

КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

НАУКА И ПРАКТИКА

МАРТ 1 | 3 | 2013

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ ЖУРНАЛ

ВОСТОЧНАЯ ПЛОДОЖОРКА *GRAPHOLITHA MOLESTA* (BUSCK):
**78 ЛЕТ КАРАНТИННОМУ СТАТУСУ
ВРЕДИТЕЛЯ** стр. 6

**ПАСЛЕН КОЛЮЧИЙ.
СОРНЯК УГНЕТАЕТ ПОСЕВЫ ЛЮЦЕРНЫ,
БАХЧЕВЫХ И ПРОПАШНЫХ КУЛЬТУР** стр. 35

**БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ОЖОГ ПЛОДОВЫХ
КУЛЬТУР В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН:
ДОЛЯ ПОРАЖЕННЫХ ДЕРЕВЬЕВ В ЯБЛОНЕВЫХ САДАХ ДОХОДИЛА
ДО 50-60% И БОЛЕЕ** стр. 39

ORIENTAL FRUIT MOTH *GRAPHOLITHA MOLESTA* (BUSCK):
**THE QUARANTINE STATUS OF
THE PEST DATES BACK 78 YEARS** page 10

**THE BUFFALOBUR AFFECTS LUCERNE,
CUCURBITS AND TILLED CROPS** page 37

**BACTERIAL FIRE BLIGHT IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN:
THE PORTION OF INFESTED TREES EXCEEDED 50-60% IN APPLE GARDENS OF
CERTAIN FARMS** page 44

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL

PLANT HEALTH RESEARCH AND PRACTICE

MARCH 1 | 3 | 2013

«КАРАНТИН РАСТЕНИЙ. НАУКА И ПРАКТИКА»

ДВУЯЗЫЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ №1 (3) 2013 г.

Главный редактор:
У.Ш. Магомедов, кандидат
сельскохозяйственных наук,
директор ФГБУ «ВНИИКР»

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

Выпускающие редакторы:
Ольга Лесных
Юлия Трофимова
Юлиана Бададгулова
e-mail: karantin.r@yandex.ru

**Редакционная коллегия
журнала «Карантин растений.
Наука и практика»:**
Исаев А.А. – начальник
Управления фитосанитарного
надзора и качества зерна

Гниненко М.Ю. – заместитель
начальника Управления
фитосанитарного надзора
и качества зерна

Долженко В.И. – академик
РАСХН, академик-секретарь
отделения защиты
и биотехнологии растений
РАСХН

Надыкта В.Д. – академик
РАСХН, директор
Всероссийского НИИ
биологической защиты
растений

Павлюшин В.А. – академик
РАСХН, директор
Всероссийского НИИ
защиты растений

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

Издатель: ООО «Успех» (105122, г. Москва, Щелковское шоссе, д. 13, оф. 402)

Адрес редакции: 105122, г. Москва, Щелковское шоссе, д. 13, оф. 402

Типография: ЗАО «Группа-Море», г. Москва, Хохловский переулок, д. 7-9, тел. (495) 917-42-28

Тираж 999 экземпляров. Бесплатно.

Санин С.С. – академик РАСХН,
директор Всероссийского НИИ
фитопатологии

Рингольдс Арнитис –
Генеральный директор ЕОКЗР
(Франция)

Ханну Кукконен – директор
подразделения фитосанитарно-
го надзора, EVIRA (Финляндия)

Сагитов А.О. – Генеральный
директор ТОО «Казахский НИИ
защиты и карантин растений»

Сорока С.В. – 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»

Мазурин Е.С. – кандидат
биологических наук,
заместитель директора
ФГБУ «ВНИИКР»

Шероколава Н.А. –
заместитель директора
ФГБУ «ВНИИКР»

РЕДАКЦИЯ:
Волкова Е.М., заведующая
лабораторией сорных растений

Волков О.Г., начальник
научно-методического отдела

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

Приходько Ю.Н., кандидат
биологических наук,
начальник отдела диагностики

Скрипка О.В., заведующая
лабораторией микологии

Горшкова О.Н., начальник
отдела по международным
связям и вопросам ВТО
(переводчик)

