду этого данные наборы реагентов не могут быть рекомендованы для выявления ToRSV.

Праймеры ToRSV-P6F/ToRSV-P6R и зонд ToRSV-P6P разработаны в ФГБУ «ВНИИКР» к 3'-нетранслируемому участку РНК-2 изолята ToRSV Chikadee, выявленному на яблоне в США и характеризующемуся существенными генетическими отличиями от изолятов других штаммов ToRSV.

Установлено, что эти праймеры характеризуются высокой специфичностью, что вытекает из отсутствия их реакции с референтными изолятами девяти близкородственных неповирусов. Однако эффективность выявления целевого объекта при использовании этих праймеров и зонда существенно варьирует в зависимости от используемых комплектов реагентов для ПЦР-ПВ, что обуславливает относительно низкую воспроизводимость тестов. Для повышения воспроизводимости тестов необходимы дополнительные исследования. Из числа испытанных наборов реагентов для выявления ToRSV с праймерами ToRSV-P6F/ToRSV-P6R и зондом ToRSV-P6P наиболее целесообразно использовать наборы: SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System фирмы Invitrogen (США) и qPCRMix-HS фирмы Евроген (таблица 2). Лишь при использовании этих наборов реагентов были достигнуты 100% повторяемость и воспроизводимость результатов.

Таблица 2

Выявление ToRSV методом одноэтапной ОТ-ПЦП-ПВ с использованием праймеров ToRSV-P6F/ToRSV-P6R, зонда ToRSV-P6P (НМОФ ВНИИКР) и набора реагентов qPCRmix-HS фирмы Евrogen

Well	Fluor	Type	Identifier	Replicate #	Threshold Cycle (Ct)	Ct Mean	Ct Std. Dev	Set Point
B02	FAM	Unkn	ToRSV pv – 0049	1	18,92	18,92	N/A	N/A
B04	FAM	Unkn	ToRSV pv – 0380	2	31,10	31,10	N/A	N/A
B06	FAM	Unkn	ToRSV pv – 0381	3	30,16	30,16	N/A	N/A
B08	FAM	Unkn	ToRSV K+ Adgen	4	20,36	20,36	N/A	N/A
B10	FAM	Unkn	ToRSV K+ Loewe	5	22,16	22,16	N/A	N/A
D02	FAM	Unkn	ToRSV K+ Bioreba	6	37,41	37,41	N/A	N/A
D04	FAM	Unkn	K-	7	N/A	00,00	N/A	N/A
D06	FAM	Unkn	K+	8	17,51	17,51	N/A	N/A

Ввиду индуцирования ложноположительной реакции в отрицательных контрольных образцах констатирована непригодность использования для выявления ToRSV с праймерами ToRSV-P6F/ToRSV-P6R и зондом ToRSV-P6P наборов реагентов, содержащих интеркалирующий краситель SYBR Green.

Набор реагентов «Комплект реагентов для ПЦП-ПВ ToRSV» реализуется фирмой Агродиагностика (Россия) для выявления целевого объекта методом 2-этапной ПЦП-ПВ.

Установлено, что праймеры, используемые в «Комплексе реагентов для ПЦП-ПВ кДНК ToRSV» фирмы Агродиагностика, характеризуются достаточно высокой специфичностью, так как не реагируют с нецелевыми объектами – неповирусами ArMV, BRSV, CLRV, GFLV, PBRV, RpRSV, TBRV, TRSV и близкородственным вирусом латентной кольцевой пятнистости земляники (SLRSV).

Однако испытуемые праймеры выявляли лишь два изолята целевого объекта (изоляты ToRSV PV-0380 и PV-0381 DSMZ) и не реагировали с изолятом ToRSV PV-0049. Использование нескольких вариантов обратной транскрипции и различных амплификаторов не способствовало выявлению изолята PV-0049.

Праймеры ToRSV-1f/ToRSV-1r и ToRSV-2f/ToRSV-2r, комплементарные участку гена белка обо-

лочка ToRSV, разработаны в США (Stewart et al., 2007) и предназначены для выявления целевого объекта методом ПЦП в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green.

При предварительных испытаниях данных праймеров были получены неудовлетворительные результаты.

В экспериментах с праймерами ToRSV-1f/ToRSV-1r положительная реакция на чрезмерно высоких пороговых циклах (Ct = 37,5-37,8) была получена лишь для положительных контролей для ИФА к ToRSV фирм Bioreba и Adgen.

В двух экспериментах с праймерами ToRSV-2f/ToRSV-2r положительная реакция наблюдалась для 3-5 положительных образцов из шести испытуемых, но преимущественно также на чрезмерно высоких пороговых циклах.

Таким образом, установлена возможность эффективного выявления изолятов ToRSV методом ПЦП в реальном времени с праймерами и зондами UTRf/ToRSV-UTRr/ToRSV-UTRp (Tang et al., 2014) и ToRSV-P6F/ToRSV-P6R/ToRSV-P6P (ВНИИКР). Проведение ОТ-ПЦП-ПВ возможно как в одноэтапном, так и в двухэтапном форматах. Тесты с данными праймерами характеризуются высокой специфичностью, чувствительностью и обеспечивают удовлетворительную воспроизводимость результатов.

Литература

1. EPP0, 2005. Tomato ringspot nepovirus. Diagnostic protocol PM 7/49 (1) // Bulletin OEPP/EPP0 Bulletin, 2005. Vol. 35. P. 313-318.
2. Fuchs G.S. Association of Tobacco ringspot virus, Tomato ringspot virus and *Xiphinema americanum* with decline of highbush blueberry in New York // 21st Int. Conf. on Virus and Graft Transmissible Diseases of Fruit Trees, 2010. P. 15-17.
3. Gambino G., Gribaudo I. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control // Phytopathology, 2006. Vol. 96. P. 1223-1229.
4. Osman F., Leutenegger C., Golino D., Rowhani A. Comparison of low-density array, RT-PCR and TaqMan RT-PCR in detection of grapevine viruses // J. Virol. Methods, 2008. Vol. 149. P. 292-299.
5. Stewart E.L., Qu X., Overton B.E., Gildow F.E., Nancy G. Wenner N.G., Grove D.S. Development of a real-time RT-PCR SYBR Green assay for Tomato ring spot virus in grape // Plant Disease, 2007. Vol. 91. P. 1083-1088.
6. Tang J., Khan S., Delmiglio C., Ward L.I. Sensitive detection of Tomato ringspot virus by real-time TaqMan RT-PCR targeting the conserved 3'-UTR region // Journal of Virological Methods, 2014. Vol. 201. P. 38-43.

TOMATO RINGSPOT VIRUS (ToRSV) DIAGNOSIS USING RT-PCR

Iu.N. Prikhodko, Leading Researcher of RMDVB of FGBU "VNIKR"
T.S. Zhivaeva, Researcher of RMDVB of FGBU "VNIKR"

Abstract. *Tomato ringspot virus (ToRSV) is a quarantine pest included in the A2 Lists of the European and Mediterranean Plant Protection Organization and the Eurasian Economic Union. The virus has an extremely wide range of host plants with more than 500 plant species and causes harmful diseases in various fruit, berry, vegetable and flower crops. ToRSV has five known serologically and genetically different strains, which makes it very difficult to diagnose.*

The article presents the results of testing and validation of several pairs of specific primers used for diagnostics of Tomato ringspot virus ToRSV using real-time PCR in the world practice as well as the results of experiments with primers and probes developed by the authors for the conservative genome region of ToRSV.

Keywords. *Quarantine pest, tomato ringspot virus (ToRSV), polymerase chain reaction, specific primers, specificity, reproducibility, sensitivity.*

ToRSV, which is of North American origin, is a serious threat to the agriculture of Europe, and therefore is included in the A2 Lists of the quarantine objects of the EPPO and the EAEU.

Detailed information on host range, symptoms of diseases and biology of ToRSV are given in the journal "Plant Health. Research and Practice" for 2013, and the results of studies on the diagnosis of this virus by conventional PCR method – in No. 2 (24) and 3 (25) of this journal for 2018.

Nowadays, methods based on the polymerase chain reaction (PCR) principle have taken a leading place in the laboratory diagnosis of phytopathogens. The most commonly used method is conventional PCR with the detection of results (amplification

products) by means of electrophoresis in agarose gel. It is known that the main problems of electrophoresis are the probability of contamination with amplicones, the use of carcinogenic ethidium bromide, relatively high labor input and duration of the analysis. Many of these problems have led to the elimination of the real-time PCR method, which is increasingly being used for mass screening tests.

In the current EPPO diagnostic protocol PM 7/49 (1) (EPPO, 2005), which regulates the methods of detection and identification of ToRSV, there is no real-time PCR method, which significantly limits the possibilities of laboratory rapid diagnosis of this pathogen.

A limited number of studies have been conducted on the problem under consideration.

In the United States of America, detection of ToRSV using real-time PCR with SYBR Green intercalating dye was developed by ToRSV1f/ToRSV1r and ToRSV2f/ToRSV2r primers (Stewart et al., 2007) as well as ToRSV-1590f/ToRSV-1661r and TaqMan-probe ToRSV-1610p (Osman et al., 2008). All of these primers are specific to regions of the coat protein gene of ToRSV isolates that cause yellowing of grape veins, and react predominantly with the isolates of this strain.

ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr and TaqMan-probe ToRSV-UTRp primers have been tested in New Zealand, which are specific to highly conservative 3'-terminal nontranslated regions (UTRs) of RNA-1 and RNA-2 ToRSV. These primers identified all ToRSV isolates of different strains studied with a sensitivity of up to 12 copies of the target object (dilution 10^{-7}) and don't react with non-targeted nepovi-

ruses of subgroups A, B, and C (Tang et al., 2014).

ToRSV-P6F/ToRSV-P6R primers and ToRSV-P6P probe to the same region of ToRSV Chickadee isolate genome were developed in Phytopathology Research and Methodology Department of FGBU "VNIKR" to detect ToRSV using RT-PCR method. Computer analysis using the Primer BLAST program showed that the sequence of nucleotides of the developed primers corresponds to the sequence of nucleotides of numerous ToRSV isolates deposited in the NCBI GenBank database and belonging to different strains of this virus.

Materials and research methods

The following ToRSV isolates were used in the work: PV-0049, PV-0380 and PV-0381 DSMZ, positive controls for ELISA to ToRSV of Adgen Ltd, Bioreba AG and Loewe Biochemica GmbH.

The specificity of the studied primers was assessed using reference isolates of the following viruses from the DSMZ collection: cherry leaf roll virus (CLR), Arabis mosaic virus (ArMV), tomato black ring nepovirus (TBRV), raspberry ringspot virus (RpRSV), potato black ringspot nepovirus (PBRV), tobacco ringspot nepovirus (TRSV), strawberry latent ringspot sadwavirus (SLRSV), apple chlorotic leaf spot trichovirus (ACLSV), apple stem grooving capillovirus (ASGV), alfalfa mosaic alfamovirus (AMV), apple mosaic ilarvirus (APMV), American plum line pattern ilarvirus (APLPV), prunus necrotic ringspot ilarvirus (PNRSV), prune dwarf ilarvirus (PDV), plum pox potyvirus (PPV).

Various healthy plants were used as a negative control.

RNA isolation of the viruses was carried out with the use of following kits

of reagents for nucleic acids isolation of local production: kit “Proba-NK” produced by OOO “Agrodiagnostika” (Russia); kits “NK-M-Sorb”, “Phyto-Sorb” and “M-Sorb-Tub-Avtomat” produced by ZAO “Sintol” (Russia).

The kits were used according to manufacturer’s instructions.

Reverse transcription reaction for first-strand synthesis of the ToRSV cDNA was performed using following reagents kits for reverse transcription: MMLV RT Kit (Evrogen, Russia), Sensiscript RT Kit and Omniscript RT Kit (Qiagen, the Netherlands), First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoScientific, USA) and company “Agrodiagnostika”.

The following primers and probes were tested to detect ToRSV using real-time PCR: ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr, ToRSV-UTRp probe (Tang et al., 2014), ToRSV-P6F/ToRSV-P6R, ToRSV-P6P (VNIKR), ToRSV-1f/ToRSV-1r and ToRSV-2f/ToRSV-2r (Stewart et al., 2007), as well as a set reagents for detection of ToRSV by real-time PCR the company “Agrodiagnostika”.

The characteristics of the used primers and probes are shown in the Table 1.

Following commercial kits of reagents were tested for ToRSV detection by real-time PCR: 2.5x reaction mixture for RT-PCR, 2.5x reaction mixture with ROX dye for RT-PCR, 2.5x reaction mixture with SYBR Green-1 dye for RT-PCR (all – Sintol, Russia), qPCRMix-HS, qPCRMix-HS

ROX, qPCRMix-HS SYBR + High ROX (all – Evrogen, Russia), SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System, SuperScript qRT-PCR SYBR (both – Invitrogen, USA), Express One-Step SuperScript qRT-PCR Kit (Qiagen, USA), Basic Reagent Kit No. 2 (Agrodiagnostika, Russia).

The validation of the “Package of reagents for RT-PCR of Agrodiagnostika (Russia) cDNK ToRSV” was also carried out.

PCR was performed on amplifiers ANK-32 (Sintol, Russia), DT-light (DNK-Technologia, Russia), CFX and JQ-5 (Bio-Rad, USA) and StepOne-Plus™ Instrument (Applied Biosystems, USA).

Research results

Real-time PCR with ToRSV-P6F/ToRSV-P6R primers and ToRSV-P6P probe (Tang et al., 2014) were tested in one-step and two-step formats.

The two-step PCR format includes separate reverse transcription and polymerase chain reaction. The advantage of this modification is the possibility of multiple use of the synthesized cDNA, and the disadvantage is the need for two separate reactions, which extends the time of analysis.

In preliminary experiments, a significant influence of reagent kits for reverse transcription was established. The most effective detection of ToRSV was achieved after the synthesis of cDNA with the First Strand cDNA

Synthesis Kit (ThermoScientific) and a mixture of universal primers Random dN₆ + Oligo(dT)₁₈. The use of reagent kits for reverse transcription manufactured by Agrodiagnostika (Russia), MMLV RT Kit (Evrogen, Russia), and Omniscript RT Kit (Qiagen, USA) did not provide for the synthesis of cDNA of individual ToRSV isolates undergoing testing.

The experiments showed the possibility of effective detection of ToRSV by RT-PCR in a two-step format using ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr primers, ToRSV-UTRp probe and several sets of reagents for real-time PCR of which the sets qPCRMix-HS (Evrogen), 2.5x reaction mixture for real-time PCR (Sintol) and the basic kit of reagents for real-time PCR No. 2 (Agrodiagnostika) had an advantage in terms of detecting all the studied isolates of the target object.

When testing on two different amplifiers, the reproducibility of the results was 92.8% (Fig. 1).

Analytical sensitivity of the two-step RT-PCR was determined for two ToRSV reference isolates (PV-0049 and PV-0380 DSMZ) with cDNA synthesized by the Agrodiagnostika reverse transcription kit using a 2.5-x reaction mixture for real-time PCR (Sintol) and two different amplifiers. Analytical sensitivity of PV-0380 isolate detection was 10⁻⁶ and 10⁻⁴, respectively, when analyzed on amplifiers DT-Lite (DNK-Technologia) and ANK-32 (Sintol) respectively. The analytical sensitivity of the PV-0049 iso-

Table 1
Characteristics of primers used to test the diagnosis of ToRSV by real-time PCR

Primer name	Target site	Sequence 5'→3'	PCR product size, bp	Tm	Author
ToRSV-UTRf	3'-UTR	GAATGGTTCCCAGCCACT	110	60	Tang et al., 2014
ToRSV-UTRr		AGTCTCAACTTAACATACCAC			
ToRSV-UTRp		FAM-AGGATCGCTACTCCTCCGTCAAC-BHG			
ToRSV-P6F	3'-UTR	CATGTGTACTGTTGACGGAGGAGTA	68	60	VNIKR
ToRSV-P6R		CGGCCCCGGGAATTAC			
ToRSV-P6P		FAM-ATCCTCTACCACGCAGGGCCGG-BHG			
ToRSV-1f	CP	TACCAATTCATGTGTATTTCG	130	58.0	Stewart et al., 2007
ToRSV-1r		ACTCAAACCTCCAGTCATCG			
ToRSV-2f	CP	GACTGGAGGTTTGAGTGGC	330	55.0	Stewart et al., 2007
ToRSV-2r		CTCACGTAAATGTATGGTTCC			

late detection was slightly lower and was 10^{-4} and 10^{-3} , respectively, when analyzed on the DT-light (DNK-Technologia) and ANK-32 (Sintol) amplifiers respectively.

One-step PCR format provides the use reverse transcription and polymerase chain reaction reactions in a single tube by sequentially changing the thermocyclic modes. The advantage of this modification is the reduction of analysis time and minimization of the possibility of contamination.

The experiments showed the possibility of effective, highly specific and highly sensitive detection of ToRSV by real-time RT-PCR in a one-step format using ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr primers and ToRSV-UTRp probe (Tang et al., 2014) and several sets of reagent kits for real-time PCR.

At the same time, it is possible to use both complete reagents kits for real-time RT-PCR containing MMLV reverse transcriptase (SuperScript III Platinum One-Step Quantitative System and Express One-Step SuperScript qRT-PCR Kit of Invitrogen) and kits for real-time PCR by domestic manufacturers Sintol (kits 2.5x real-time-PCR reaction mixture and 2.5x real-time-PCR reaction mixture with ROX dye) and Evrogen (qPCRMix-HS and qPCRMix-HS + ROX kits), which require additional application of 1 μ l MMLV revertase to the reaction mixture in a one-step format. Effective detection of all ToRSV isolates under study ensured the use of SuperScript III Platinum One-Step Quantitative System (Invitrogen), 2.5x real-time PCR

reaction mixture and 2.5x real-time PCR reaction mixture with ROX dye (both – Sintol). The kit of qPCRMix-HS (Evrogen) reagents was inferior to the abovementioned master-mixes on sensitivity and reproducibility of results.

Using a kit of reagents SuperScript III Platinum One-Step Quantitative System Kit of Invitrogen (USA), the detection of PV-0380 isolate was achieved when diluting cDNA up to 10^{-7} , and PV-0039 isolate – when diluting to 10^{-6} (Fig. 2). In experiments with qPCRMix-HS reagent kits (Evrogen) and 2.5x Sintol RT-PCR reagent mixture the sensitivity varied from 10^{-2} to 10^{-4} . Thus, it was established that the sensitivity of ToRSV detection by single-step real-time PCR method with ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr primers and ToRSV-UTRp probe directly depends on the reagent kits used.

The ToRSV-UTRf/ToRSV-UTRr primers and the ToRSV-UTRp probe (Tang et al., 2014) were found to be highly specific. These primers reacted only with ToRSV reference isolates PV-0049, PV-0380 and PV-0381 and did not react with reference isolates of other nepoviruses, such as ArMV, BRSV, CLRV, GFLV, PBRV, RPRV, TBRV, TRSV, closely related to them SLRSV, and other viruses infecting fruit and berry crops.

Kits of reagents containing SYBR Green intercalating dye: 2.5x real-time PCR reaction mixture with SYBR Green-1 dye (Sintol) and qPCRMix-HS SYBR + High ROX (Evrogen) induced a false positive reaction in negative control samples during their testing

in both single- and two-step formats. Therefore, these reagent kits cannot be recommended for the detection of ToRSV.

To RSV-P6F/ToRSV-P6R primers and ToRSV-P6P probe have been developed by FGBU “VNIKR” to the 3'-non-broadcasted area of ToRSV Chikadee ToRSV-2 isolate detected on an apple tree in the USA and characterized by significant genetic differences from other ToRSV isolates.

It has been established that these primers are characterized by high specificity, which results from the absence of their reaction with reference isolates of nine closely related nepoviruses. However, the effectiveness of target object detection when using these primers and the probe varies significantly depending on the reagent kits used for real-time PCR, which results in relatively low reproducibility of the tests. Additional research is needed to increase the repeatability of the tests. Of the tested ToRSV reagent kits with ToRSV-P6F/ToRSV-P6R primers and ToRSV-P6P probe, it is most expedient to use SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System by Invitrogen (USA) and qPCRMix-HS by Evrogen (Table 2). Only with the use of these reagent kits were 100% repeatability and reproducibility of the results achieved.

Due to the induced false-positive response, the negative control samples were found to be unsuitable for the detection of ToRSV with ToRSV-P6F/ToRSV-P6R primers and ToRSV-P6P probe reagent kits containing SYBR Green intercalating dye.

Table 2
Detection of ToRSV by one-step real-time RT-PCR using ToRSV-P6F/ToRSV-P6R primers, ToRSV-P6P probe (RMDVB of FGBU “VNIKR”) and qPCRMix-HS reagent kit (Evrogen)

Well	Fluor	Type	Identifier	Replicate #	Threshold Cycle (Ct)	Ct Mean	Ct Std. Dev	Set Point
B02	FAM	Unkn	ToRSV pv – 0049	1	18.92	18.92	N/A	N/A
B04	FAM	Unkn	ToRSV pv – 0380	2	31.10	31.10	N/A	N/A
B06	FAM	Unkn	ToRSV pv – 0381	3	30.16	30.16	N/A	N/A
B08	FAM	Unkn	ToRSV K+ Adgen	4	20.36	20.36	N/A	N/A
B10	FAM	Unkn	ToRSV K+ Loewe	5	22.16	22.16	N/A	N/A
D02	FAM	Unkn	ToRSV K+ Bioreba	6	37.41	37.41	N/A	N/A
D04	FAM	Unkn	K-	7	N/A	00.00	N/A	N/A
D06	FAM	Unkn	K+	8	17.51	17.51	N/A	N/A

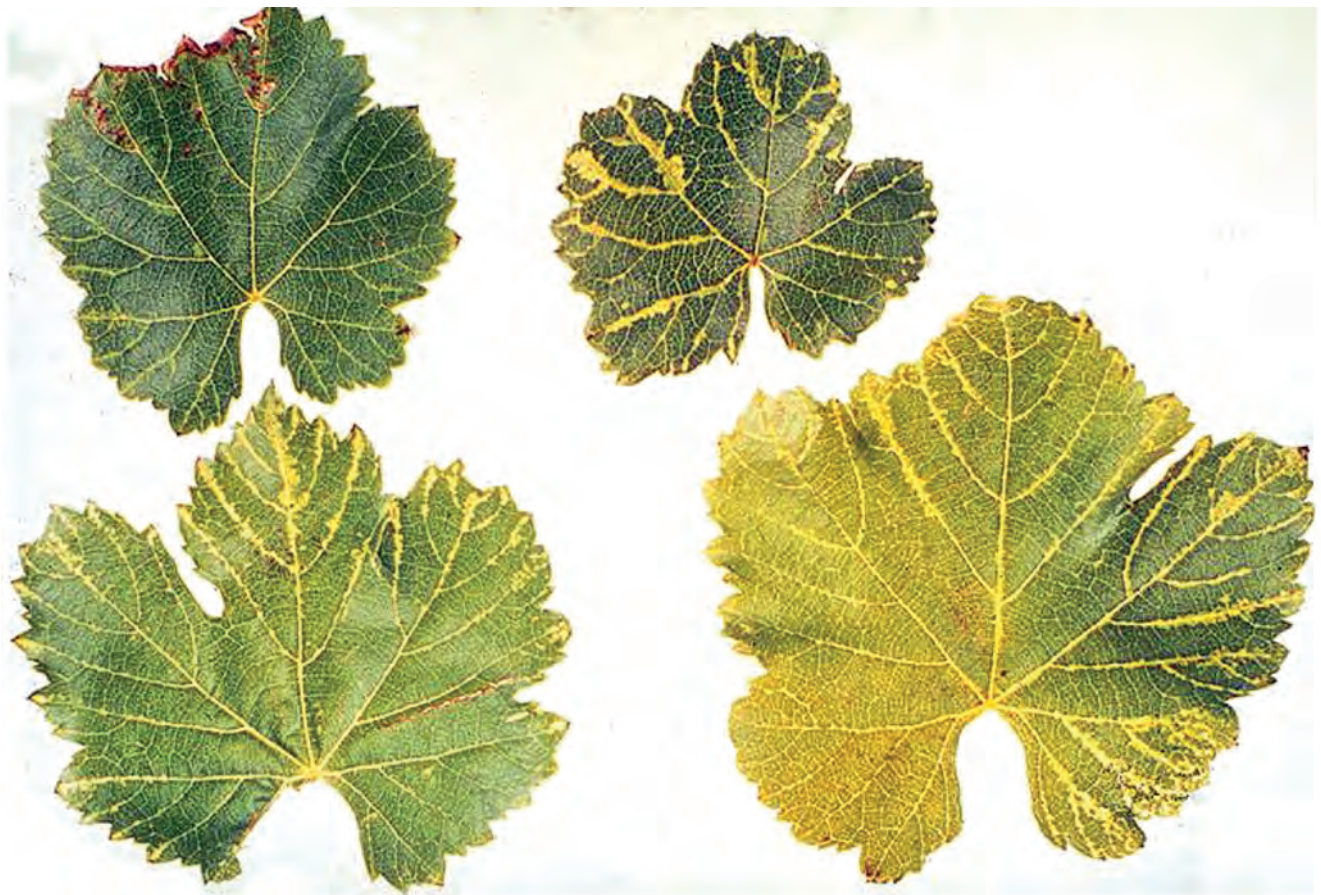


Рис. 3. Симптомы пожелтения жилок на листьях винограда, зараженного ToRSV (фото University of California, США)
 Fig. 3. Symptoms of yellowing of grape leaf veins infected by ToRSV (photo by University of California, USA)

“Reagent kit for RT-PCR ToRSV” is implemented by Agrodiagnostika (Russia) to identify the target object by two-step RT-PCR method.

It has been established that the primers used in this reagent kit are characterized by a sufficiently high specificity, as they do not react with non-target objects – nepoviruses ArMV, BRSV, CLRV, GFLV, PBRV, RPRSV, TBRV, TRSV and the closely related strawberry latent ring spot virus (SLRSV).

However, the tested primers detected only two target isolates (ToRSV PV-0380 and PV-0381 DSMZ) and did not react with isolate ToRSV PV-0049. The use of several reverse transcription variants and different amplifiers did not contribute to the detection of the PV-0049 isolate.

The ToRSV-1f/ToRSV-1r and ToRSV-2f/ToRSV-2r primers, which are complementary to the area of the ToRSV coat protein gene, were developed in the United States (Stewart et al., 2007) and are designed to detect the target by real-time PCR in the presence of SYBR Green intercalating dye.

Preliminary testing of these primers produced unsatisfactory results.

In experiments with ToRSV-1f/ToRSV-1r primers, a positive response to excessively high threshold cycles (Ct = 37.5-37.8) was obtained only for positive ELISA ToRSV controls by Bioreba and Adgen.

In two experiments with ToRSV-2f/ToRSV-2r primers, a positive reaction was observed for 3-5 positive samples from six subjects, but mainly also for excessively high threshold cycles.

Thus, the possibility of effective real-time detection of ToRSV isolates by real-time PCR with UTRf/ToRSV-UTRr/ToRSV-UTRp primers and probes (Tang et al., 2014) and ToRSV-P6F/ToRSV-P6R/ToRSV-P6P primers and probes (VNIIKR) was established. Real-time RT-PCR can be conducted in both one-step and two-step formats. The tests with these primers are highly specific, sensitive and provide satisfactory reproducibility of the results.

References

1. EPPO, 2005. Tomato ringspot nepovirus. Diagnostic protocol PM 7/49 (1) // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2005. Vol. 35. P. 313-318.
2. Fuchs G.S. Association of Tobacco ringspot virus, Tomato ringspot vi-

rus and *Xiphinema americanum* with decline of highbush blueberry in New York // 21st Int. Conf. on Virus and Graft Transmissible Diseases of Fruit Trees, 2010. P. 15-17.

3. Gambino G., Gribaudo I. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control // Phytopathology, 2006. Vol. 96. P. 1223-1229.

4. Osman F., Leutenegger C., Golino D., Rowhani A. Comparison of low-density array, RT-PCR and TaqMan RT-PCR in detection of grapevine viruses // J. Virol. Methods, 2008. Vol. 149. P. 292-299.

5. Stewart E.L., Qu X., Overton B.E., Gildow F.E., Nancy G. Wenner N.G., Grove D.S. Development of a real-time RT-PCR SYBR Green assay for Tomato ring spot virus in grape // Plant Disease, 2007. Vol. 91. P. 1083-1088.

6. Tang J., Khan S., Delmiglio C., Ward L.I. Sensitive detection of Tomato ringspot virus by real-time TaqMan RT-PCR targeting the conserved 3'-UTR region // Journal of Virological Methods, 2014. Vol. 201. P. 38-43.

ВОЗБУДИТЕЛЬ УГЛОВОЙ ПЯТНИСТОСТИ ЛИСТЬЕВ ЗЕМЛЯНИКИ *XANTHOMONAS FRAGARIAE* KENNEDY & KING

Е.Ю. Шнейдер, старший научный сотрудник НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР»

Е.В. Каримова, старший научный сотрудник НМОВБ ФГБУ «ВНИИКР»

Аннотация. Ягодные культуры широко возделывают на территории Российской Федерации. К числу опасных бактериальных болезней ягодных культур, в частности земляники, относится угловая пятнистость листьев земляники, вызываемая *Xanthomonas fragariae*. В настоящее время данная бактерия входит в Список ограниченно распространенных карантинных вредных организмов (А2) ЕОКЗР и является карантинным вредным организмом для ряда зарубежных стран. В статье рассмотрены особенности *X. fragariae*, растения-хозяева, симптомы заболевания и ущерб, наносимый возбудителем в странах его распространения. По результатам проведенного в 2017 году анализа фитосанитарного риска данный возбудитель рекомендован для включения в Перечень карантинных вредных организмов ЕАЭС.

Ключевые слова. Карантин растений, *Xanthomonas fragariae*, бактерия, земляника, посадочный материал.

На территории Российской Федерации широко распространено выращивание ягодных культур, в частности земляники, – как в промышленных условиях в хозяйствах различной формы собственности, так и на приусадебных участках. В связи с расширением площадей и закладкой новых ягодников возникает необходимость импортирования посадочного материала (рассады) из-за рубежа, что, в свою очередь, увеличивает вероятность завоза опасных возбудителей бактериальных болезней из стран их распространения.

Одним из вредоносных бактериозов, поражающих землянику, является угловая пятнистость листьев. Возбудитель – бактерия *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King.

Угловая пятнистость листьев земляники (*Fragaria* x *ananassa* Duch.), вызванная бактерией *Xanthomonas fragariae*, стала серьезным препятствием для выращивания земляники во всем мире (ЕРРО, 1997). Болезнь была впервые зарегистрирована в 1962 году в Миннесоте и впоследствии распространилась в районы выращивания культуры в Северной Америке, Европе, Африке, Южной Америке, Австралии и Новой Зеландии (Maas et al., 1995).

В Европе возбудитель был выявлен в Австрии, Бельгии, Болгарии, Германии, Испании, Италии, Нидерландах, Португалии, Финляндии,

Франции, Швейцарии, в Африке – в Эфиопии, в Азии – в Китае, Иране, Узбекистане, Республике Корея, на о. Тайвань (<https://gd.eppo.int>).

Естественными растениями – хозяевами *Xanthomonas fragariae* являются земляника ананасная (*Fragaria* x *ananassa*), которая возникла, предположительно, в результате гибридизации земляники чилийской *F. chiloensis* (придавшей ей крупноплодность) и земляники виргинской *F. virginiana* (придавшей относительную морозостойкость), а также земляника лесная *F. vesca*. Кроме того, к данному возбудителю чувствительны лапчатка кустарниковая *Potentilla fruticosa* и лапчатка липкая *P. glandulosa*.

В Российской Федерации произрастает семь видов рода Земляника – земляника лесная (*F. vesca* L.),



Рис. 1. Пропитанные водой повреждения, вызванные угловой пятнистостью на зараженном листе земляники (фото P. Nietzsche, <https://gd.eppo.int>)

Fig. 1. Angular, water-soaked lesions of infected strawberry leaf (photo by P. Nietzsche, <https://gd.eppo.int>)



Рис. 2. Ранние симптомы угловой пятнистости листьев земляники (Univ. of Florida, GCREC, Silvia I. Rondon)

Fig. 2. Initial symptoms of angular leaf spot of strawberry (Univ. of Florida, GCREC, Silvia I. Rondon)

земляника равнинная (*F. campestris* Stev.), земляника бухарская (*F. bucharica* Los.), земляника восточная, она же азиатская лесная клубника (*F. orientalis* Los.), земляника холмистая, она же полуница, земляника зеленая, земляника степная (*F. collina* Ehrh., *F. viridis* Duch.), земляника виргинская, она же земляника луговая, земляника багряная (*F. virginiana* Duch.), земляника мускатная, она же земляника мускусная, земляника высокая, клубника европейская (*F. moschata* Duch., sin. *F. elatior* Ehrh.).

Восприимчивость к бактериозу различных торговых сортов земляники варьирует. Среди видов *Fragaria* обладает некоторой устойчивостью к возбудителю угловой пятнистости листьев только земляника мускусная *F. moschata*.

X. fragariae представляет собой аэробную грамотрицательную неспорообразующую, некапсулированную палочку, ее размер в среднем около 0,4 x 1,3 мкм. Большинство клеток неподвижны, но некоторые имеют один полярный жгутик. На агаровой мясопептонной или подобной среде без добавления углеводов колонии округлые, с ровным краем, выпуклые, блестящие, от полупрозрачной до бледно-желтой.

Анализ штаммов *X. fragariae*, выделенных в различное время и

в различных странах мира, свидетельствует о наличии определенной генетической и фенотипической вариабельности (Opgenorth et al., 1996; Pooler et al., 1996; Roberts et al., 1996). Было также отмечено, что штаммы *X. fragariae* различаются по степени патогенности. Тем не менее

патогенные штаммы данной бактерии в значительной степени сходны друг с другом, причем отсутствует корреляция между генотипами или фенотипами и географическим происхождением штамма. Таким образом, известные в настоящее время штаммы *X. fragariae* из различных регионов мира, по всей вероятности, представляют собой клональную популяцию (Maas et al., 2000).

Симптомы угловой пятнистости листьев развиваются на листьях и чашечках. На листьях земляники при заражении *X. fragariae* появляются угловатые блестящие водянистые мелкие пятна, расположенные между самыми мелкими жилками (рис. 1, 2). На ранней стадии пятна видны только на нижней поверхности листа и кажутся полупрозрачными при просмотре его на свет. Позже они увеличиваются, сливаются и примерно через две недели становятся видны на верхней поверхности, так же как водянистые угловатые пятна, которые затем становятся красновато-коричневыми (рис. 3). Пятна имеют блестящую поверхность и обычно покрыты бактериальным экссудатом (рис. 4), который при высыхании становится коричневым и сохраняется на поверхности в виде чешуек (рис. 5).



Рис. 3. Повреждения на верхней поверхности листьев растения: красновато-коричневые пятна угловой пятнистости листьев (Univ. of Florida, GCREC)

Fig. 3. Lesions of upper leaf surface: reddish-brown spots of angular leaf spot of strawberry (Univ. of Florida, GCREC)



Рис. 4. Вязкий бактериальный экссудат на нижней поверхности листьев (foto William W. Turechek, USDA-ARS)

Fig. 4. Gum-like bacterial exudate on lower leaf (photo by William W. Turechek, USDA-ARS)

Пятна чаще сливаются по первичной и вторичной жилкам. Мертвые ткани рвутся и ломаются, а больной лист может иметь оборванный вид (рис. 6).

По мере расширения очагов повреждения приобретают угловатую форму, поскольку жилки листьев ограничивают их рост, цвет поражений становится коричневым, образуются некрозы, которые видны на обеих поверхностях листа.

Возбудитель угловой пятнистости листьев земляники может заражать околоцветники земляники (рис. 7), в частности чашечку (рис. 8). На чашелистиках появляются симптомы, сходные с симптомами на листьях: водянистые пятна с выступающим на них экссудатом, которые позже становятся бурыми и некротичными (рис. 9).

В некоторых случаях *X. fragariae* может вызвать сосудистое увядание. Этот симптом первоначально появляется как водянистая область у основания вновь появившихся листьев. Вскоре после этого все растение внезапно погибает.

При слабой степени заражения рассады или взрослых растений земляники возбудитель бактериоза может находиться в латентном

состоянии, без видимых проявлений заболевания, и только с наступлением подходящих условий для развития болезни появляются видимые симптомы, которые могут быстро развиваться и приводить к угнетению или гибели растений. Оптимальные условия для развития болезни – невысокие дневные температуры и сохранение на листьях влаги от дождя длительный период времени.

X. fragariae влияет на производство ягод за счет сокращения количества листовых пластинок растения, доступных для фотосинтеза. Из литературных источников известно, что заболевание вызывало потерю до 75% плодов земляники в условиях открытого грунта в Висконсине (Epstein, 1966).

Основным путем распространения возбудителя угловой пятнистости листьев земляники на значительные расстояния является международная торговля посадочным материалом (рассадой) с латентной инфекцией. Кроме того, популяции патогенов могут поддерживаться в тканях материнских растений, и инфекция передается потомству во время вегетативного размножения. Материнское растение накапли-

вает инфекцию в стебле, откуда происходит заражение молодых растений (Turechek, Peres, 2009). Другим источником первичного заражения являются остатки инфицированных листьев и розеток на усах, используемых для посадки.

Согласно данным Turechek et al. (2013), бактерии *X. fragariae* выживали в питомниках, и на растениях или проявлялись симптомы, или они были полностью бессимптомными. Такой путь распространения инфекции дает возможность бактерии попадать в новые, свободные от возбудителя места производства.

X. fragariae является типичным почвенным микроорганизмом. Бактерия может сохранять жизнеспособность в зараженных растительных остатках предыдущих сезонов в течение длительного времени (Maas, 2000). Однако, вероятнее всего, заражение происходит в поле или на участках при завозе зараженных растений для посадки. Бактерии в растительных остатках или с рассадой могут распространяться при орошении с потоками воды, при проведении агротехнических мероприятий.

В поле бактерия может переноситься с сельскохозяйственной техникой, транспортными средствами, с используемыми при уходе за растениями инструментами при несоблюдении требований по их дезинфекции, а также воздушными массами, дождем с сильным ветром. Развитию и распространению возбудителя способствуют умеренные дневные и низкие ночные температуры и влажность, в частности, мокрая листва.

Раннее выявление *X. fragariae* в инфицированном, но бессимптомном посадочном материале имеет важнейшее значение для предотвращения распространения данного возбудителя и развития болезни.

Диагностика бактериальной угловой пятнистости листьев земляники, вызываемой *X. fragariae*, основана на выявлении характерных симптомов, прямом или непрямом выделении возбудителя, применении серологических (например, таких как непрямая иммунофлуоресценция и твердо-

фазный иммуноферментный анализ (ИФА)) либо молекулярных методов. Разработан ряд диагностических тестов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), использующих различные мишени в геноме *X. fragariae* (Roberts et al., 1996; Zimmermann et al., 2004; Weller et al., 2007; Vandroemme et al., 2008). Эти тесты можно использовать для подтверждения наличия *X. fragariae* в растительном материале с симптомами болезни, и некоторые из них также позволяют выявлять латентную инфекцию, вызванную этой бактерией (Mahuku and Goodwin, 1997; Zimmermann et al., 2004; Moltmann and Zimmermann, 2005). В тех случаях, когда процесс прямого выделения *X. fragariae* протекает крайне медленно или подавлен, в целях предварительной диагностики можно использовать «метод отделенного листа» (detached leaf assay) (Civerolo et al., 1997).

Прямое выделение *X. fragariae* затруднено даже при наличии характерных симптомов и бактериального экссудата, поскольку данный микроорганизм растет медленно на искусственной питательной среде и легко вытесняется сапрофитными бактериями (Hazel and Civerolo, 1980; Schaad et al., 2001; Saddler and Bradbury, 2005). Конкретные процедуры прямого выделения *X. fragariae* приведены в работе López et al. (2005). Селективное обогащение методом *in planta*, основанное на инокуляции отделенных листьев земляники водным экстрактом из растительных тканей с явными признаками или с подозрением на инфекцию, может способствовать последующему выделению *X. fragariae in vitro* (Civerolo et al., 1997).

С более подробной информацией об отборе и подготовке растительных образцов, выявлении и идентификации *X. fragariae* можно ознакомиться в Международном стандарте по фитосанитарным мерам № 27, ДП 14, а также в диагностическом протоколе ЕОКЗР РМ 7/65.