Маткава Л.Р., специалист
отдела по международным
связям и вопросам ВТО
(переводчик)

Скупова Т.В., специалист
отдела по международным
связям и вопросам ВТО
(переводчик)

Шахманова З.Э., специалист
отдела по международным
связям и вопросам ВТО
(переводчик)

Дизайн и верстка:
Олеся Михайлина

Корректор:
Татьяна Артемьева

**Менеджер по подписке
и дистрибуции:**
Алексей Липатов
+7 (925) 357 20 61

СОДЕРЖАНИЕ CONTENT

I. НОВОСТИ I. NEWS

О Первом заседании Координационного совета
по карантину растений государств – участников СНГ

Start-up Meeting of the CIS Coordination Council
for Plant Quarantine

4 5

II. НАУЧНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ КАРАНТИНА РАСТЕНИЙ

II. RESEARCH STUDIES IN PLANT QUARANTINE

*Н.М. Атанов, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»
В.Н. Жимерикин, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»
Восточная плодовая Grapholitha molesta (Busck):
78 лет карантинному статусу вредителя*

*Nikolay M. Atanov, FGBU VNIKR's Leading Researcher
Vladimir N. Zhimerikin, FGBU VNIKR's Leading Researcher
Oriental fruit moth Grapholitha molesta (Busck):
The Quarantine Status of the Pest Dates Back 78 Years*

6 10

*Е.В. Каримова, младший научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»
И.П. Смирнова, профессор кафедры биохимии
Российского университета дружбы народов
Возбудитель бактериальной пятнистости
тыквенных культур Acidovorax citrulli*

*Elena V. Karimova, FGBU VNIKR's Junior Researcher
I.P. Smirnova, Professor, Department of Biochemistry,
Peoples' Friendship University of Russia
The Bacterial Fruit Blotch of Cucurbits –
Acidovorax citrulli*

14 19

*Б.Г. Ковалев, доктор химических наук
И.О. Камаев, Н.М. Атанов, Н.П. Кузина, М.В. Чирская, А.А. Кузин –
научные сотрудники отдела синтеза и применения феромонов
ФГБУ «ВНИИКР»
Феромонная коммуникация и синтетический феромон
четырёхпятнистой зерновки Callosobruchus maculatus*

*Boris. G. Kovaliov, Doctor of Chemistry
Ilya O. Kamaev, Nikolay M. Atanov, Nina P. Kuzina, Marina V. Chirskaya,
Anatoliy A. Kuzin, FGBU VNIKR's Researchers
Department for Pheromone Synthesis
Pheromone Communication and Synthetic Pheromone
of the Cowpea Beetle Callosobruchus maculatus*

23 29

*Е.М. Волкова, заведующая лабораторией ФГБУ «ВНИИКР»
Строение семян паслена колючего Solanum rostratum Dun.
и близких ему видов секции Androcera (Nutt.) Marzell*

*Elena M. Volkova, Head of FGBU VNIKR's Laboratory
Seed Structure of Buffalobur Solanum rostratum Dun.
and its Related Species in Section Androcera (Nutt.) Marzell*

35 37

*Н.В. Дренова, заведующая лабораторией бактериологии
ФГБУ «ВНИИКР»
М.М. Исин, А.А. Джаймурзина, Г.А. Жармухамедова – специалисты
ТОО «Казахский НИИ защиты и карантин растений»
А.К. Айткулов, директор ГУ «Республиканская
карантинная лаборатория» (РК)
Бактериальный ожог плодовых культур в Республике Казахстан*

*Natalia V. Drenova, Head of FGBU VNIKR's Bacteriological Laboratory
M.M. Isin, A.A. Dzhamurzina, G.A. Zharmukhamedova, experts,
Kazakh Research Institute for Plant Protection and Quarantine
A.K. Aitkulov, Director, Republican Quarantine Laboratory,
Republic of Kazakhstan
Bacterial Fire Blight in the Republic
of Kazakhstan*