При сравнении основных климатов в зонах фактического распространения возбудителя угловой пятнистости листьев земляники с зонами выращивания растений-хозяев на территории Российской Федерации можно предположить, что усло-

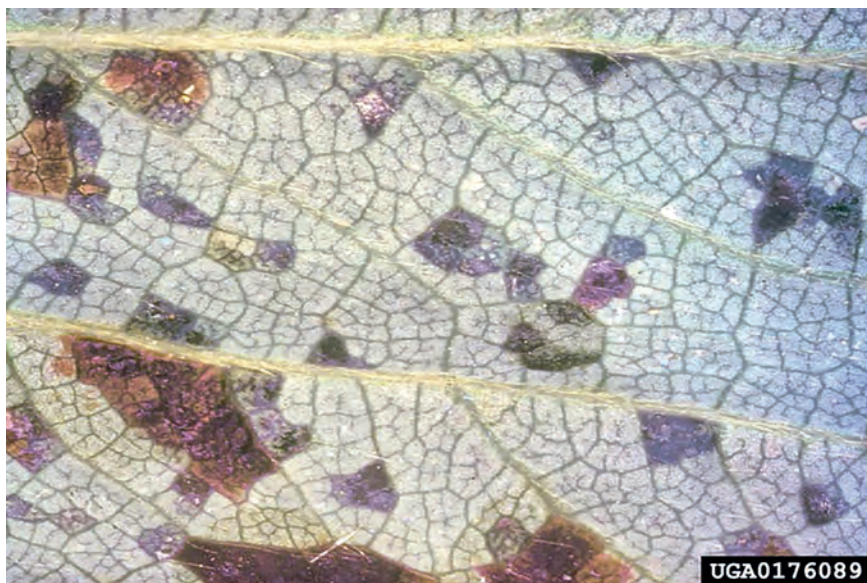


Рис. 5. Нижняя поверхность листа растения земляники, пораженного *Xanthomonas fragariae*: образование красновато-коричневых пятен угловатой формы (foto U. Mazzucchi, Università di Bologna, bugwood.org)

Fig. 5. Lower surface of a strawberry leaf infected by *Xanthomonas fragariae*: angular reddish-brown spots (photo by U. Mazzucchi, Università di Bologna, bugwood.org)

вия для акклиматизации *X. fragariae* могут быть подходящими практически на всей площади выращивания земляники. В большей степени эти условия сходны с условиями в центральных районах европейской части России и южных регионах.

Однако основными факторами, способствующими проникновению и акклиматизации возбудителя угловой пятнистости листьев земляники, являются наличие на территории России подходящих растений-хозяев и импорт посадочного материала с внутренней инфекцией из других стран мира, неблагоприятных в отношении *X. fragariae*, таких как Италия, Германия, Нидерланды и др., откуда в Российскую Федерацию ежегодно импортируются значительные объемы саженцев садовой земляники.

Страны, поставлявшие саженцы садовой земляники (код ТН ВЭД 0602903000) в 2015-2017 гг. в Российскую Федерацию (Коваленко и др., 2018)

Страна	Вес, кг
Германия	204368,19
Италия	162716,70
Нидерланды	49438,22
Финляндия	591,00
Республика Корея	456,00

На территории всех стран, представленных в таблице, подтверждено присутствие *X. fragariae*. Стоит отметить, что Германия, Нидерланды и Италия входят в десятку стран, импортирующих в РФ наибольшие объемы саженцев садовой земляники.

Эффективных химических мер борьбы с бактериозом нет. Профилактическими мерами являются: борьба с насекомыми; выведение устойчивых сортов растений; производство посадочного материала согласно сертификационным схемам (ЕРРО, 2008, РМ 4.11). Необходимо улучшение фитосанитарного состояния участков производства.

X. fragariae входит в Перечень карантинных вредных организмов, ограниченно распространенных на территории ЕОКЗР (список А2) (ЕРРО, 1990), в Приложение II/A2 Перечня Европейского союза. Также бактерия регулируется карантинными службами ряда стран (Норвегия, Турция, Чили, Бахрейн, Израиль, Иордания, Новая Зеландия), Межафриканским советом по карантину и защите растений.

Анализ фитосанитарного риска, проведенный в 2017 году (Коваленко, Шнейдер и др.), показал, что потенциальный ущерб от воз-

будителя угловой пятнистости листьев земляники – 1,35, что выше среднего показателя (1,25). Это свидетельствует о том, что возбудитель бактериоза *X. fragariae* может быть оценен как вредный организм, представляющий фитосанитарный риск для территории РФ, и рекомендован для включения в Единый перечень карантинных объектов стран ЕАЭС.

Литература

1. Civerolo E.L., Feliciano A.J., Melvin J.A. & Gubler W.D. 1997. A detached leaf bioassay for *Xanthomonas fragariae*. In: A. Mahadevin, ed. Proceedings of the 9th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria, pp. 89-94. University of Madras, Madras, India.
2. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2008. Certification scheme for strawberry. EPPO Standards PM 4/11. EPPO Bulletin, 38: 430-437.
3. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2006. Diagnostic protocol for *Xanthomonas fragariae*. EPPO Standards PM 7/65. EPPO Bulletin, 36: 135-144.
4. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 1997. Data sheet on *Xanthomonas fragariae*. In: EPPO/CABI (I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott, & M. Holderness, eds). Quarantine pests for Europe, 2nd edn, pp. 1124-1128. Wallingford, UK, CABI.
5. Epstein A.H. 1966. Angular leaf spot of strawberry. *Plant Disease*, 50: 167.
6. Hazel W.J., Civerolo E.L. 1980. Procedures for growth and inoculation of *Xanthomonas fragariae*, causal organism of angular leaf spot of strawberry // *Plant Disease*, 64: 178-181.
7. López M.M., Dominguez F., Morente C., Salcedo C.I., Olmos A., Civerolo E. 2005. Diagnostic protocols for organisms harmful to plants: Diagnosis *Xanthomonas fragariae*. SMT-4-CT98-2252.
8. Maas J.L., Pooler M.R., Galletta G.J. 1995. Bacterial angular leaf spot disease of strawberry: present status and prospects for control // *Adv. Strawberry Res.*, 14: 18-24.
9. Maas J.L., Gouin-Behe C., Hartung J.S. & Hokanson S.C. 2000. Sources of resistance for two differentially pathogenic strains of *Xanthomonas fragariae* in *Fragaria* genotypes // *Horticultural Science*, 35: 128-131.
10. Mahuku G.S., Goodwin P.H. 1997. Presence of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry crowns in Ontario detected using a nested polymerase chain reaction (PCR) // *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 366-370.
11. Moltmann E. & Zimmermann C. 2005. Detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants by nested PCR // *EPPO Bulletin*, 35: 53-54.
12. Opgenorth D.C., Smart C.D., Louws F.J., de Bruijn F.J., Kirkpatrick B.C. 1996. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting // *Plant Disease*, 80: 868-873.
13. Pooler M.R., Ritchie D.F. & Hartung J.S. 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen // *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3121-3127.
14. Roberts P.D., Jones J.B., Chandler C.K., Stall R.E., Berger R.D. 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested PCR // *Plant Disease*, 80: 1283-1288.
15. Sadtler G.S. & Bradbury J.F. 2005. *Xanthomonas*. In: G.M. Garrity, editor-in-chief; D.J. Brenner, N.R. Krieg & J.T. Stanley, eds. Vol. 2 // *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn. Vol. 2, Part B, pp. 63-90. New York, Springer.
16. Schaad N.W., Jones J.B., Lacy G.H. 2001. *Xanthomonas*. In: N.W. Schaad, J.B. Jones, W. Chun, eds. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, 3rd edn, pp. 175-200. St Paul, MN, APS Press.
17. Turechek W.W., Peres N.A. 2009. Heat treatment effects on strawberry plant survival and angular leaf spot, caused by *Xanthomonas fragariae*, in nursery production // *Plant Dis.*, 93: 299-308.
18. Turechek W.W., Wang S., Tiwari G., Peres N.A. 2013. Investigating alternative strategies for managing bacterial angular leaf spot in strawberry nursery production // *Int. J. Fruit Sci.*, 13: 234-245.
19. Vandroemme J., Baeyen S., Van Vaerenbergh J., De Vos P., Maes M. 2008. Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants // *Plant Pathology*, 57 (3): 438-444.
20. Weller S.A., Beresford-Jones N.J., Hall J., Thwaites R., Parkinson N., Elphinstone J.G. 2007. Detection of *Xanthomonas fragariae* and presumptive detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*, from strawberry leaves, by real-time PCR // *Journal of Microbiological Methods*, 70: 379-383.
21. Zimmermann C., Hinrichs-Gerger J., Moltmann E., Buchenauer H. 2004. Nested PCR for detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants // *Journal of Plant Diseases and Protection*, 111: 39-51.
22. Коваленко Я.Н., Шнейдер Е.Ю., Дудченко И.П., Акулов Е.Н. Оценка фитосанитарных мер управления рисками, связанными с импортированием, экспортированием и перемещением подвоев, черенков и рассады ягодных культур. Отчет о научно-исследовательской работе (промежуточный). М.: ФГБУ «ВНИИКР», 2017.
23. Коваленко Я.Н., Ловцова Ю.А., Приходько Ю.Н., Акулов Е.Н. Оценка фитосанитарных мер управления рисками, связанными с импортированием, экспортированием и перемещением подвоев, черенков и рассады ягодных культур. Отчет о научно-исследовательской работе (заключительный). М.: ФГБУ «ВНИИКР», 2018.
24. Международный стандарт по фитосанитарным мерам № 27. Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов. ДП 14: *Xanthomonas fragariae*.
25. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://gd.eppo.int>.

CAUSAL ORGANISM OF ANGULAR LEAF SPOT OF STRAWBERRY *XANTHOMONAS FRAGARIAE* KENNEDY & KING

E.Iu. Shneyder, Senior Researcher of RMDVB of FGBU "VNIKR"

E.V. Karimova, Senior Researcher of RMDVB of FGBU "VNIKR"

Abstract. Fruit crop is widely cultivated in the Russian Federation. Angular leaf spot of strawberry caused by *Xanthomonas fragariae* is considered to be a destructive bacterial disease. Currently, EPPO considers *X. fragariae* as an A2 quarantine organism according to the List of quarantine pests as well as harmful quarantine pest for a number of foreign countries. This article covers morphology of *X. fragariae*, host plants, list of symptoms and damage which may occur to countries where *X. fragariae* is geographically distributed. According to the results of pest risk analysis as of 2017 *X. fragariae* was recommended to be included in the EAEU Uniform List of Plant Quarantine Objects.

Keywords. Plant quarantine, *Xanthomonas fragariae*, bacterium, strawberry, planting material.

Fruit crop, particularly strawberry fruit, is part of the major fruit industry for the Russian Federation, and is common as for both commercial production and home gardens. Increase of strawberry plantations and lots enables to import plant material from overseas which in return may result in bringing bacterial pathogens from other countries.

Angular leaf spot of strawberry, caused by *Xanthomonas fragariae* Kennedy & King, is one of the bacterial pathogens that can infect strawberry.

Angular leaf spot of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) caused by *Xanthomonas fragariae*, has become increasingly problematic in the strawberry agro-industry worldwide (EPPO, 1997). The disease was first reported in Minnesota in 1962 and further spread took place to North America, Europe,

Africa, South America, Australia and New Zealand (Maas et al., 1995).

In Europe the bacterium was detected in Austria, Belgium, Bulgaria, Germany, Spain, Italy, the Netherlands, Portugal, Finland, France, Switzerland. In Africa it was first described in Ethiopia, in Asia – in China, Iran, Uzbekistan, the Republic of Korea, the island of Taiwan (<https://gd.eppo.int>).

As a host plant, *Fragaria x ananassa*, the predominant cultivated strawberry from *Xanthomonas fragariae*, whose progenitors derive from hybridization

between *F. chiloensis* (which was noted for its large size) and *F. virginiana* (which was noted for its resistance to low temperatures), as well as woodland strawberry *F. vesca*. In addition, bush cinquefoil *Potentilla fruticosa* and *P. glandulosa* are susceptible to this bacterium.

There are seven varieties of strawberries that are cultivated in the Russian Federation – woodland strawberry (*F. vesca* L.), Alpine strawberry (*F. campestris* Stev.), bucharica strawberry (*F. bucharica* Los.), Asia straw-



Fig. 6. Strawberry leaves severely damaged from *Xanthomonas fragariae*: torn limbs and merging of spots along primary veins (photo by U. Mazzucchi Università di Bologna, bugwood.org)

Рис. 6. Листья земляники, сильно пострадавшие от *Xanthomonas fragariae*: рваные листовые пластинки и слияние пятен вдоль основных жилок (фото U. Mazzucchi, Università di Bologna, bugwood.org)



Fig. 7. Symptoms of angular leaf spot of strawberry on the flower
(State plant protection station, Stuttgart, Germany;
photo by Esther Moltmann)

Рис. 7. Симптомы угловой пятнистости листьев на цветке
(State plant protection station, Stuttgart, Germany;
фото Esther Moltmann)



Fig. 8. Symptoms of angular leaf spot of strawberry on the fruit cap
(Univ. of Florida, GCREC, Silvia I. Rondon)

Рис. 8. Симптомы угловой пятнистости листьев земляники
на чашечке плода
(Univ. of Florida, GCREC, Silvia I. Rondon)

berry (*F. orientalis* Los.), hill strawberry, or green strawberry, steppe strawberry (*F. collina* Ehrh., *F. viridis* Duch.), Virginia strawberry, or scarlet strawberry or (*F. virginiana* Duch.), musk strawberry, or moschatous strawberry, or European strawberry (*F. moschata* Duch., sin. *F. elatior* Ehrh.).

Numerous commercial strawberry cultivars and species vary in susceptibility to bacterium. Among *Fragaria* species only *F. moschata* is immune to *Xanthomonas fragariae*.

X. fragariae is an aerobic, Gram-negative, non-spore-forming, non-capsulate rod; size averaging 0.4 x 1.3 µm. Most cells are non-motile, but some have a single polar flagellum. On beef-extract-peptone agar, or similar medium without added carbohydrate, colonies are circular, entire, convex, glistening, translucent to pale-yellow.

Analyses of *X. fragariae* strains isolated at different times in diverse locations around the world indicate some genetic and phenotypic diversity among these strains (Opgenorth et al., 1996; Pooler et al., 1996; Roberts et al., 1996). In addition, some differential pathogenicity has been noted among *X. fragariae* strains. Nevertheless, there is a high degree of similarity among pathogenic strains of this phytopathogen, and there has been no correlation between genotypes or phenotypes and geographic origin of the strains. Currently known *X. fragariae* strains around the world are thus

likely to represent a clonal population (Maas et al., 2000).

X. fragariae symptoms may appear on leaves and calyx. On leaves angular, shiny, water-soaked spots appear surrounded by the smallest veins (Fig. 1, 2). In the early stage, the spots are only visible on the lower surface and appear translucent against the light. They enlarge, coalesce and after about two weeks are also visible on the upper surface as water-soaked, angular spots, which become reddish-brown in color (Fig. 3). Spots have a shiny appearance and are usually covered by bacterial exudate (Fig. 4) which when dry, turns brown and appears as gum-like scales (Fig. 5). Spots coalesce more frequently along the primary and secondary veins. The dead tissues tear and break off, and the diseased leaf may assume a ragged appearance (Fig. 6).

In the most severe cases these enlarge to form angular lesions, restricted by small leaf veins, lesions eventually become visible on both leaf surfaces, and appear as brown spots, which may become necrotic.

Xanthomonas fragariae may infect strawberry cap (Fig. 7), the calyx, in particular (Fig. 8). The sepals will have the same symptoms as leaves, water-soaked spots covered by bacterial exudate which becomes brown and necrotic (Fig. 9).

Eventually, *X. fragariae* can cause vascular collapse. This symptom initially appears as a water-soaked area at the

base of newly emerged leaves. Shortly after, the whole plant suddenly dies.

In the early stages of infection *X. fragariae* symptoms can be barely visible on younger and older leaves, only under conducive conditions for disease development visible symptoms appear and can quickly develop followed shortly by sudden plant collapse and death. *X. fragariae* favors low day temperatures and extended leaf wetness from rain.

X. fragariae negatively affect strawberry yield through decrease of plant leaf plates available for photosynthesis. According to studies (literature reviews), the disease resulted in up to 75% loss in strawberry yield in the open field production in Wisconsin (Epstein, 1966).

International trade of latently infected strawberry plants is the main pathway for entry and long-distance spread of *X. fragariae*. Furthermore, pathogen populations were maintained in maternal plant tissues, and pathogen infection was transmitted from the maternal parent to offspring during asexual clonal reproduction. The maternal plant generates nursery plants via a stoloniferous stem, where infection occurs from maternal to new nursery plants (Turechek, Peres, 2009). Residues of infected leaves and crown infections on runners used for planting are sources of inoculum for primary infections.

Turechek et al. (2013) reported that *X. fragariae* bacteria survived during

the nursery stage exhibiting symptoms or was fully asymptomatic. The way the infection is spread allows bacterium to be transmitted to new agent-free production fields.

X. fragariae is a typical soil invasion type pathogen. The bacterium can maintain viability in the residues of infected plant debris from one crop to the next for long periods of time (Maas, 2000). However, the bacterium primarily enters the field or gardens via infected planting stock from other regions. In the residues of leaves or plant material, the bacteria can be spread via water splash including sprinkler irrigation and agrotechnical measures.

Within the field, the bacterium can be spread by machinery, modes of transports, equipment, providing the sanitation measures are not met, as well as by wind or rain. The bacterium favors moderate day and low night temperatures with high relative humidity, particularly wet leaves.

Early detection of *X. fragariae* in infected but asymptomatic strawberry plant material is critical for avoiding dissemination of the pathogen and disease development.

Diagnosis of bacterial angular leaf spot disease of strawberry caused by *X. fragariae* is based on inspection for diagnostic symptoms, direct or indirect isolation of the pathogen, serological tests (e.g. indirect immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)) and molecular methods. Several polymerase chain reaction (PCR) detection tests, each targeting different loci in the *X. fragariae* genome, have been developed (Roberts et al., 1996; Zimmerman et al., 2004; Weller et al., 2007; Vandroemme et al., 2008). These tests can be used to confirm the presence of *X. fragariae* in symptomatic plant material, and several of them have also been used for the detection of latent *X. fragariae* infection (Mahuku and Goodwin, 1997; Zimmerman et al., 2004; Moltman and Zimmerman, 2005). A detached leaf assay is useful for presumptive diagnosis of *X. fragariae* in cases where direct isolation is very slow or inhibited (Civerolo et al., 1997).

Direct isolation of *X. fragariae* is difficult, even in the presence of characteristic symptoms and bacterial exudates, because the bacterium grows very

slowly on artificial nutrient media and is readily overgrown by saprophytic bacteria (Hazel and Civerolo 1980; López, et al., 1985; Schaad et al., 2001; Saddler and Bradbury, 2005). Specific procedures for direct isolation of *X. fragariae* are given in López et al. (2005). Selective enrichment of the pathogen *in planta* by inoculating detached strawberry leaves with aqueous extracts of diseased or suspected infected tissue can facilitate isolation of *X. fragariae in vitro* (Civerolo et al., 1997).

Further information on isolation, sample preparation, detection and identification of *X. fragariae* can be obtained from the International Standard for Phytosanitary Measures 27, DP 14, as well as in the diagnostic protocol of EPPO PM 7/65.

When comparing general climatic conditions in zones where the angular leaf spot of strawberry bacterium is actually spread with zones where strawberry host plants are cultivated in the Russian Federation, can be assumed that conditions for acclimatization of *X. fragariae* may be conducive for all strawberry fields. The conditions are more similar to those in the central and southern regions of Russia.

However, the existence of suitable host plants of strawberry in Russia and considerable import of latently infected strawberry plants from such countries, as Italy, Germany, the Netherlands, etc., common for *X. fragariae*, is the main pathway for entry and acclimatization of *X. fragariae*.

Importers of strawberry plants (Code of Foreign Trade Nomenclature Goods 0602903000) to the Russian Federation in 2015-2017 (Kovalenko et al., 2018)

Country	Weight, kg
Germany	204368.19
Italy	162716.70
Netherlands	49438.22
Finland	591.00
The Republic of Korea	456.00

The presence of *X. fragariae* was confirmed in all countries mentioned in the table. It is worth mentioning that Germany, the Netherlands and Italy are among the top 10 major importers of strawberry plants to the Russian Federation.

No effective chemical control of *X. fragariae* is available. The disease can be managed by insect control, de-

velopment of disease-tolerant cultivars and production of plant material according to the certification scheme for strawberry (EPPO, 2008, PM 4.11). Improvement of phytosanitary standards for production fields is required.

X. fragariae was classified as an A2 quarantine pathogen of limited distribution within the EPPO region (EPPO, 1990) and was listed by the European Union in Annex II/A2. Also, the bacterium is regulated as a quarantine pathogen by quarantine centers of a number of countries (Norway, Turkey, Chile, Bahrain, Israel, Jordan, New Zealand), and Inter-African Phytosanitary Council.

According to the pest risk analysis conducted in 2017 (Kovalenko, Shneyder et al.), potential damage from angular leaf spot of strawberry was estimated at 1.35 that was higher than average 1.25. It is evident that the *X. fragariae* must be identified as a harmful pathogen posing a phytosanitary risk for the Russian Federation and recommended to be included in the EAEU Uniform List of Plant Quarantine Objects.

References

- Civerolo E.L., Feliciano A.J., Melvin J.A. & Gubler W.D. 1997. A detached leaf bioassay for *Xanthomonas fragariae*. In: A. Mahadevin, ed. Proceedings of the 9th International Conference of Plant Pathogenic Bacteria, pp. 89-94. University of Madras, Madras, India.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2008. Certification scheme for strawberry. EPPO Standards PM 4/11. EPPO Bulletin, 38: 430-437.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2006. Diagnostic protocol for *Xanthomonas fragariae*. EPPO Standards PM 7/65. EPPO Bulletin, 36: 135-144.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 1997. Data sheet on *Xanthomonas fragariae*. In: EPPO/CABI (I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott, & M. Holderness, eds). Quarantine pests for Europe, 2nd edn, pp. 1124-1128. Wallingford, UK, CABI.
- Epstein A.H. 1966. Angular leaf spot of strawberry. Plant Disease, 50: 167.
- Hazel W.J., Civerolo E.L. 1980. Procedures for growth and inoculation of *Xanthomonas fragariae*, causal organism of angular leaf spot of strawberry // Plant Disease, 64: 178-181.

7. López M.M., Dominguez F., Morente C., Salcedo C.I., Olmos A., Civerolo E. 2005. Diagnostic protocols for organisms harmful to plants: Diagnosis *Xanthomonas fragariae*. SMT-4-CT98-2252.

8. Maas J.L., Pooler M.R., Galletta G.J. 1995. Bacterial angular leaf spot disease of strawberry: present status and prospects for control // *Adv. Strawberry Res.*, 14: 18-24.

9. Maas J.L., Gouin-Behe C., Hartung J.S. & Hokanson S.C. 2000. Sources of resistance for two differentially pathogenic strains of *Xanthomonas fragariae* in *Fragaria* genotypes // *Horticultural Science*, 35: 128-131.

10. Mahuku G.S., Goodwin P.H. 1997. Presence of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry crowns in Ontario detected using a nested polymerase chain reaction (PCR) // *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 366-370.

11. Moltmann E. & Zimmermann C. 2005. Detection of *Xanthomonas fragariae* in symptomless strawberry plants by nested PCR // *EPPPO Bulletin*, 35: 53-54.

12. Opgenorth D.C., Smart C.D., Louws F.J., de Bruijn F.J., Kirkpatrick B.C. 1996. Identification of *Xanthomonas fragariae* field isolates by rep-PCR genomic fingerprinting // *Plant Disease*, 80: 868-873.

13. Pooler M.R., Ritchie D.F. & Hartung J.S. 1996. Genetic relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR data and generation of multiplexed PCR primers useful for the identification of this phytopathogen // *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3121-3127.

14. Roberts P.D., Jones J.B., Chandler C.K., Stall R.E., Berger R.D. 1996. Survival of *Xanthomonas fragariae* on strawberry in summer nurseries in Florida detected by specific primers and nested PCR // *Plant Disease*, 80: 1283-1288.

15. Saddler G.S. & Bradbury J.F. 2005. *Xanthomonas*. In: G.M. Garrity, editor-in-chief; D.J. Brenner, N.R. Krieg & J.T. Stanley, eds. Vol. 2 // *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn. Vol. 2, Part B, pp. 63-90. New York, Springer.

16. Schaad N.W., Jones J.B., Lacy G.H. 2001. *Xanthomonas*. In: N.W. Schaad, J.B. Jones, W. Chun, eds. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*, 3rd edn, pp. 175-200. St Paul, MN, APS Press.



Fig. 9. Symptoms of angular leaf spot of strawberry on the calyx (Michigan State University, photo by Annemiek M.C. Schilder)

Рис. 9. Симптомы угловой пятнистости листьев на чашечке земляники (Michigan State University, фото Annemiek M.C. Schilder)

17. Turechek W.W., Peres N.A. 2009. Heat treatment effects on strawberry plant survival and angular leaf spot, caused by *Xanthomonas fragariae*, in nursery production // *Plant Dis.*, 93: 299-308.

18. Turechek W.W., Wang S., Tiwari G., Peres N.A. 2013. Investigating alternative strategies for managing bacterial angular leaf spot in strawberry nursery production // *Int. J. Fruit Sci.*, 13: 234-245.

19. Vandroemme J., Baeyen S., Van Vaerenbergh J., De Vos P., Maes M. 2008. Sensitive real-time PCR detection of *Xanthomonas fragariae* in strawberry plants // *Plant Pathology*, 57 (3): 438-444.

20. Weller S.A., Beresford-Jones N.J., Hall J., Thwaites R., Parkinson N., Elphinstone J.G. 2007. Detection of *Xanthomonas fragariae* and presumptive detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *fragariae*, from strawberry leaves, by real-time PCR // *Journal of Microbiological Methods*, 70: 379-383.

21. Zimmermann C., Hinrichs-Gerger J., Moltmann E., Buchenauer H. 2004. Nested PCR for detection of *Xan-*

thomonas fragariae in symptomless strawberry plants // *Journal of Plant Diseases and Protection*, 111: 39-51.

22. Kovalenko I.A., Shneyder E.I., Dudchenko I.P., Akulov E.N. Evaluation of phytosanitary measures of risk management related to import, export and transfer (movement) of rootstocks, cuttings and planting material of fruit plants. Scientific-Research Report (interim). M.: FGBU "VNIKR", 2017.

23. Kovalenko I.A., Lovtsova I.A., Prikhodko I.N., Akulov E.N. Evaluation of phytosanitary measures of risk management related to import, export and movement of rootstocks, cuttings and planting material of fruit plants. Scientific-Research Report (final). M.: FGBU "VNIKR", 2018.

24. International Standard for Phytosanitary Measures 27. Diagnostic protocols for regulated pests. DP 14: *Xanthomonas fragariae*.

25. [Electronic resource]. Access mode: <https://gd.eppo.int>.

МЕТОД СЕКВЕНИРОВАНИЯ В ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ КАРАНТИННЫХ ВРЕДНЫХ ОРГАНИЗМОВ

Д.Л. Белкин, заместитель начальника ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР»

Г.Н. Бондаренко, начальник ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР»

А.Б. Яремко, младший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР»

Д.А. Уварова, младший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР»

Аннотация. В статье освещено использование метода секвенирования по Сенгеру для видовой идентификации карантинных и особо опасных вредных организмов при проведении фитосанитарных исследований. Изложены материалы по истории и современному принципу метода капиллярного электрофореза. Представлены результаты применения метода секвенирования в ФГБУ «ВНИИКР» в научно-исследовательских целях и лабораторной практике.

Ключевые слова. Секвенирование по Сенгеру, карантин растений, видовая идентификация, полимеразная цепная реакция, вредный организм.

Как известно, ДНК была открыта в 1869 г. швейцарским ученым И.Ф. Мишером, в 1936 г. отечественный ученый А.Н. Белозерский доказал, что нуклеиновая кислота присутствует и в растениях. В 1953 г. Д. Уотсоном, Ф. Криком и М. Уилкинсом определена ее структура (Pareek et al., 2011). Лишь в 1984 г. британский генетик А. Джеффрис обнаружил, что ДНК уникальна для каждого организма. В 1983 г. К. Мюллис предложил метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), в процессе которого удалось синтезировать множество копий определенного участка ДНК в искусственных условиях (Pettersson et al., 2009). Практическое применение метода ПЦР началось в медицине и ветеринарии. В фитоса-

нитарии метод стал применяться позже.

История секвенирования берет начало с конца 60-х гг., когда Ф. Сенгером был разработан метод расшифровки нуклеотидных последовательностей. Первое прямое секвенирование ДНК было проведено в 1975 г., а в 1977 г. был разработан метод терминации цепи, который и по настоящее время является самым широко применяемым для определения последовательностей фрагментов ДНК (Чемерис и др., 1999). Данным способом был расшифрован весь геном человека, и именно автоматизированный метод Сенгера до сих пор является рутинным в повседневной лабораторной практике (Краснов и др., 2014).

В основе автоматического секвенирования лежит метод ферментативного секвенирования с использованием терминирующих азотистых оснований – дидезоксинуклеотидов (ddATP, ddTTP, ddGTP или ddCTP). Как и классический вариант метода Сенгера, автоматическое секвенирование включает две стадии: проведение терминирующих реакций (Seq-ПЦР) и разделение продуктов этих реакций с помощью капиллярного электрофореза на генетических анализаторах (AB-3500, «Applied Biosystems», США/Япония; Нанофор-05, ЗАО «Синтол», Россия).

Метод секвенирования, применяемый сотрудниками ФГБУ «ВНИИКР» при проведении исследований по идентификации ка-

рантинных объектов в продукции растительного происхождения, включает в себя 7 этапов:

1. Очистка продуктов ПЦР. Проводится с использованием коммерческого набора GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher, США) по инструкции, предложенной производителем данного набора.

2. Измерение концентрации очищенных продуктов ПЦР. Измерение производится в трехкратной повторности на спектрофотометре NanoDrop 2000 с визуализацией данных в собственном программном обеспечении (Thermo Fisher, США), по инструкции, предложенной производителем данного прибора.

3. Разведение ДНК до рабочей концентрации. Рабочая концентрация ДНК зависит от размера исходного продукта амплификации, который определяется по электрофореграмме (рис. 1).

Если на электрофореграмме длина продукта составляет 500 п.н., то рабочая концентрация ДНК будет 5,0 нг/мкл, т.е. длина искомого продукта делится на 100.

Формула для расчета количества воды, необходимого для разведения концентрации ДНК:

$$y = \left(x : \left(\frac{c}{100}\right) - 1\right) 4, \text{ где}$$

y – количество воды, необходимое для разведения (мкл);
x – концентрация ДНК, измеренная на NanoDrop (нг/мкл);
c – размер (длина) продукта, полученный на основании данных фореза (п.н.);

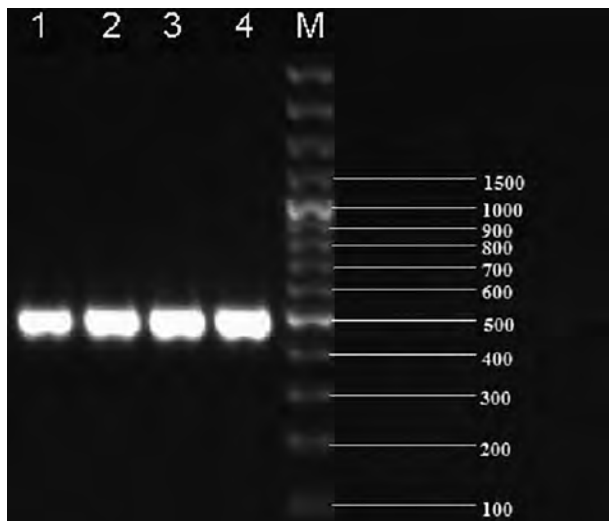


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР и размерность маркера молекулярного веса, п.н.
 Fig. 1. Electrophoregram of PCR products and molecular weight marker dimension, bp

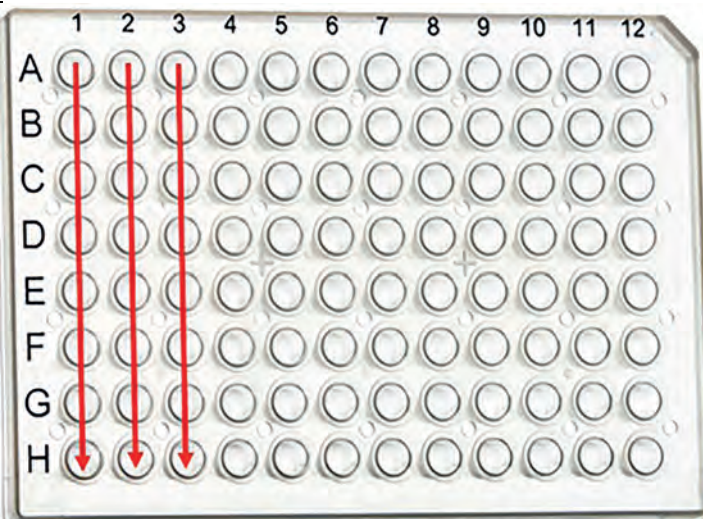


Рис. 2. Порядок внесения образцов в планшет для секвенирования
 Fig. 2. Procedure of introduction of samples into the sequencing plate

$x : (\frac{c}{100})$ – число, соответствующее тому, во сколько раз необходимо развести образец ДНК;

1 – означает, что берем 1 мкл ДНК;
 $((x : (\frac{c}{100}) - 1)$ – микролитры воды;
 4 – увеличение концентрации ДНК.

Примечание: Если значение выражения $x : (\frac{c}{100}) > 2$, требуется разведение концентрации. Если $x : (\frac{c}{100}) < 2$, то разведение концентрации не требуется.

После расчета и внесения необходимого количества воды для каждого образца в пробирки добавляется по 4 мкл ДНК, а затем все смешивается и осаждается на центрифуге-вортекс Микроспин FV-2400 (Biosan, Латвия).

4. Терминирующая амплификация (Seq-ПЦР). Для проведения Seq-ПЦР используются праймеры с концентрацией 0,8 рпм (пикомоль) и набор BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), реакционная смесь подготавливается по инструкции, предложенной производителем данного набора.

Процесс амплификации проходит по следующим параметрам:

Стадия 1. Температура +96 °С, 1 минута, 1 цикл;

Стадия 2. Температура +96 °С, 10 секунд
 +50 °С, 5 секунд
 +60 °С, 4 минуты } 25 циклов

Стадия 3. Температура +4 °С, 1 цикл.

5. Очистка образцов после Seq-ПЦР. Для очистки используется набор BigDye®XTerminator™ Purification Kit (Thermo Fisher,

США) согласно инструкции, предложенной производителем данного набора. После приготовления чистящего раствора и внесения в него образца используется перемешивание на термошейкере с охлаждением TS-100С (Biosan, Латвия) по следующей программе: 45 минут, 1400 об/мин, при температуре +4 °С. Это позволяет провести качественную очистку Seq-ампликонов от остаточных ddNTP.

6. Проведение капиллярного электрофореза. После очистки из пробирок отбирают по 25 мкл надосадочной жидкости и последовательно (рис. 2) переносят в планшет (планшет) для секвенирования (Applied Biosystems, США). Если при заполнении планшки остаются незаполненные лунки в одном ряде (последовательность лунок от 1А к 1Н), то в них вносят по 25 мкл Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, США). Далее планшет закрывают резиновой септой (Applied Biosystems, США) (рис. 3) и помещают в контейнер для секвенирования (рис. 4).

Таблица 1

Список программ для секвенирования

Название	Кол-во пар оснований	Приблизительное время окончания
Short_Read_Seq_Assay_POP7	100-300	30 минут
Rapid_Seq_Assay_POP7	300-500	40 минут
Fast_Seq_Assay_POP7	500-700	65 минут
Std_Seq_Assay_POP7	более 700	125 минут

Далее запускают генетический анализатор и программу прочтения согласно длине искомого фрагмента нуклеотидной последовательности.

При проверке годности буферов и полимера в программу для секвенирования вносят названия образцов в той же последовательности, в какой они были внесены в планшет, и выбирают программы для каждого из образцов согласно таблице 1.

7. Биоинформационный анализ. Качество прочтения нуклеотидных последовательностей определяется в программе «Sequencing Analysis». Анализ, редактирование и выравнивание последовательностей проводятся в специализированной программе BioEdit, версия 7.2.5 (рис. 5).

Сравнение полученных результатов (последовательностей) секвенирования проводится с уже имеющимися в базе данных GenBank NCBI BLAST.

В 2018 г. специалистами ФГБУ «ВНИИКР» были подготовлены

методические рекомендации по проведению секвенирования при диагностике карантинных объектов и других организмов, в которых подробно описаны этапы подготовки проб, проведения Seq-ПЦР и капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе АВ-3500 (Бондаренко, Белкин, 2018).

С 2012 г., с внедрением в практику лабораторных исследований ФГБУ «ВНИИКР» метода секвенирования, ежегодно этим методом идентифицируются различные карантинные объекты в импортируемой и экспортируемой Российской Федерацией продукции растительного происхождения, а

также в рамках научно-исследовательских работ.

В таблице 2 представлен список карантинных организмов с указанием генетических мишеней, с помощью которых возможна идентификация до вида с точностью до 100%. При внедрении метода секвенирования в фитосанитар-

Таблица 2

Генетические мишени, применяемые в ФГБУ «ВНИИКР» для изучения и диагностики карантинных вредных организмов

№	Название карантинного организма	Участок генома
1	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> (Shaad et al.) – Бактериальная пятнистость тыквенных культур	16S, 23S гены
2	<i>Bactrocera dorsalis</i> Hend. – Восточная фруктовая муха	COI ген
3	<i>Candidatus Phytoplasma mali</i> (Seemüller, Schneider) – Фитоплазма пролиферации яблони	16S-23S, tuf, map, secY гены
4	<i>Candidatus Phytoplasma pyri</i> (Seemüller, Schneider) – Фитоплазма истощения груши	16S-23S, tuf, map, secY гены
5	<i>Candidatus Phytoplasma vitis</i> – Фитоплазма золотистого пожелтения винограда	16S-23S, tuf, map, secY гены
6	<i>Ceratitis capitata</i> (Wiedemann) – Средиземноморская плодовая муха	COI ген
7	<i>Cercospora kikuchii</i> (T. Matsu & Tomoyasu) Gardn. – Пурпурный церкоспороз	TUB, ITS гены
8	<i>Colletotrichum acutatum</i> Simmonds (= <i>C. xanthii</i> Halsted) – Антракноз земляники	Ef, TUB гены
9	<i>Drosophila suzukii</i> (Matsumura) – Азиатская ягодная дрозифила	COI ген
10	<i>Erwinia amylovora</i> (Burrill) Winslow et al. – Бактериальный ожог плодовых культур	16S, WNTR гены
11	<i>Heterodera glycines</i> Ichinohe – Соевая цистообразующая нематода	5.8S, 18S гены
12	<i>Ipomoea hederacea</i> (L.) Jacq. – Ипомея плющевидная	trnL, ndh, ndhC-trnV, MatK гены
13	<i>Liriomyza sativae</i> Blanchard – Овощной листовой минер	COI ген
14	<i>Lymantria dispar asiatica</i> Vnukovskij – Азиатский подвид непарного шелкопряда	COI ген
15	<i>Megaselia scalaris</i> (Loew) – Многаядная муха-горбатка	COI ген
16	<i>Monilinia fructicola</i> (Winter) Honey – Бурая монилиозная гниль	ITS ген
17	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> (Smith) Mergaert et al. – Бактериальное увядание (вилт) кукурузы	16S ген
18	Peach latent mosaic viroid – Вироид латентной мозаики персика	фрагмент РНК (кДНК)
19	Plum pox potyvirus – Потивирус шарки (оспы) слив	фрагмент РНК (кДНК)
20	Potato spindle tuber viroid – Вироид веретеновидности клубней картофеля	фрагмент РНК (кДНК)
21	<i>Quadraspidiotus perniciosus</i> Comst. – Калифорнийская щитовка	COI ген
22	<i>Phytophthora fragariae</i> Hickman – Фитофторозная корневая гниль земляники и малины	Ypt1 ген
23	Raspberry ringspot nepovirus – Неповирус кольцевой пятнистости малины	фрагмент РНК (кДНК)
24	<i>Rathayibacter tritici</i> (Carlson & Vidaver) Zgurskaya et al. – Желтый слизистый бактериоз пшеницы	16S ген
25	<i>Tilletia indica</i> Mitra – Индийская (карнальская) головня пшеницы	Ef, TUB, ITS гены
26	Tobacco ringspot nepovirus – Неповирус кольцевой пятнистости табака	ген белка оболочки CP
27	Tomato ringspot nepovirus – Неповирус кольцевой пятнистости томата	фрагмент РНК (кДНК)
28	<i>Xylophilus ampelinus</i> (Panagopoulos) Willems et al. – Бактериальное увядание винограда	16S ген