39 44

*И.Н. Александров, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»
М.Б. Копина, начальник отдела ФГБУ «ВНИИКР»
И.П. Дудченко, старший научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»
Фитофторозные гнили корней земляники*

*Igor N. Aleksandrov, FGBU VNIKR's Leading Researcher
Maria B. Kopina, Head of FGBU VNIKR's Department
Irina P. Dudchenko, FGBU VNIKR's Senior Researcher
Phytophthora Root Rots of Strawberry*

49 56

О ПЕРВОМ ЗАСЕДАНИИ КООРДИНАЦИОННОГО СОВЕТА ПО КАРАНТИНУ РАСТЕНИЙ ГОСУДАРСТВ – УЧАСТНИКОВ СНГ

На базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР») под эгидой Исполнительного комитета Содружества Независимых Государств 7 декабря 2012 года состоялось Первое заседание Координационного совета по карантину растений государств – участников СНГ.

В заседании Совета приняли участие представители республик: Армения, Беларусь, Молдова, Таджикистан и Украины; от Российской Федерации – А.И. Саурин, заместитель Руководителя Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору, и А.А. Исаев, начальник Управления фитосанитарного надзора и качества зерна Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору; а также представители Исполкома СНГ и руководитель Секретариата Совета – директор ФГБУ «ВНИИКР» У.Ш. Магомедов. В качестве наблюдателей присутствовали представители Евразийской экономической комиссии. Вел заседание А.М. Кули-заде, заместитель Директора Департамента экономического сотрудничества Исполкома СНГ.

Соглашение о создании Координационного совета подписали 30 мая 2012 года в Ашхабаде правительства республик Армения, Беларусь, Казахстан, Кыргызстан, Мол-

дова, Таджикистан, Украина и Российской Федерации.

Целью создания Координационного совета является координация совместной деятельности органов и организаций государств – участников Соглашения, осуществляющих функции по предотвращению заноса и распространения на их территориях карантинных вредных организмов; обмен законодательной, методической, нормативной документацией в области карантина растений, информацией о фитосанитарном состоянии территорий, обмен опытом работы, разработка совместных мер по совершенствованию контроля подкарантинной продукции и ликвидации очагов карантинных объектов и т.д.

В соответствии с Положением о Координационном совете по карантину растений государств – участников СНГ Председателем Совета был избран А.Г. Никоян, начальник Фитосанитарной инспекции государственной службы безопасности пищевых продуктов Министерства сельского хозяйства Республики Армения, а А.И. Мелешко, заместитель Директора Департамента ветеринарного и продовольственного надзора Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, стала сопредседателем.

На заседании был рассмотрен проект Положения о Секретариате Коор-

динационного совета, члены Совета решили принять его за основу и до 1 марта 2013 года направить в Секретариат Совета свои замечания и предложения с целью внесения соответствующих правок и последующего утверждения Координационным советом Положения о Секретариате в установленном порядке.

Кроме того, по результатам обсуждения фитосанитарного состояния территорий стран СНГ и проводимой службами карантина растений работы по предотвращению заноса и распространения карантинных вредных организмов члены Совета выразили обеспокоенность перемещением подкарантинной продукции в багаже и ручной клади пассажиров без сопровождения соответствующей фитосанитарной документации. В срок до 1 апреля 2013 года члены Координационного совета должны направить в Секретариат Совета предложения по принятию положений, регулирующих перемещение продукции в ручной клади, а Секретариату Совета было дано поручение обобщить полученные предложения, подготовить проект Решения по данному вопросу и внести его на рассмотрение Координационного совета по карантину растений государств – участников СНГ.

Очередное заседание Координационного совета состоится в марте 2014 года в Республике Армения.