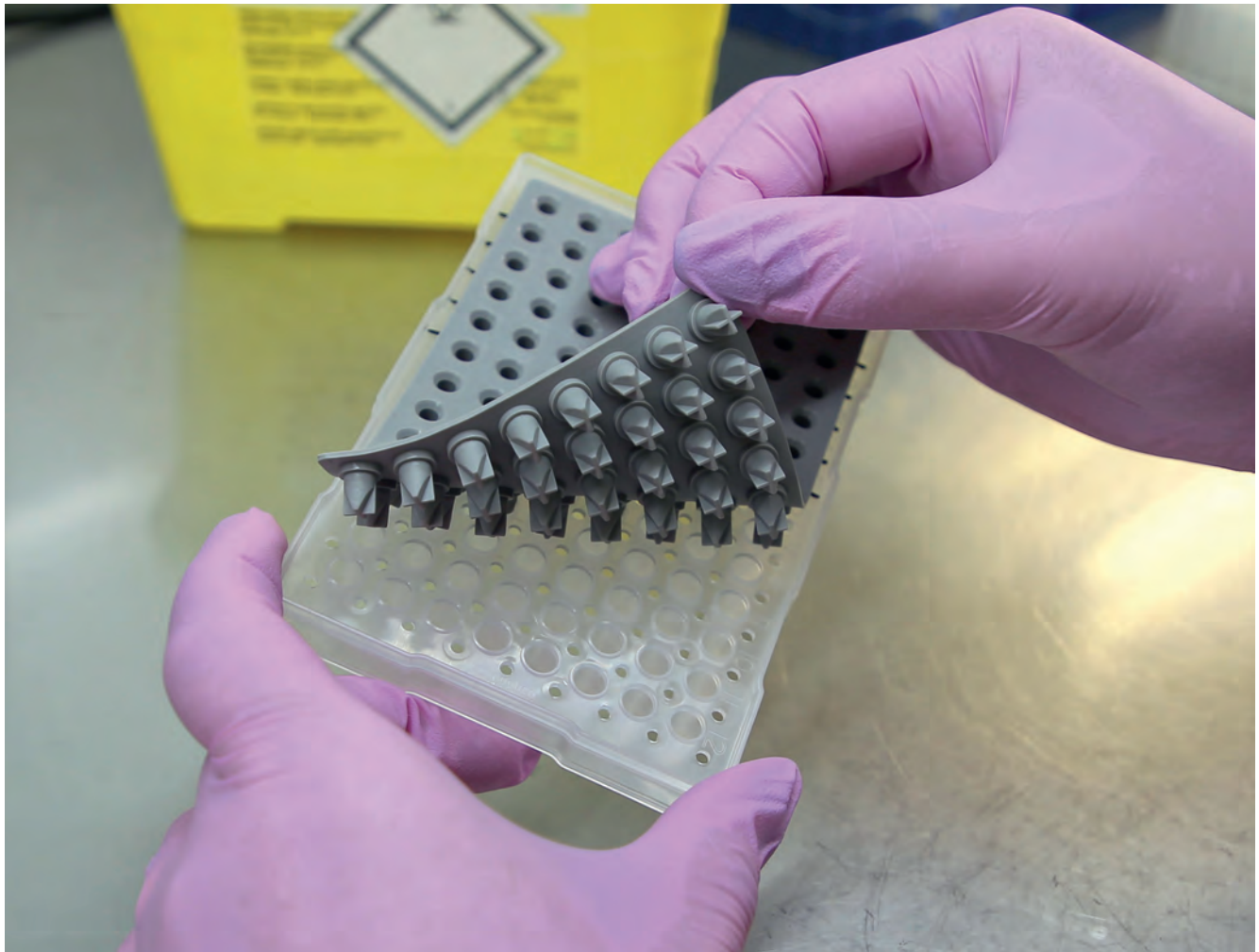


Рис. 3. Закрывание пластики для секвенирования резиновой септой
Fig. 3. Closing the sequencing plate with a rubber septum

ную лабораторную практику для более чем 25 видов карантинных организмов применили расшифровку нуклеотидных последовательностей продуктов ДНК с целью подтверждения видовой принадлежности.

Согласно представленным данным, интерес к применению метода расшифровки нуклеотидных последовательностей с каждым годом возрастает. Например, за первый квартал 2019 г. специалистами ФГБУ «ВНИИКР» выполнено более 1500 анализов по прочтению фрагментов ДНК как в рамках научных изысканий, так и для подтверждения результатов лабораторных исследований.

Секвенирование применяется при разработке новых, оптимизации и усовершенствовании существующих методов диагностики вредных организмов, таких как фитоплазмы, бактерии, насекомые. Оригинальные данные, полученные при использовании секвенирования,

зачастую становятся единственными генетическими маркерами для идентификации и подтверждения идентификации выявляемых карантинных вредных организмов.

В настоящее время ФГБУ «ВНИИКР» активно использует метод секвенирования при проведении исследований продукции на наличие карантинных организмов. Метод в его современной интерпретации позволяет за один рабочий цикл (ран) в одном капилляре с точностью до 98% определить последовательность ДНК длиной до 1000 пар нуклеотидов (п.н.). Относительно невысокая его стоимость, точность, а также простота автоматизации делают этот метод все более широко используемым в лабораторной практике учреждений Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору.

Литература

1. Краснов Я.М., Гусева Н.П., Шарипова Н.А., Черкасов А.В. Со-

временные методы секвенирования ДНК (обзор) // Проблемы особо опасных инфекций, 2014. Vol. 2. С. 73-79.

2. Бондаренко Г.Н., Белкин Д.Л. Методические рекомендации по проведению секвенирования при диагностике карантинных объектов и других организмов. М.: ФГБУ «ВНИИКР», 2018. 34 с.

3. Чемерис А.В., Ахунов Э.Д., Вахитов В.А. Секвенирование ДНК. М.: Наука, 1999. 428 с.

4. Pareek C.S., Smoczynski R., Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing // J. Appl. Genetics, 2011. Vol. 52, № 4. P. 413-435.

5. Pettersson E., Lundeberg J., Ahmadian A. Generations of sequencing technologies // Genomics, 2009. Vol. 93, № 2. P. 105-111.

6. [Электронный ресурс]. Международная база генетических данных. Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

SEQUENCING METHOD IN IDENTIFICATION OF SPECIES OF QUARANTINE PESTS

D.L. Belkin, Deputy Head of the TLC of FGBU "VNIKR"

G.N. Bondarenko, Head of the TLC of FGBU "VNIKR"

A.B. Iaremko, Junior Researcher of the Scientific Department for Molecular Genetic Diagnostic Methods of FGBU "VNIKR"

D.A. Uvarova, Junior Researcher of the Scientific Department for Molecular Genetic Diagnostic Methods of FGBU "VNIKR"

Abstract. *The article covers the use of Sanger sequencing method for identification of species of quarantine and extremely dangerous pests during phytosanitary researches. It contains materials on history and modern principle of capillary electrophoresis method. It also describes the results of application of the sequencing method in FGBU "VNIKR" for research purposes and laboratory practice.*

Keywords. *Sanger sequencing, plant quarantine, species identification, polymerase chain reaction, pest.*

It is known that DNA was discovered in 1869 by the Swiss scientist J.F. Miescher, and in 1936 the Russian scientist A.N. Belozersky proved that nucleic acid is also present in plants. In 1953, D. Watson, F. Crick and M. Wilkins defined its structure (Pareek et al., 2011). It was not until 1984 that British geneticist A. Jeffreys discovered that DNA was unique to each organism. In 1983, K. Mullis proposed a polymerase chain reaction (PCR) method; with its help he was able to synthesize many copies of a particular DNA site under artificial conditions (Pettersson et al., 2009). Practical application of PCR has begun in medicine and veterinary medicine. In phytosanitary, the method was applied later.

The history of sequencing dates back to the late 1960s, when Sanger developed the method of decoding nucleotide sequences. The first direct sequencing of DNA was carried out in 1975, and in 1977 the method of chain termination was developed,

which is still the most widely used to determine the sequence of DNA fragments (Chemeris et al., 1999). The entire human genome has been decoded in this way, and it is the automated Sanger method that is still routine in everyday laboratory practice (Krasnov et al., 2014).

Automatic sequencing is based on the method of enzymatic sequencing with the use of enduring nitrogen bases – dideoxynucleotides (ddATP, ddTTP, ddGTP or ddCTP). Like the classical variant of the Sanger method, automatic sequencing includes two stages: conducting terminating reactions (Seq-PCR) and separating the products of these reactions using capillary electrophoresis on genetic analyzers (AB-3500, Applied Biosystems, USA/Japan; NanoFor-05, ZAO Sintol, Russia).

The method of sequencing applied by the staff of FGBU "VNIKR" when conducting research on the identification of quarantine objects in the products of plant origin, includes 7 stages:

1. Purification of PCR products.

It is carried out with the use of commercial set GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher, USA) according to the instructions offered by the manufacturer of this set.

2. Measurement of concentration of purified PCR products.

The measurement is performed in triple repetition on the NanoDrop 2000 spectrophotometer with visualization of data in an in-house software (Thermo Fisher, USA), according to the instructions provided by the manufacturer of this device.

3. DNA dilution to working concentration.

The working concentration of DNA depends on the size of the original amplification product, which is determined by the electrophoregram (Fig. 1).

If the electrophoregram has a product length of 500 bp, the operating DNA concentration will be 5.0 ng/μl, i.e. the length of the required product is divided by 100 bp.

Formula to calculate the amount of water needed to dilute DNA concentration:

$y = ((x : (\frac{c}{100}) - 1) \cdot 4)$, where
y – amount of water required for dilution (μl);

x – DNA concentration measured on NanoDrop (ng/μl);

c – size (length) of the product based on the data of phoresis (bp);

$x : (\frac{c}{100})$ – number corresponding to how many times the DNA sample should be diluted;

1 – means we take 1 μl of DNA;

$((x : (\frac{c}{100}) - 1)$ – microlitres of water;

4 – increase in DNA concentration.

Note: If the value of $x : (\frac{c}{100}) > 2$, it is required to dilute the concentration. If $x : (\frac{c}{100}) < 2$, dilution is not required.

After calculating and applying the required amount of water for each sample, 4 μl DNA is added to the tubes, and then everything is mixed and precipitated in the Microspin FV-2400 vortex (Biosan, Latvia).

4. Terminating amplification (Seq-PCR).

Seq-PCR uses 0.8 pm (picomol) primers and BigDye® Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA), the reaction mixture is prepared according

to the manufacturer's instructions for this kit.

The amplification process follows the following parameters:

Stage 1. Temperature + 96 ° C, 1 minute, 1 cycle;

Stage 2. Temperature
 +96 ° C, 10 seconds
 +50 ° C, 5 seconds
 +60 ° C, 4 minutes } 25 cycles

Stage 3. Temperature +4 ° C, 1 cycle.

5. Purification of samples after Seq-PCR. The BigDye® X Terminator™ Purification Kit (Thermo Fisher, USA) is used for cleaning according to the instructions provided by the manufacturer of this kit. After preparation of the purification solution, the sample is put into it and mixed on a TS-100C (Biosan, Latvia) thermoshaker according to the following program: 45 minutes, 1400 rpm, at +4 ° C. It allows carrying out qualitative purification of Seq-amplicons from residual ddNTP.

6. Capillary electrophoresis. After purification, 25 µl of the supernatant is taken out of the tubes and sequentially (Fig. 2) transferred to a sequencing plate (Applied Biosystems, USA). If there are empty wells in one run when filling the plate (sequence of wells from 1A to 1H), they are filled with 25 µl Hi-Di Formamide (Applied Biosystems, USA). The plate is then covered with a rubber septum (Applied Biosystems, USA) (Fig. 3) and placed in a sequencing container (Fig. 4).

Then the genetic analyzer and the reading program are launched according to the length of the desired nucleotide sequence fragment.

When checking the suitability of the buffers and polymer, the sequencing program includes the names of the samples in the same sequence as they were introduced into the plate and selects the programs for each of the samples according to Table 1.

Table 1
List of sequencing programs

Name	Number of base pairs	Estimated end time
Short_Read_Seq_Assay_POP7	100-300	30 minutes
Rapid_Seq_Assay_POP7	300-500	40 minutes
Fast_Seq_Assay_POP7	500-700	65 minutes
Std_Seq_Assay_POP7	over 700	125 minutes

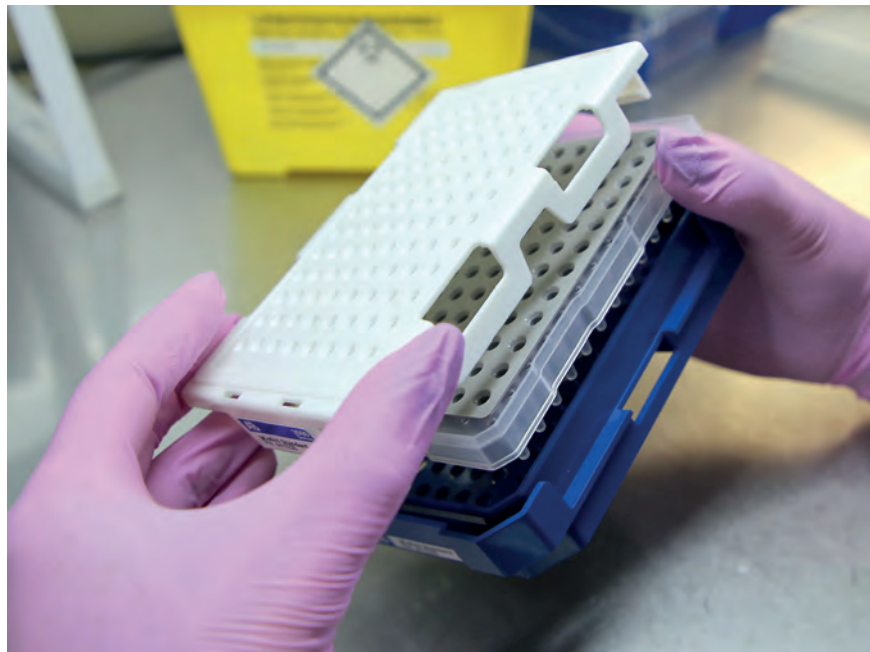


Fig. 4. Putting a plate in a sequencing container

Рис. 4. Помещение плашки в контейнер для секвенирования

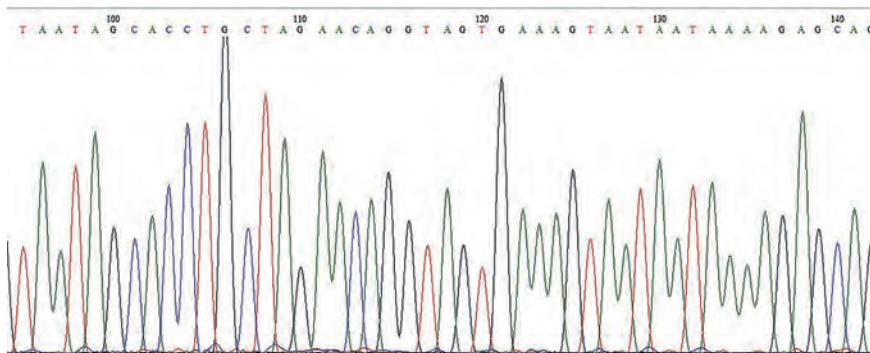


Fig. 5. Nucleotide sequence analysis in BioEdit 7.2.5

Рис. 5. Анализ нуклеотидных последовательностей в программе BioEdit 7.2.5

7. Bioinformational analysis. The quality of reading nucleotide sequences is defined in the Sequencing Analysis program. Analysis, editing and alignment of the sequences are carried out in the specialized BioEdit program, version 7.2.5 (Fig. 5).

The obtained sequencing results (sequences) are compared with those already available in the GenBank NCBI BLAST database.

In 2018, specialists of FGBU "VNIKR" prepared methodological recommendations on sequencing for the diagnostics of quarantine objects

and other organisms, which describe in detail the stages of sample preparation, Seq-PCR and capillary electrophoresis on the AB-3500 genetic analyzer (Bondarenko, Belkin, 2018).

Since 2012, with the introduction of the sequencing method into the practice of laboratory research by FGBU "VNIKR", various quarantine objects in the products of plant origin imported and exported by the Russian Federation, as well as within the framework of research work, have been identified annually by this method.

Table 2 presents a list of quarantine organisms with genetic targets that can be used to identify to species with 100% accuracy. When introducing sequencing into the phytosanitary laboratory practice for more than 25 species of quarantine organisms, decoding of nucleotide sequences of DNA products was used to confirm their species.

Table 2
Genetic targets used in FGBU “VNIKR” to study and diagnose quarantine pests

No.	Name of quarantine organism	Genome region
1	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> (Shaad et al.)	16S, 23S genes
2	<i>Bactrocera dorsalis</i> Hend.	COI gene
3	<i>Candidatus</i> Phytoplasma mali (Seemüller, Schneider)	16S-23S, tuf, map, secY genes
4	<i>Candidatus</i> Phytoplasma pyri (Seemüller, Schneider)	16S-23S, tuf, map, secY genes
5	<i>Candidatus</i> Phytoplasma vitis	16S-23S, tuf, map, secY genes
6	<i>Ceratitidis capitata</i> (Wiedemann)	COI gene
7	<i>Cercospora kikuchii</i> (T. Matsu & Tomoyasu) Gardn.	TUB, ITS genes
8	<i>Colletotrichum acutatum</i> Simmonds (= <i>C. xanthii</i> Halsted)	Ef, TUB genes
9	<i>Drosophila suzukii</i> (Matsumura)	COI gene
10	<i>Erwinia amylovora</i> (Burrill) Winslow et al.	16S, WNTR genes
11	<i>Heterodera glycines</i> Ichinohe	5.8S, 18S genes
12	<i>Ipomoea hederacea</i> (L.) Jacq.	trnL, ndh, ndhC-trnV, MatK genes
13	<i>Liriomyza sativae</i> Blanchard	COI gene
14	<i>Lymantria dispar asiatica</i> Vnukovskij	COI gene
15	<i>Megaselia scalaris</i> (Loew)	COI gene
16	<i>Monilinia fructicola</i> (Winter) Honey	ITS gene
17	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i> (Smith) Mergaert et al.	16S gene
18	Peach latent mosaic viroid	RNA fragment (cDNA)
19	Plum pox potyvirus	RNA fragment (cDNA)
20	Potato spindle tuber viroid	RNA fragment (cDNA)
21	<i>Quadraspidiotus perniciosus</i> Comst.	COI gene
22	<i>Phytophthora fragariae</i> Hickman	Ypt1 gene
23	Raspberry ringspot nepovirus	RNA fragment (cDNA)
24	<i>Rathayibacter tritici</i> (Carlson & Vidaver) Zgurskaya et al.	16S gene
25	<i>Tilletia indica</i> Mitra	Ef, TUB, ITS genes
26	Tobacco ringspot nepovirus	CP coat protein gene
27	Tomato ringspot nepovirus	RNA fragment (cDNA)
28	<i>Xylophilus ampelinus</i> (Panagopoulos) Willems et al.	16S gene

According to the data presented, the interest in the application of the nucleotide sequence decoding method increases every year. For example, in the first quarter of 2019, specialists of FGBU “VNIKR” performed more than 1500 analyses of DNA fragments as part of research and to confirm the results of laboratory tests.

Sequencing is used to develop new, optimized and improved methods of diagnostics of pests, such as phytoplasmas, bacteria and insects. Original sequencing data are often the only genetic markers for identifying and confirming the identification of detectable quarantine pests.

At present FGBU “VNIKR” actively uses the sequencing method to ana-

lyze product studies for the presence of quarantine organisms. The method in its modern interpretation allows for one working cycle (run) in one capillary with an accuracy of 98% to determine the sequence of DNA with length up to 1000 base pairs (bp). Its relatively low cost, accuracy, and ease of automation make this method more and more widely used in the laboratory practice of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance.

References

1. Krasnov Ia.M., Guseva N.P., Sharapova N.A., Cherkasov A.V. Modern DNA Sequencing Methods (Review) // Problems of Highly Dangerous Infections, 2014. Vol. 2. P. 73-79.

2. Bondarenko G.N., Belkin D.L. Methodological Recommendations on Sequencing in Diagnostics of Quarantine Objects and Other Organisms. M.: FGBU “VNIKR”, 2018. 34 p.

3. Chemeris A.V., Ahunov E.D., Vahitov V.A. DNA Sequencing. M.: Nauka, 1999. 428 p.

4. Pareek C.S., Smoczynski R., Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing // J. Appl. Genetics, 2011. Vol. 52, № 4. P. 413-435.

5. Pettersson E., Lundeberg J., Ahmadian A. Generations of sequencing technologies // Genomics, 2009. Vol. 93, № 2. P. 105-111.