During the meeting

START-UP MEETING OF THE CIS COORDINATION COUNCIL FOR PLANT QUARANTINE

On December 7, 2012, the CIS Executive Committee organized the start-up meeting of the CIS Coordination Council for Plant Quarantine that was held at the All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU VNIICR). The meeting was attended by the participants from Armenia, Belarus, Moldova, Tajikistan, and Ukraine as well as the representatives of the CIS Executive Committee and the Chief of the Council Secretariat, Ulluby Sh. Magomedov. The Russian Federation was represented by Aleksei I. Saurin, Deputy Head of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhoz nadzor), and Alexander A. Isaev, Head of the Rosselkhoz nadzor's Department for Phytosanitary Surveillance and Grain Quality. Deputy Director of the CIS Executive Committee's Department for Economic Cooperation, Alladin M. Kuli-Zade presided at the meeting.

The Agreement establishing the CIS Coordination Council for Plant Quarantine was signed among Armenia, Belarus, Kazakhstan, Kyrgyzstan,

Moldova, Tadjhikistan, Ukraine, and Russia in Ashkhabad on May 30, 2012 with a view to coordinate joint activities of the official bodies responsible for prevention of entry and spread of quarantine pests in the member-states, to exchange relevant regulatory documents and guidelines as well as information on the phytosanitary condition of the member-states, and to cooperate in developing and improving measures associated with regulated articles and pest outbreak eradication, etc.

Arthur G. Nikoyan, Head of the Phytosanitary Service of the Republic of Armenia, was elected Chairperson of the CIS Coordination Council for Plant Quarantine according to the provisions of the CIS Coordination Council Statute, and Ms. Anna I. Meleshko, Deputy Director of the Department for Veterinary and Food Surveillance of Belarus, was elected Co-chairperson.

The Council members reviewed the draft Statute and approved it as the basic document for further activities. The members were asked to prepare

and submit their comments on the draft Statute to the Council Secretariat by March 1, 2013 for further improvement and adoption.

In the course of the follow-up discussion on the phytosanitary conditions in the CIS countries and work performed by state quarantine services to prevent introduction and spread of quarantine pests, the Council members raised their concern regarding the movement of regulated articles in baggage and hand luggage unaccompanied by required phytosanitary papers. It was concluded that the Council members should prepare their proposals concerning regulation of plant products moved in hand baggage and make these proposals available to the Council Secretariat by April 1, 2013. The Secretariat was tasked with summarizing the proposals and presenting the summary to the CIS Coordination Council.

The next CIS Coordination Council meeting will be held in the first quarter of 2014 in Armenia.

Во время заседания



Восточная плодожорка *Grapholitha molesta* (Busck): 78 ЛЕТ КАРАНТИННОМУ СТАТУСУ ВРЕДИТЕЛЯ

Н.М. Атанов, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»
В.Н. Жимеркин, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»

Восточная плодожорка (ВП – *Grapholitha molesta* Busck (Insecta: Lepidoptera: Tortricidae: Grapholitha), синонимы: *Laspeyresia molesta* (Busck), *Cidia molesta* (Busck) – карантинный вредитель, получивший этот статус по «Перечню объектов внешнего карантина СССР», утвержденному Народным комиссариатом земледелия в 1935 году.

Информация об этом опасном вредителе скрупулезно собиралась и анализировалась карантинной службой еще в 1931 г., отслеживались очаги, прогнозировалась фитосанитарная ситуация по этому виду в сопредельных странах.

В странах естественного ареала восточной плодожорки и в новых районах обоснования с благоприятными для этого вида климатическими условиями вредитель развивается в 5-6 поколениях за вегетационный период, нанося при этом огромный ущерб плодоводству.

Повреждаемыми культурами восточной плодожорки в различных регионах, где этот вид акклиматизировался, являются: персик (побеги и плоды), абрикос (побеги и плоды), нектарин (побеги и плоды), слива, алыча, мирабель, (побеги и плоды), вишня (побеги), черешня (побеги) миндаль (побеги), айва (побеги и плоды), груша (побеги и плоды), яблоня (побеги и плоды), мушмула (побеги и плоды), лавровишня (побеги).

Родиной восточной плодожорки является Восточная Азия: Китай, Корея, Япония, откуда она распространялась на другие континенты. В Японии восточная плодожорка с 1901-1902 гг. отнесена к чрезвычайно вредоносным вредителям плодовых культур. На острове Хонсю в садах префектур