6. [Electronic resource]. International genetic database. Access mode: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

ОСОБО ОПАСНЫЕ ГРИБНЫЕ БОЛЕЗНИ СОИ, ИМЕЮЩИЕ ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ СТРАН – ИМПОРТЕРОВ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ ПРОДУКЦИИ

Е.Р. Ручков, младший научный сотрудник лаборатории микологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР»
Т.А. Сурина, заведующая лабораторией микологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР»

Аннотация. В статье представлена общая информация об особо опасных болезнях сои: рак стеблей сои *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, гниение семян сои, вызванное фомопсисом, *Phomopsis longicolla*, фитофтороз сои *Phytophthora sojae* и ржавчина сои *Phakopsora pachyrhizi*. Описаны основные симптомы поражения растений патогенами и их распространение на территории России, согласно литературным источникам.

Ключевые слова. Соя, карантинные грибы, симптомы, болезни сои, распространение, импорт.

Лидерство среди всех масличных культур в мировом производстве растительных масел удерживает соя. Те же позиции она занимает и среди зерновых и зернобобовых культур по содержанию белка. Соя активно используется в пищевой промышленности, является ключевым компонентом для сбалансированной кормовой базы, без которой развитие животноводства не может быть интенсивным, что делает ее основной белково-масличной культурой (Лукомец и др., 2015).

Соя занимает почетное место среди основных сельскохозяйственных культур на агропродовольственном рынке, подтверждая свою значимость спросом у широкого круга производителей, которые используют ее и продукты ее переработки. В связи со сложившейся ситуацией соя оказывает значительное воздействие на



Рис. 1. Некроз стебля сои (фото Daren Mueller, Iowa State University, bugwood.org)
Fig. 1. Stem blight of soybean (photo by Daren Mueller, Iowa State University, bugwood.org)



Рис. 2. Рак стеблей сои (фото Daren Mueller, Iowa State University, bugwood.org)
Fig. 2. Soy stem canker (photo by Daren Mueller, Iowa State University, bugwood.org)

развитие мирового рынка продукции масложирового комплекса, определяющего ситуацию с ресурсами базовых продовольственных и кормовых продуктов (Кривошлыков, Рощина, 2016).

Перспективы развития отечественного рынка сои определяются возможностями его интеграции в мировой рынок. Мировое производство сои растет динамичными темпами и за последние 30 лет оно увеличилось на 400% (Линников, 2018).

Для успешной интеграции в мировой рынок соя, выращенная в России, должна соответствовать фитосанитарным требованиям стран-импортеров. Основными импортерами отечественной сои в январе-декабре 2017 г. были Китай (86,87%) и Иран (6,16%), а в 2018 г. основным покупателем являлся Китай, на который пришлось 93% всех поставок российской сои (Экспорт соевых бобов., 2019).

Карантинными видами грибов для Китая являются: *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* – возбудитель рака стеблей сои, *Phomopsis longicolla* – возбудитель гниения семян сои, *Phytophthora sojae* – возбудитель фитофтороза сои. Для Ирана карантинными являются виды *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* и *Phakopsora pachyrhizi* – возбудитель ржавчины сои. Распространение указанных видов на территории России точно не определено, а информация, встречающаяся в литературе, неоднозначна. Последний мониторинг фитосанитарного состояния полей сои проводился в 80-е годы на территории СССР, и по итогам этой работы были обнаружены указанные возбудители. Места их обнаружения сегодня в основном находятся вне российских границ, но в непосредственной близости к ним.

Рак стеблей сои, возбудителем которого является *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* (рис. 1, 2), проявляет первые признаки на проростках в виде бурых вдавленных пятен на нижней стороне семядольных листьев. На гипокотиле образуются пятна от светло-бурого до коричневого цвета. Сильно пораженные проростки усыхают. Более четко признаки проявляются в период цветения и



Рис. 3. Гниение семян сои, вызванное фомопсисом (foto Adam Sisson, Iowa State University, bugwood.org)

Fig. 3. Seed decay of soybean caused by *phomopsis* (photo by Adam Sisson, Iowa State University, bugwood.org)



Рис. 4. Симптомы поражения фомопсисом растения сои (foto Daren Mueller, Iowa State University, bugwood.org)

Fig. 4. Symptoms of damage to soybean plants (photo by Daren Mueller, Iowa State University, bugwood.org)

бобообразования. У пораженных растений в нижней части стебля (выше второго междоузлия) образуются буровато-коричневые некрозы (Лукомец и др., 2007).

Возбудитель может поражать не только сою, но и хлопчатник, подсолнечник, вигну, долихос, фасоль и люпин (Скрипка, Подкина, 1990).

Phomopsis longicolla – возбудитель гниения семян сои, вызываемого фомопсисом (ФГС) (рис. 3),

известен прежде всего как возбудитель сухой гнили семян (Li, 2011). Стручки сои могут быть заражены в любое время после их образования. Семена сои, зараженные *P. longicolla* или другим грибом *Phomopsis* spp., могут быть бессимптомными или иметь вид сморщенных, удлинённых или потрескавшихся и часто кажутся мелово-белыми. Внутри семени грибок колонизирует все ткани семенной оболочки и семядолей.

Заболевание подавляет рост и развитие растения до и после появления всходов. Зараженные семена либо не прорастают, либо прорастают медленнее здоровых семян. В вегетационный период характерным симптомом является обесцвечивание тканей в нижней части стебля в месте соединения ветки и черешка и последующее увядание и гибель растения (рис. 4). При влажной погоде на стеблях могут образовываться черные пикнидии клювообразной формы (Cui, 2009).

Согласно литературным данным, возбудители рака стеблей и гниения семян сои были обнаружены в России на территории Краснодарского края (Скрипка, Подкина, 1990; Гомжина, Ганнибал, 2018).

Phytophthora sojae – возбудитель фитофтороза сои. Он вызывает задержку роста, увядание, корневую и стеблевую гниль сои (рис. 5, 6). Зараженные молодые растения буреют, увядают и погибают. Поражения могут возникнуть в любом месте корня, гипокотилия или семядоли. Наиболее характерным симптомом является стволовая гниль, возникающая после развития первичных листьев, при которой от основания растения вверх по стеблю развиваются буро-коричневые некрозы (Dorrance et al., 2008).

Однозначную оценку распространения возбудителя фитофтороза сои на территории России дать невозможно, так как информация в источниках противоречива.

Phakopsora pachyrhizi – возбудитель ржавчины сои (рис. 7, 8). Наиболее распространенными симптомами являются темно-коричневые или красновато-коричневые поражения (от 2 до 5 мм²), которые обычно сгруппированы вдоль жилок. Патогенез начинается с небольших водянистых поражений, которые постепенно увеличиваются в размерах, превращаясь из серых в коричневые. Они принимают многоугольную форму, ограниченную листовыми жилками, и обычно в процессе развития сливаются в более крупное пятно поражения. В фазу созревания и образования стручков сои симптомы быстро распро-



Рис. 5. Стволовая гниль (foto Daren Mueller, Iowa State University, bugwood.org)

Fig. 5. Stem rot (photo by Daren Mueller, Iowa State University, bugwood.org)

страняются на среднюю и верхнюю части растения. Поражения встречаются на черешках, стручках и стеблях, но наиболее часто на листьях. При сильном развитии болезни возможно преждевременное опадение листьев и раннее вызревание растения. Активность инфицирования зависит от наличия влаги на поверхности растений и температуры воздуха между 15 и 28 °С (Mini data sheet..., 2009).

В России этот возбудитель распространен на Северном Кавказе и Дальнем Востоке (Болезни сельскохозяйственных культур...).

Основное распространение опасных возбудителей сосредоточено в мировых центрах возделывания сои Северной и Южной Америки. Этиология и патогенез локальных изолятов описаны достаточно подробно, как и их диагностика, однако в последнее время в мировой практике принято выделение подвидов и рас особо опасных патогенов сои с различной степенью агрессивности и вирулентности.

Фитопатологические обследования на выявление указанных видов на территории нашей страны



Рис. 6. Пораженные фитофторозом растения сои (foto Daren Mueller, Iowa State University, bugwood.org)
Fig. 6. Soybean plants damaged by phytophthora (photo by Daren Mueller, Iowa State University, bugwood.org)



Рис. 7. Пустулы на обратной стороне листа сои (foto Florida Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, bugwood.org)
Fig. 7. Pustules on the back of the soybean leaf (photo by Florida Division of Plant Industry, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, bugwood.org)

давно не проводились. Литературные данные о распространении патогенов и принадлежности к тому или иному подвиду также требуют актуализации. Поэтому проведение мониторингов посевов сои на территории Российской Федерации является важной задачей. Знание текущего фито-

санитарного состояния посевов позволит повысить экспортный потенциал нашей страны на мировом рынке сои.

Литература

1. Гомжина М.М., Ганнибал Ф.Б. Первая находка гриба *Diaporthe phaseolorum* // Microbiology

Independent Research journal, 2018. Т. 5, № 1. С. 59-64.

2. Кривошлыков К.М., Рощина Е.Ю. Современные тенденции рынка сои в мире и России // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК, 2016. № 2 (166) [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennye-tendentsii-gynka-soi-v-mire-i-rossii>.

3. Линников П.И. Российский рынок сои: тенденции, перспективы развития // Аграрный научный журнал, 2018. № 10. С. 81-86.

4. Лукомец В.М., Пивень В.Т., Кочегура А.В., Дряхлов А.И., Бушнева Н.А. Болезни, вредители и сорняки на посевах сои в Краснодарском крае и меры борьбы с ними // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень ВНИИМК, 2007. № 1 (136). С. 66-75.

5. Лукомец В.М., Кривошлыков К.М., Зеленцов С.В. Потенциал увеличения посевов масличных культур за счет неиспользуемых резервов пахотных земель регионов РФ // Масложивровая промышленность, 2015. № 6. С. 4-9.

6. Скрипка О.В., Подкина Д.В. Рак стеблей – опасное заболевание сои // Микология и фитопатология, 1990. № 3. С. 265-268.

7. [Электронный ресурс]. Болезни сельскохозяйственных культур. *Uromyces sojae* Syd. Ржавчина сои. Режим доступа: http://www.agroatlas.ru/ru/content/diseases/Fabaceae/Fabaceae_Uromyces_sojae.

8. [Электронный ресурс]. Экспорт соевых бобов отстал от прошлого сезона. Режим доступа: <http://zerno.ru/node/4631>.

9. Cui Y.L. et al. First report of *Phomopsis longicolla* causing soybean stem blight in China // Plant Pathology, 2009. Vol. 58, No. 4. P. 799.

10. Dorrance A.E. et al. Isolation, storage, pathotype characterization, and evaluation of resistance for *Phytophthora sojae* in soybean // Plant Health Progress, 2008. Vol. 9, № 1. P. 35.

11. Li S. Phomopsis seed decay of soybean // Soybean-Molecular Aspects of Breeding, 2011. P. 277-292.

12. Mini data sheet on *Phakopsora pachyrhizi* // EPPO, 2009.

HIGHLY DANGEROUS SOYA FUNGAL DISEASES, CRUCIAL FOR COUNTRIES THAT IMPORT DOMESTIC PRODUCTS

E.R. Ruchkov, Junior Researcher of the Mycology Laboratory of the TLC of FGBU "VNIKR"
T.A. Surina, Head of the Mycology Laboratory of the TLC of FGBU "VNIKR"

Abstract. The article presents general information about highly dangerous diseases of soybean: stem canker of soybean *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, seed decay of soybean *Phomopsis longicolla*, root rot of soybean *Phytophthora sojae* and rust of soybean *Phakopsora pachyrhizi*. The main symptoms of plant infestation with pathogens and their spread on the territory of Russia are described according to the literature sources.

Keywords. Soybean, quarantine fungi, symptoms, soybean diseases, spread, import.

Soybean are the leader among all oilseed plants in the global production of vegetable oils. It holds the same positions among grain and legume crops in terms of protein content. Soybean is actively used in the food industry and is a key component of a balanced fodder supply, without which the development of animal husbandry cannot be intensive, making it the main protein-oil crop (Lukomets et al., 2015).

Soybean takes an honorable place among the main agricultural crops in the agricultural and food market, confirming its importance by the demand from a wide range of producers who use it and its processed products. Due to the current situation, soybean has a significant impact on the development of the global market of oil and fat products, which governs the situation with the resources of basic food and fodder products (Krivoshlykov, Roshchina, 2016).

Prospects for the development of the domestic soybean market are determined by the possibilities of



Fig. 8. Soybean leaf necrosis

(photo by Edward Sikora, Auburn University, bugwood.org)

Рис. 8. Некроз листьев сои

(фотом Edward Sikora, Auburn University, bugwood.org)

its integration into the world market. Global soybean production is growing at a dynamic pace and has increased by 400% over the past 30 years (Linnikov, 2018).

For successful integration into the global market, soybean grown in Russia must meet the phytosanitary requirements of importing countries. China (86.87%) and Iran (6.16%) were the main importers of domestic soybean in January-December 2017, while in 2018 the main buyer was China, which accounted for 93% of all Russian soybean export (Export of soybean., 2019).

The quarantine fungi species for China are: stem canker of soybean

Diaporthe phaseolorum var. *caulivora*, seed decay of soybean *Phomopsis longicolla* and root rot of soybean *Phytophthora sojae*. For Iran quarantine species are *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* and *Phakopsora pachyrhizi*, soybean rust pathogens. The distribution of these species on the territory of Russia is not precisely defined, and the information found in the literature is ambiguous. The last monitoring of the phytosanitary condition of soybean fields was carried out in the 80s in the USSR, which resulted in the detection of these pathogens. Today, their detection sites are mainly located outside the territory of Russia, but in close proximity to it.

Stem canker of soybean caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* (Fig. 1, 2) first appears on seedlings in the form of brown depressed spots on the underside of the cotyledonous leaves. Hypocotyles have spots ranging from light brown to brown color. Heavily infected seedlings die back. More clearly visible symptoms reveal in the period of flowering and pod formation. Infected plants have reddish brown necrotic spots in the lower part of the stem (above the second internode) (Lukomets et al., 2007).

The pathogen can infect soybean, as well as cotton, sunflower, vinya, dolichos, wild beans and lupine (Skripka, Podkina, 1990).

Phomopsis longicolla is a pathogen of seed decay of soybean (Fig. 3), caused by phomopsis (Li, 2011). Soybean pods can be infected at any time after their formation. Soybean seeds infected with *P. longicolla* or other *Phomopsis* spp. fungi may be asymptomatic or look wrinkled, elongated or cracked, and often appear chalky-white. Inside the seed, the fungus colonizes all the tissues of the seed coat and the seeds.

The disease suppresses plant growth and development before and after the emergence of seedlings. Infected seeds either do not germinate or germinate slower than healthy seeds. During the growing season, a characteristic symptom is discoloration of the tissue at the bottom of the stem at the point where the branch and petiole join together, followed by wilting and death of the plant (Fig. 4). In wet weather, black beak-shaped pycnidia may form on the stems (Cui, 2009).

According to the literature, stem cankers and soybean rot pathogens were registered in Russia in the Krasnodar Krai (Skripka, Podkina, 1990; Gomzhina, Gannibal, 2018).

Phytophthora sojae is a pathogen of root rot of soybean. It inhibits growth, causes wilting, root and stem rot of soybean (Fig. 5, 6). Infected young plants grow brown, wilt and die. Lesions can occur anywhere in the root, hypocotyle or seed lobe. The most common symptom is stem rot, which occurs after the development of primary leaves, where reddish brown necrotic spots develop from the base of the plant up the stem (Dorrance et al., 2008).

It is impossible to give an unambiguous assessment of the spread of the soybean phytophthora pathogen on the territory of Russia, as the information in the sources is contradictory.

Phakopsora pachyrhizi is a pathogen of rust of soybean (Fig. 7, 8). The most common symptoms are dark brown or reddish brown lesions (2 to 5 mm²), which are usually grouped along the veins. Pathogenesis begins with small watery lesions, which gradually increase in size turning from gray to brown. They take a polygonal shape, restricted by leaf veins, and usually merge into a larger lesion spot as they develop. During the maturation and pod formation phase symptoms quickly spread to the middle and upper parts of the plant. Lesions occur on petioles, pods and stems, but most often on leaves. If the disease develops strongly, the leaves may fall off prematurely and the plant may ripen early. The activity of infection depends on the presence of moisture on the plant surface and the air temperature between 15 and 28 °C (Mini data sheet..., 2009).

In Russia, this pathogen is common in the North Caucasus and the Far East (Disease of crops...).

The main spread of the described pathogens is concentrated in the world centers of soybean cultivation in the North and South America. Etiology and pathogenesis of local isolates are described in detail, as well as their diagnostics, but recently in the world practice it has been accepted to distinguish between subspecies and races of highly dangerous soybean pathogens with different degrees of aggressiveness and virulence.

Phytopathological examinations to identify these species have not been carried out in our country for a long time. Literary data on the spread of pathogens and belonging to a particular subspecies also require updating. Therefore, monitoring of soybean plantations on the territory of the Russian Federation is an important task. Knowledge of the current phytosanitary condition of crops will increase the export potential of our country in the world soybean market.

References

1. Gomzhina M.M., Gannibal F.B. First find of *Diaporthe phaseolorum* fungi // Microbiology Independent Research journal, 2018. Vol. 5, No. 1. P. 59-64.
2. Krivoslykov K.M., Roshchina E.Iu. Modern tendencies of the soybean market in the world and Russia // Oilseed Crops. Scientific and Technical Bulletin of VNIIMK, 2016. No. 2 (166) [Electronic resource]. Access mode: <https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennye-tendentsii-rynka-soi-v-mire-i-rossii>.
3. Linnikov P.I. Russian soybean market: trends, development prospects // The Agrarian Scientific Journal, 2018. No. 10. P. 81-86.
4. Lukomets V.M., Piven V.T., Kochegura A.V., Driakhlov A.I., Bushneva N.A. Diseases, pests and weeds on soybean in the Krasnodar Krai and measures to control them // Oilseed Crops. Scientific and Technical Bulletin of VNIIMK, 2007. No. 1 (136). P. 66-75.
5. Lukomets V.M., Krivoslykov K.M., Zelentsov S.V. Potential to increase oilseed crop sowing at the expense of unused reserves of arable lands in the regions of the Russian Federation // Oil and Fat Industry, 2015. No. 6. P. 4-9.
6. Skripka O.V., Podkina D.V. Stem canker – dangerous soya disease // Mycology and Phytopathology, 1990. No 3. P. 265-268.
7. [Electronic resource]. Agricultural crop diseases. *Uromyces sojae* Syd. Rust of soybean. Access mode: http://www.agroatlas.ru/ru/content/diseases/Fabacee/Fabacee_Uromyces-sojae.
8. [Electronic resource]. Export of soybean lagged behind last season. Access mode: <http://zerno.ru/node/4631>.
9. Cui Y.L. et al. First report of *Phomopsis longicolla* causing soybean stem canker in China // Plant Pathology, 2009. Vol. 58, No. 4. P. 799.
10. Dorrance A.E. et al. Isolation, storage, pathotype characterization, and evaluation of resistance for *Phytophthora sojae* in soybean // Plant Health Progress, 2008. Vol. 9, № 1. P. 35.
11. Li S. Phomopsis seed decay of soybean // Soybean-Molecular Aspects of Breeding, 2011. P. 277-292.
12. Mini data sheet on *Phakopsora pachyrhizi* // EPPO, 2009.

БУРАЯ МОНИЛИОЗНАЯ ГНИЛЬ

Д.И. Шухин, младший научный сотрудник лаборатории микологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР»
А.А. Кузнецова, старший научный сотрудник лаборатории микологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР»

Аннотация. В статье представлена общая информация по возбудителю бурой монилиозной гнили *Monilinia fructicola*. Описана биология возбудителя, его цикл развития, а также вредоносность болезни. Представлена информация об обнаружении возбудителя болезни в импортной продукции лабораторией микологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР».

Ключевые слова. Бурая монилиозная гниль, монилиоз, плодовые культуры, косточковые культуры, фитопатоген, карантинный объект.

Одним из основных наиболее опасных заболеваний плодовых культур является монилиоз, вызываемый грибами из рода *Monilinia*. Известно четыре вида, вызывающих данное заболевание: *M. fructigena*, *M. laxa*, *M. polystroma* и *M. fructicola*.

Серьезную опасность представляет вид *M. fructicola*, который способен в короткие сроки наносить значительный ущерб насаждениям плодовых культур. Основными растениями-хозяевами являются яблоня, слива, абрикос, черешня, персик, нектарин и другие плодовые культуры.

Вид *M. fructicola* является эндемиком Северной Америки. Тем не менее, ввиду высокой агрессивности патогена, а также наличия латентной формы инфекции, данный вид получил широкое распространение по всему миру, в том числе и на территории ЕС. В России и на территории ЕАЭС данный вид является карантинным и включен в Список А1. Распространение патогена в мире представлено на рис. 1.

При благоприятных погодных условиях болезнь стремительно распространяется. Проливные дожди в период цветения, дневная температура воздуха от 20 до 25 °С, а также пониженные ночные температуры – идеальные условия для распространения патогена.

Цикл развития выглядит следующим образом: источником первичной инфекции являются споры анаморфной стадии гриба, которые образуются весной из мицелия, перезимовавшего в мумифицированных плодах, а также в язвах на ветках и почках. Споры гриба разносятся ветром или с капельно-жидкой влагой и проникают в растение через повреждения покровов,

вызванные в том числе вредителями, а также через рыльце пестика. Происходит поражение как вегетативных частей, так и генеративных.

Поражение плодов происходит на всех стадиях развития, однако с разной интенсивностью. Наиболее подвержены заражению почти созревшие и зрелые плоды. Незрелые плоды менее подвержены заражению. Наиболее восприимчивая фаза – за 2-3 недели до уборки урожая. Механические повреждения способствуют проникновению инфекции, однако патоген способен проникать непосредственно через эпидермис.

После проникновения в ткань растения-хозяина спора образует мицелий, из которого через некоторое время формируются новые споры. При оптимальной влажности на поверхности пораженных органов появляются серые или бурые подушечки конидиеносцев с конидиями – спородохии (рис. 2). Вторичная споруляция зависит от природных условий и происходит примерно через 7-10 дней после заражения. Патоген может давать несколько поколений конидий за вегетационный период. На

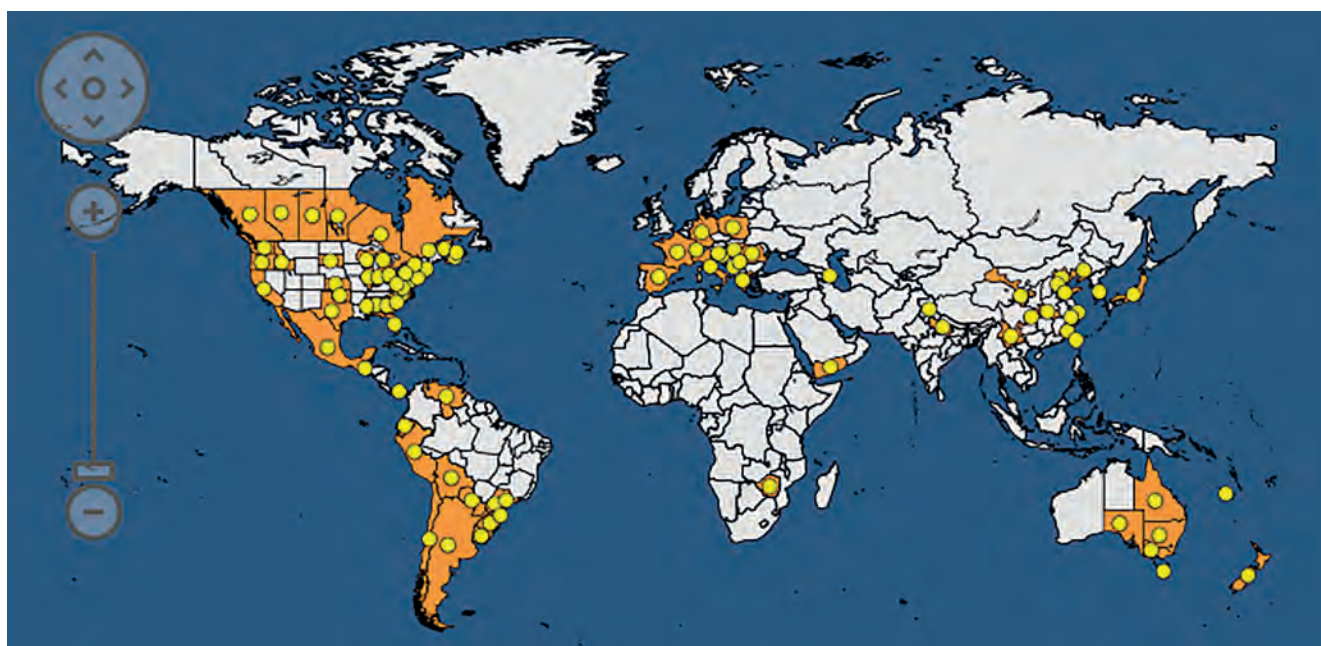


Рис. 1. Распространение *M. fructicola* в мире (фото с сайта gd.eppo.int)
Fig. 1. Distribution *M. fructicola* around the world (photo from gd.eppo.int)

цветках и ветвях болезнь проявляется в виде ожогов и некротических пятен. Пораженные плоды сохнут, сморщиваются и мумифицируются, при этом могут опасть или остаться на дереве. Мумифицированные плоды служат источником инфекции на следующий год (рис. 3).

В жизненном цикле *M. fructicola* большую роль играет телеоморфная стадия – апотеции с аскоспорами. Мицелий гриба в мумифицированных плодах, прикрытых почвой, способен образовывать апотеции, в которых весной образуются аскоспоры и заражают растения. Тем не менее в Европе не зарегистрировано случаев образования апотециев на мумифицированных плодах.

Особенностью данного патогена является довольно продолжительная латентная форма инфекции в плодах, при которой отсутствуют видимые симптомы поражения. Активизация патогена и проявление симптомов поражения происходят при наступлении благоприятных условий, зачастую в послеуборочной фазе, когда плоды уже достигли хранилищ или конечного потребителя. Поэтому своевременный досмотр, выявление и идентификация возбудителя в импортной плодовой продукции является очень важной задачей.

В лаборатории микологии ФГБУ «ВНИИКР» в 2017 и 2018 годах было проанализировано 239 импортных образцов плодов семечковых и косточковых культур. Лабораторные исследования проводились методами влажной камеры, выделения на питательную среду и методом ПЦР с видоспецифичными праймерами.

В результате возбудитель бурой монилиозной гнили был выявлен в 18 случаях – на плодах нектаринов и персиков из ЮАР, Сербии, Македонии, Китая, Турции и Гвинеи.

Вред, причиняемый всеми видами *Monilinia*, зависит от культуры, погодных условий, защитных мероприятий. Так, *M. laxa* наносит большой ущерб косточковым культурам, а *M. fructigena* – семечковым.

Последствия повреждения грибами весьма значительны в садах (до 50% потеря). В процессе транспортировки и хранения загнивают от 5 до 25% инфицированных плодов. До недавнего времени самые серьезные потери наносил вид *M. laxa*. В 1999 году в Сербии, в провинции Воеводина,

в результате монилиального ожога цветков и ветвей вишни потери достигли 100%. Также был отмечен значительный ущерб в других странах: в США, в штате Калифорния, во время хранения продукции потери достигали 30%; в Испании во время хранения было потеряно 59% урожая. При этом потери от *M. fructigena* составляют от 10 до 30%.

Обладая более высокой агрессивностью, *M. fructicola* способен нанести значительно больший ущерб, особенно на косточковых культурах, как до, так и после уборки урожая. Распространяясь быстрее, чем близкородственные виды, и обладая устойчивостью ко многим фунгицидам, *M. fructicola* может быстро заражать сады. На складах пораженные плоды способны вызывать гниль на всех ближайших плодах в короткие сроки. Было показано, что потери от *M. fructicola* составляют от 20 до 100% в течение 5 дней после уборки. В сильно зараженных садах возбудитель заболевания может поражать от 30 до 60% деревьев, а иногда до 100%. В Северной Америке данный гриб наносит огромный ущерб персикам, вишням и сливам. В Австралии потери в 1 миллион австралийских долларов были отмечены в 1969 году на персиках в штате Новый Южный Уэльс. Также значительные потери были зарегистрированы на абрикосах в Тасмании.

Особенно большой ущерб отмечается в регионах с благоприятными климатическими условиями (высокая влажность, температура 20–25 °C).

Климатические условия Российской Федерации позволяют *M. fructicola* быстро распространиться по всей территории страны. Ввиду большого количества плодовых насаждений данный патоген способен вызвать серьезные потери как при производстве, так и при хранении продукции.

Литература

1. Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза. Утвержден Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 30 ноября 2016 г. № 158 (с изм. и доп. от 30 марта 2018 г.).

2. Обзор фитосанитарного состояния посевов сельскохозяйственных культур в Российской Федерации в 2018 году и прогноз развития вредных объектов в 2019 году // ФГБУ «Россельхозцентр», 2019.



Рис. 2. Плод, пораженный *M. fructicola* (фото с сайта gd.eppo.int)

Fig. 2. Fruit infected by *M. fructicola* (photo from gd.eppo.int)

3. Byrde R.J.W., Willetts H.J. The brown rot fungi of fruit: their biology and control // Pergamon press, 1977. 171 p.

4. Emery K.M., Michailides T.J., Scherm H. Incidence of Latent Infection of Immature Peach Fruit by *Monilinia fructicola* and Relationship to Brown Rot in Georgia // Plant Disease, 2000. № 8. P. 853-857.

5. Genus *Monilinia* on pome and stone fruit / J. Hrustić, M. Mihajlović, M. Grahovac, G. Delibašić, A. Bulajić, B. Krstić and B. Tanović // Pestic. Phytomed. (Belgrade), 2012. № 27 (4). P. 283-297.

6. Poniatowska A., Michalecka M., Bielenin A. Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland // European Journal of Plant Pathology, 2012. № 135 (4). P. 855-865.

7. [Электронный ресурс]. *Monilia fructigena* (Pers.) Pers. – Плодовая гниль, или монилиоз яблони // AgroAtlas: Болезни сельскохозяйственных культур. Режим доступа: http://www.agroatlas.ru/ru/content/diseases/Pomae/Pomae_Monilia_fructigena.

8. [Электронный ресурс]. *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey / Index Fungorum. Режим доступа: <http://www.indexfungorum.org/NAMES/NamesRecord.asp?RecordID=236989>.

9. [Электронный ресурс]. *Monilinia fructicola* / EPPO Global Database. Режим доступа: <https://gd.eppo.int/taxon/MONIFC>.

10. [Электронный ресурс]. Росстат посчитал посевные площади России / Известия.ру. Режим доступа: <https://iz.ru/772906/2018-07-31/rosstat-poschital-posevnye-ploshchadi-rossii>.

BROWN ROT OF STONE FRUITS

D.I. Shukhin, Junior Researcher of the Mycology Laboratory of the TLC of FGBU "VNIKR"

A.A. Kuznetsova, Senior Researcher of the Mycology Laboratory of the TLC of FGBU "VNIKR"

Abstract. *The article presents general information on the pathogen of brown rot of stone fruits *Monilinia fructicola*. It describes the biology of the pathogen, its development cycle, and the harmfulness of the disease. It also contains information on the detection of the pathogen in imported products obtained by the Mycology Laboratory of the TLC of FGBU "VNIKR".*

Keywords. *Brown rot of stone fruits, moniliosis, fruit crops, stone fruit crops, phytopathogen, quarantine object.*

One of the most dangerous diseases of fruit crops is moniliosis caused by fungi of the genus *Monilinia*. There are four species that are known to cause this disease: *M. fructigena*, *M. laxa*, *M. polystroma* and *M. fructicola*.

M. fructicola, which is capable of causing significant damage to fruit crop plantations in a short period of time, poses a serious danger. The main hosts are apple, plum, apricot, cherry, peach, nectarine and other fruit crops.

M. fructicola is an endemic species of North America. However, due to the high aggressiveness of the pathogen, as well as the presence of a latent form of infection, this species has become widespread around the world, includ-

ing the EU. In Russia and the EEU, this species is a quarantine one and included in the A1 List. The distribution of the pathogen in the world is shown in Fig. 1.

In favorable weather conditions, the disease spreads rapidly. Heavy rains during blossoming, daytime air temperatures between 20 and 25 °C, as well as low nighttime temperatures are ideal conditions for the spread of the pathogen.

The development cycle is as follows: the source of primary infection are spores of anamorphic stage of the fungus, which are formed in the spring from mycelium, which overwintered in mummified fruits, as well as in ulcers on branches and buds. Fungus spores are spread by wind or droplets of moisture and penetrate the plant through damaged areas, caused by pests as well, and pest damage and the style snout. Both vegetative and generative parts are damaged.

Fruits are affected at all stages of development, but with varying intensity. Fruits that are almost ripe and mature are the most susceptible to infection. Immature fruits are less susceptible to infestation. The most susceptible phase is 2-3 weeks before harvest. Mechanical

damage contributes to the penetration of infection, but the pathogen can penetrate directly through the epidermis.

After penetration into the host tissue, the spore forms mycelium, from which new spores develop after some time. At optimal humidity, grey or brown conidiophores with conidia appear on the surface of the affected organs – sporodochia (Fig. 2). Secondary sporulation depends on environmental conditions and occurs approximately 7-10 days after infection. The pathogen can produce several generations of conidia during the growing season. On flowers and branches, the disease reveals itself in the form of blight and necrotic spots. Affected fruits dry out, wrinkle and mummify, and can fall off or stay on the tree. Mummified fruits are a source of infection for the following year (Fig. 3).

In the life cycle of *M. fructicola* a great role is played by the teleomorphic stage – apothecia with ascospores. Fungus mycelium in soil-covered mummified fruits is able to form apothecia, which form ascopes and infect plants in spring. However, no cases of mummified fruit apothecia have been recorder in Europe.

The peculiarity of this pathogen is a rather prolonged latent form of infec-



Fig. 3. Mummified peach fruits (photo by D.I. Shukhin)

Рис. 3. Мумифицированные плоды персика (фото Д.И. Шухина)

tion in fruits, in which there are no visible symptoms of damage. The pathogen and symptoms of damage occur under favorable conditions, often in the post-harvest phase, when the fruits have already reached the warehouses or the end user. Therefore, timely inspection, detection and identification of the pathogen in imported fruit products is a very important task.

239 imported samples of fruit of seeds and bone crops were analyzed in the mycology laboratory of FGBU "VNIKR" in 2017 and 2018. The laboratory tests were conducted by wet chamber, isolation on nutrient medium and PCR with species-specific primers.

As a result, the pathogen of brown rot of stone fruits was detected in 18 cases – on nectarine and peach fruits from South Africa, Serbia, Macedonia, China, Turkey and Guinea.

The damage caused by all *Monilinia* species depends on the crop, weather conditions and protective measures. For example, *M. laxa* causes more damage to stone fruit crops and *M. fructigena* causes more damage to pome fruits crops.

The consequences of fungi damage are very significant in gardens (up to 50% of losses). In the process of transportation and storage, between 5 and 25% of infected fruits rot. Until recently, the most serious losses were caused by the species *M. laxa*. In 1999, in Serbia, in the province of Vojvodina, the losses of cherry trees and flowers reached 100% as a result of monilial blight of cherry flowers and branches. There has also been significant damage in other countries: in the United States of America, in the state of California, losses reached 30% during storage; in Spain, 59% of the harvest was lost during storage. The losses from *M. fructigena* range from 10 to 30%.

Being more aggressive, *M. fructicola* is able to do much more damage, especially to the stone fruit crops, both before and after the harvest. Spreading faster than closely related species and resistant to many fungicides, *M. fructicola* can quickly infect gardens. In warehouses, affected fruits can cause rot on all nearby fruits in a short time. It has been shown that losses from *M. fructicola* range from 20 to 100% within 5 days of harvesting. In heavily infested orchards, the pathogen can infect 30 to 60% of the trees, and sometimes up to 100%. In North America, this fungus

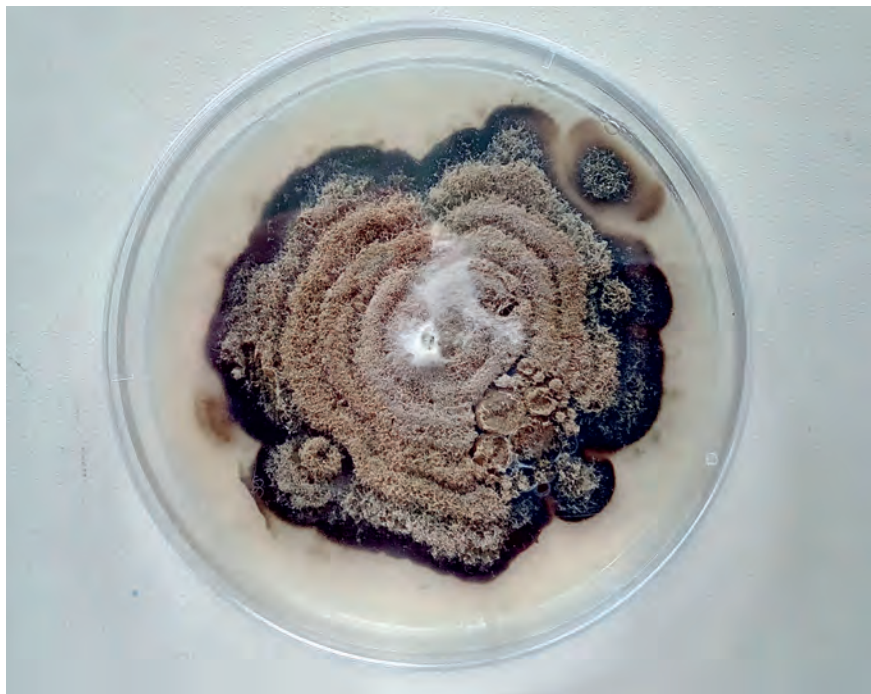


Fig. 4. Pure culture of *M. fructicola* (photo by D.I. Shukhin)
Рис. 4. Чистая культура *M. fructicola* (фото Д.И. Шухина)

causes enormous damage to peaches, cherries and plums. In Australia, a loss of 1 million Australian dollars was recorded in 1969 on peaches in New South Wales. Significant losses were also recorded on apricots in Tasmania.

Especially huge damage is recorded in regions with favorable climatic conditions (high humidity, temperature of 20-25 °C).

Climatic conditions of the Russian Federation allow *M. fructicola* to spread quickly throughout the country. Due to the large number of fruit plantations, this pathogen can cause serious losses both for production and storage of products.

References

1. Uniform List of Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union. Approved by the Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission as of 30 November 2016. No. 158 (with changes and additions as of 30 March 2018).
2. Review of the phytosanitary condition of agricultural crops in the Russian Federation in 2018 and forecast of development of harmful objects in 2019 // FGBU Rosselkhoztsentr, 2019.
3. Byrde R.J.W., Willetts H.J. The brown rot fungi of fruit: their biology and control // Pergamon press, 1977. 171 p.
4. Emery K.M., Michailides T.J., Scherm H. Incidence of Latent Infec-

tion of Immature Peach Fruit by *Monilinia fructicola* and Relationship to Brown Rot in Georgia // Plant Disease, 2000. № 8. P. 853-857.

5. Genus *Monilinia* on pome and stone fruit / J. Hrustić, M. Mihajlović, M. Grahovac, G. Delibašić, A. Bulajić, B. Krstić and B. Tanović // Pestic. Phytomed. (Belgrade), 2012. № 27 (4). P. 283-297.

6. Poniatowska A., Michalecka M., Bielenin A. Characteristic of *Monilinia* spp. fungi causing brown rot of pome and stone fruits in Poland // European Journal of Plant Pathology, 2012. № 135 (4). P. 855-865.

7. [Electronic resource]. *Monilia fructigena* (Pers.) Pers. – Brown rot of stone fruits or moniliosis of apple // AgroAtlas: Diseases of agricultural crops. Access mode: http://www.agroatlas.ru/ru/content/diseases/Pomae/Pomae_Monilia_fructigena.

8. [Electronic resource]. *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey / Index Fungorum. Access mode: <http://www.indexfungorum.org/NAMES/Names-Record.asp?RecordID=236989>.

9. [Electronic resource]. *Monilinia fructicola* / EPPO Global Database. Access mode: <https://gd.eppo.int/taxon/MONIFC>.

10. [Electronic resource]. Rosstat calculated the sown areas of Russia / Izvestia.ru. Access mode: <https://iz.ru/772906/2018-07-31/rosstat-poschital-posevnye-ploshchadi-rossii>.

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ БИОЛОГИИ ИНВАЗИОННОГО ВИДА МУРАВЬЕВ *LINEPITHEMA HUMILE*

**Н.А. Гревцова, младший научный сотрудник научно-методического отдела энтомологии
ФГБУ «ВНИИКР»**

Аннотация. В статье приводятся сведения об одном из инвазионных видов насекомых, аргентинском муравье *Linepithema humile* (Mayr). Рассматриваются распространение, инвазионная активность, биотопическая приуроченность, возможность проникновения на территорию Российской Федерации. Проанализированы те особенности биологии вида, которые позволяют ему успешно расширять свой ареал, вытесняя с новых, занятых им территорий аборигенную биоту.

Ключевые слова. Муравьи, инвазионный вид, интродуцент, аргентинский муравей, *Linepithema humile*.

Среди известных к настоящему времени насекомых-интродуцентов более 200 видов приходится на муравьев (Стукалюк, 2015). Одним из таких инвазионных видов является аргентинский муравей *Linepithema humile* (Mayr, 1868) (Hymenoptera: Formicidae: Dolichoderinae) (Захаров, 2015), который уже довольно широко распространился в мире. Он происходит из Северной Аргентины, где распространен в бассейне реки Парана и в прилегающих районах (CISR, 2014; Wetterer et al., 2009). Муравей попал на другие континенты с человеком, причем иногда целые фрагменты колоний перемещались с помощью транспортных средств (GISD, 2019). Недавно было отмечено, что почти каждый пароход, курсирующий между городами Новый Орлеан и Батон-Руж (США, штат Луизиана), был заселен этим видом. В Средиземноморье вредитель попал в XIX веке (Wetterer et al., 2009). В настоя-

щее время в Южной Европе можно наблюдать сплошные поселения аргентинского муравья, которые протянулись на сотни километров вдоль береговой линии (Стукалюк, 2015), и вид продолжает активно расселяться. Данные о самом северном нахождении вида получены из Санднеса, Норвегия (Wetterer et al., 2009). В связи с тем, что аргентинского муравья сложно определять и довольно легко спутать с близкими видами, существуют неверные указания о его регистрации в некоторых странах. В работах Wild (2004, 2007) и Wetterer et al. (2009) на основе изучения коллекционного материала и первоисточников подробно рассмотрен этот вопрос и приведены наиболее полные и достоверные данные о распространении *L. humile* (рис. 1). В настоящее время *L. humile* внесен в карантинные списки A1 Турции и Бахрейна.

Рассматриваемый вид уже распространился на большинстве равнинных субтропических территорий со средиземноморским климатом. При этом в одних районах, например на одном из островов Калифорнии, в Японии и Новой Зеландии, численность популяций все еще увеличивается, в других, напротив, сокращается. На острове Мадейра *L. humile* когда-то был серьезным вредителем, но теперь он встречается редко, за исключением полузасушливых восточных районов. По-прежнему отсутствует информация о появлении вида в Восточном Средиземноморье к востоку от Крита, в южном Китае и в Центральной Африке, в районах с подходящим для него средиземно-

морским климатом (Wetterer et al., 2009). На территории РФ наиболее подходящие для данного вида климатические условия существуют в южных регионах (в первую очередь в Краснодарском крае и Крыму).

Наибольшее предпочтение *L. humile* отдает различным нарушенным экологическим сообществам, в том числе агроценозам и городам (Захаров, 2015), заселяя дома, задние дворы, огороды, зоны парковок и даже горшечные растения (Wild, 2007; AntWeb, 2019).

Численность одной семьи аргентинского муравья составляет менее 50 тыс. особей, тогда как у другого инвазионного вида, *Pheidole megacephala* Fabricius, семья включает более 100 тыс. особей (Захаров, 2015). *L. humile* обладает способностью образовывать надсемейные структуры: между муравейниками происходит постоянный обмен особями, миграционные потоки, за счет чего выравниваются гнездовые запахи и понижается взаимная агрессивность особей из разных муравейников этого вида. Благодаря способности образовывать надсемейные структуры и наличию нескольких яйцекладущих маток в семье муравьи *L. humile* образуют масштабные поселения с высокой численностью и плотностью (Wild, 2007; Wetterer et al., 2009). При этом они в основном образуют подземные гнезда, из-за чего с ними сложно бороться при помощи инсектицидов.

Аргентинские муравьи являются хищниками и падальщиками, то есть зоонекрофагами, в соответствии с классификацией Длусского (1981), и при этом имеют склон-

ность к ухаживанию за насекомыми из отряда Hemiptera, выделяющими падь (Wild, 2007; Wetterer et al., 2009). Эти муравьи легко образуют новые разветвленные кормовые дорожки. Вследствие активного питания многочисленного населения колоний *L. humile* существенно снижается численность и разнообразие аборигенной фауны членистоногих и позвоночных и даже изменяется структура растительного сообщества (Wetterer et al., 2009). Из-за сильного и заметного влияния на различные аспекты биоразнообразия появление *L. humile* на новых территориях, особенно в сельскохозяйственных зонах, вызывает серьезные опасения.

Несмотря на пониженную агрессивность между особями различных гнезд внутри одной колонии, аргентинские муравьи крайне агрессивны в отношении других видов и чаще всего вытесняют аборигенные виды. Однако известны и противоположные случаи, в частности, при заселении территории двумя серьезными интродуцентами. На Бермудских островах *Pheidole megacephala* появился в конце XIX века и распространился по всей территории; затем в середине XX века сюда был занесен *L. humile*, который в свою очередь начал быстро расселяться; предполагалось, что он через какое-то время вытеснит *P. megacephala* и займет его место, однако к 1959 году продвижение *L. humile* замедлилось, и теперь в некоторых районах *P. megacephala* завоевывает территорию обратно (Брайен, 1986).

Аргентинский муравей – не единственный вид муравьев, который известен активным вселением в города. Например, один из самых обычных городских видов в Москве – это *Lasius niger*. Вид активно селится в садах, парках, на клумбах и газонах, под плиткой и вдоль бордюров. Вне города он также образует масштабные поселения на открытых пространствах, поймах, лугах. Мирмеколог А.А. Захаров (2015) выделяет следующие сходные особенности биологии *L. humile* и некоторых других видов «урбанистов», в том числе и *Lasius niger*:

- могут образовывать новые семьи несколькими путями – при

помощи самок-основательниц или почкованием; при этом не нуждаются в фазе временного социального паразитизма, при котором молодая самка проникает в гнездо вида-хозяйина, убивает имеющуюся там самку и занимает ее место, а рабочие муравьи выкармливают ее потомство, которое постепенно полностью замещает муравьев-хозяев;

- высокая суммарная плодовитость самок, возможна полигиния;

- достаточно высокая численность семьи;

- постоянные надсемейные структуры и единовременное обитание одной семьи в нескольких различных по своим функциям гнездах (поликалия). Это позволяет иметь миллионные суммарные уровни численности в одном локальном поселении;

- всеядны (политрофы), имеют развитую систему мобилизации и хотя бы частично охраняемую территорию семьи;

- используют групповую фуражировку и транспортировку добычи; мелкие виды используют, кроме того, тактику коллективного боя, что повышает их конкурентоспособность при прямом вытеснении других муравьев с территории;

- осваивают несколько субстратов гнездования.

Очевидно, что для оценки вероятности обоснования какого-либо вида на новых территориях, помимо факторов окружающей среды, следует учитывать совокупность особенностей биологии, в частности таких, которые обеспечивают виду конкурентоспособность, позволяют широко распространяться и занимать доминирующее положение в сообществах. Для *L. humile*, одного из самых инвазивных и опасных видов муравьев, характерны признаки вида-«урбаниста», перечисленные выше, в сочетании с высокими миграционными возможностями, низкой агрессивностью между колониями, но при этом с высокой межвидовой агрессивностью, небольшими размерами особей (рис. 2), быстрой сменой яйцекладущих самок и полной стерильностью рабочих особей. Аргентинский муравей широко распространился с помощью человека (Захаров, 2015) и продолжает осваивать

территории нарушенных экологических сообществ. В случае завоза на территорию РФ данный вид скорее всего сможет обосноваться, в первую очередь в южных регионах, и трудно предсказать, смогут ли аборигенные виды муравьев оказать ему достойное сопротивление.

Литература

1. Брайен М.В. Общественные насекомые: экология и поведение. М., 1986. 400 с.
2. Длусский Г.М. Муравьи пустынь. М., 1981. 230 с.
3. Захаров А.А. Муравьи лесных сообществ, их жизнь и роль в лесу. М., 2015. 404 с.
4. Стукалюк С.В. *Crematogaster subdentata* Mayr, 1877 – новый для фауны Крыма потенциально инвазивный вид муравьев (Hymenoptera, Formicidae) // Зоологический журнал, 2015. Т. 94, № 10. С. 1211-1225.
5. Wild A. Taxonomic revision of the ant genus *Linepithema* (Hymenoptera: Formicidae) // University of California Publications in Entomology, 2007. 126: 1-151.
6. Wild A. Taxonomy and distribution of the Argentine ant, *Linepithema humile* (Hymenoptera: Formicidae) // Annals of the Entomological Society of America, 2004. 97: 1204-1215.
7. Wetterer J.K., Wild A.L., Suarez A.V., Roura-Pascual N., Espadaler X. Worldwide spread of the Argentine ant, *Linepithema humile* (Hymenoptera: Formicidae) // Myrmecological News, 2009. 12: 187-194.
8. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://gd.eppo.int/taxon/IRIDHU>.
9. [Электронный ресурс]. Global Invasive Species Database. Species profile: *Linepithema humile*. Режим доступа: <http://www.iucngisd.org/gisd/speciesname/Linepithema+humile> on 30-04-2019.
10. [Электронный ресурс]. Daugherty M. Argentine Ant (*Linepithema humile*). Center for Invasive Species Research, 2014. Режим доступа: https://cissr.ucr.edu/argentine_ant.html.
11. [Электронный ресурс]. AntWeb: Ants of California. Режим доступа: <http://www.antweb.org/california.jsp>.

SOME BIOLOGICAL FEATURES OF INVASIVE SPECIES OF ANTS *LINEPITHEMA HUMILE*

N.A. Grevtsova, Junior Researcher of Entomological Research and Methodology Department of FGBU "VNIKR"

Abstract. The article provides information about one of the invasive species of insects, the Argentine ant *Linepithema humile* (Mayr). The article considers the distribution, invasive activity, biotopic confinement, possibility of penetration into the territory of the Russian Federation. The peculiarities of the biology of the species, which allow it to successfully expand its range, displacing the indigenous biota from the new territories occupied by it, are analyzed.

Keywords. Ants, invasive species, introduced species, Argentine ant, *Linepithema humile*.

Among the currently known introduced insect species, more than 200 species are ants (Stukaliuk, 2015). One such invasive species is the Argentine ant *Linepithema humile* (Mayr, 1868) (Hymenoptera: Formicidae: Dolichoderinae) (Zakharov, 2015), which is already quite common worldwide. It originates from northern Argentina, where it is spread in the Parana River basin and adjacent areas (CISR, 2014; Wetterer et al., 2009). The Ant has migrated to other continents with humans, and sometimes entire colony fragments have been transported (GISD, 2019). It has recently been noted that almost every steamer that travels between New Orleans and Baton Rouge (Louisiana, USA) has been inhabited by this species. The pest entered the Mediterranean in the 19th century (Wetterer et al., 2009). At present, the Argentine ant settlements can be observed in Southern Europe, stretching hundreds of kilometers along the coastline (Stukalyuk, 2015), and the species continues to be actively dispersed. Data on the northernmost location of the species was obtained from Sandnes, Norway (Wetterer et al., 2009). Because the Argentine ant is difficult to identify

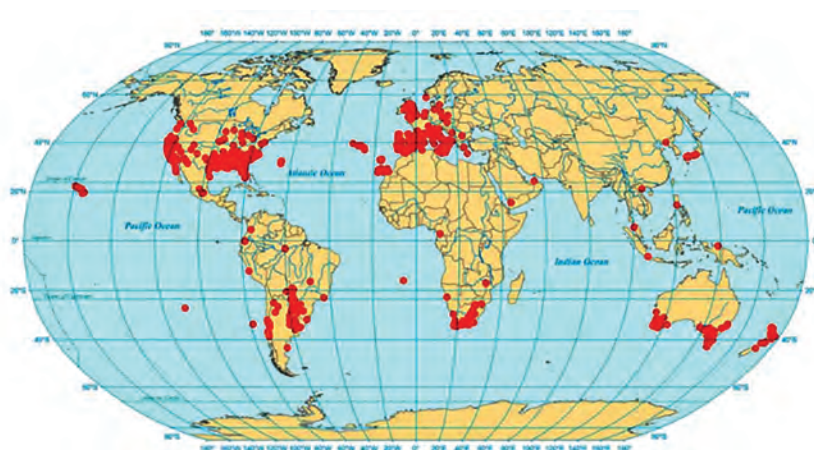


Fig. 1. The native range of *Linepithema humile* (Mayr) (by Wetterer et al., 2009)

Рис. 1. Ареал *Linepithema humile* (Mayr) (по Wetterer et al., 2009)

and relatively easy to confuse with close species, there are incorrect data about its reporting in some countries. Wild (2004, 2007) and Wetterer et al. (2009), based on a review of the collection material and primary sources, has considered this issue in detail and provided the most complete and reliable data on the distribution of *L. humile* (Fig. 1). Currently, *L. humile* is included in A1 quarantine lists of Turkey and Bahrain.

The species has already spread to the majority of lowland subtropical areas with Mediterranean climate. At the same time, some areas, such as an island in California, Japan and New Zealand, are still experiencing population increases, while others, on the contrary, are experiencing population declines. On Madeira Island, *L. humile* used to be a harmful pest, but it is now rare, except in the semi-arid eastern regions. There is still a lack of information on the occurrence of the species in the Eastern Mediterranean east of Crete, Southern China and Central Africa, in areas with a suitable Mediterranean climate (Wetterer et al., 2009). In the Russian Federation, the most suitable

climatic conditions for this species exist in the southern regions (primarily in the Krasnodar Territory and Crimea).

L. humile prefers various disturbed ecological communities, including agrocenoses and cities (Zakharov, 2015), settling houses, backyards, vegetable gardens, parking areas and even potted plants (Wild, 2007; AntWeb, 2019).

One Argentine ant family has less than 50 thousand animals, while another invasive species, *Pheidole megacephala* Fabricius, has a family of over 100 thousand (Zakharov, 2015). *L. humile* has the ability to form superfamily structures: there is a constant exchange of individuals between ant-hills, migration flows, thus leveling out nesting odors and reducing the mutual aggressiveness of individuals from different anthills of this species. Due to their ability to form family structures and the presence of several egg-laying mothers in the family, *L. humile* ants form large-scale settlements with high numbers and densities (Wild, 2007; Wetterer et al., 2009). They mainly form underground nests, making them difficult to control with insecticides.

Argentine ants are predators and scavengers, i.e. zoonecrophagous, according to the Dlussky classification (1981), with a tendency to care for insects from the Hemiptera grazing unit (Wild, 2007; Wetterer et al., 2009). These ants easily form new branched forage roads. As a result of active feeding of the large population of *L. humile* colonies, the number and diversity of indigenous fauna of arthropods and vertebrates decreases significantly, and the structure of the plant community even changes (Wetterer et al., 2009). Due to the strong and visible impact on various aspects of biodiversity, the emergence of *L. humile* in new areas, especially in agricultural areas, raises serious concerns.

Despite the reduced aggressiveness between individuals from different nests within one colony, Argentine ants are highly aggressive against other species and most often displace native species. However, the opposite is also known, particularly in the case of two serious introductions. In Bermuda, *Pheidole megacephala* appeared at the end of the 19th century and spread throughout the territory; then, in the middle of the 20th century, *L. humile* was brought here, which in turn began to settle rapidly; it was supposed to displace *P. megacephala* and take its place after a while, but by 1959, the advance of *L. humile* had slowed down, and now, in some areas, *P. megacephala* is conquering the territory back (Brian, 1986).

The Argentine ant is not the only type of ants that is known for its active settlement in the city. For example, one of the most common urban species in Moscow is *Lasius niger*. The species is actively settled in gardens, parks, flowerbeds and lawns, under tiles and along kerbs. Outside the city, it also forms large-scale settlements on open spaces, floodplains and meadows. Myrmecologist A.A. Zakharov (2015) identifies the following similar features of the biology of *L. humile* and some other “urbanist” species, including *Lasius niger*:

- can form new families in several ways – with the help of founding females or by budding – without the need for a phase of temporary social parasitism, in which the young female penetrates the nest of the host species, kills the female and takes her place, and the working ants feed her offspring, which

gradually completely replaces the host ants;

- high total fecundity of females, polygyny is possible;

- quite a high number of families;

- constant superfamily structures and one-time residence of one family in several different nests (polycalia). This makes it possible to have millions of total population levels in one local settlement;

- omnivores (polytrophs), have a developed system of mobilization and at least partially protected family territory;

- the species use group foraging and prey transportation; small species also use collective combat tactics, which increases their competitiveness in direct displacement of other ants from the area;

- master several nesting substrates.

Obviously, in order to assess the likelihood of a species being justified in new areas, in addition to environmental factors, consideration should be given to a combination of biological characteristics, in particular those that ensure the type of competitiveness, allow for widespread distribution and dominance of communities. *L. humile*, one of the most invasive and dangerous species of ants, is characterized by the features of the “urbanist” species listed above, combined with high migratory capacity, low aggressiveness between colonies, but with high interspecific aggressiveness, small specimen sizes (Fig. 2), rapid change of egg-laying females and complete sterility of working specimens. The Argentine ant has been widely spread with the help of humans (Zakharov, 2015) and continues to develop areas of disturbed ecological communities. If imported into Russia, this species is likely to be able to settle primarily in the southern regions, and it is difficult to predict whether indigenous ants will be able to resist it.

References

1. Brian M.V. Public insects: ecology and behavior. M., 1986. 400 p.
2. Dlussky G.M. Ants of the desert. M., 1981. 230 p.
3. Zakharov A.A. Ants of forest communities, their life and role in the forest. M., 2015. 404 p.
4. Stukaliuk S.V. *Crematogaster subdentata* Mayr, 1877 – a new potentially invasive species of ants for the Crimean fauna (Hymenoptera,



Fig. 2. The Argentine ant *Linepithema humile* (Mayr). From the collection of FGBU “VNIICR” (photo by Yu.A. Lovtsova)

Рис. 2. Аргентинский муравей *Linepithema humile* (Mayr). Из коллекции ФГБУ «ВНИИКР» (фото Ю.А. Ловцово́й)

Formicidae) // Zoological Journal, 2015. Vol. 94, No. 10. P. 1211-1225.

5. Wild A. Taxonomic revision of the ant genus *Linepithema* (Hymenoptera: Formicidae) // University of California Publications in Entomology, 2007. 126: 1-151.

6. Wild A. Taxonomy and distribution of the Argentine ant, *Linepithema humile* (Hymenoptera: Formicidae) // Annals of the Entomological Society of America, 2004. 97: 1204-1215.

7. Wetterer J.K., Wild A.L., Suarez A.V., Roura-Pascual N., Espadaler X. Worldwide spread of the Argentine ant, *Linepithema humile* (Hymenoptera: Formicidae) // Myrmecological News, 2009. 12: 187-194.

8. [Electronic resource]. Access mode: <https://gd.eppo.int/taxon/IRIDHU>.

9. [Electronic resource]. Global Invasive Species Database. Species profile: *Linepithema humile*. Access mode: <http://www.iucngisd.org/gisd/speciesname/Linepithema+humile> on 30-04-2019.

10. [Electronic resource]. Daugherty M. Argentine Ant (*Linepithema humile*). Center for Invasive Species Research, 2014. Access mode: https://cisr.ucr.edu/argentine_ant.html.

11. [Electronic resource]. AntWeb: Ants of California. Access mode: <http://www.antweb.org/california.jsp>.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ЦЕНТР
КАРАНТИНА РАСТЕНИЙ»
(ФГБУ «ВНИИКР»)



ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ РАСТЕНИЙ



ВИРУСОЛОГИЯ



БАКТЕРИОЛОГИЯ



МИКОЛОГИЯ

АНАЛИЗ ГМО



ЭНТОМОЛОГИЯ



140150, РОССИЯ, МО
РАМЕНСКИЙ Р-Н, Р.П. БЫКОВО
УЛ. ПОГРАНИЧНАЯ, Д. 32

85 лет*

ОПЫТ С 1934 ГОДА

WWW.VNIIKR.RU
E-MAIL: SALES@VNIIKR.RU
ТЕЛ.: +7 499 707 22 27 ДОБ. 1469



КЛЕЕВЫЕ
ЦВЕТНЫЕ
ЛОВУШКИ

ФЕРОМОННЫЕ ЛОВУШКИ

- для томатной моли (*Tuta absoluta*)
- для цветочного трипса (*Frankliniella occidentalis*)

БОЛЕЕ 50 НАИМЕНОВАНИЙ

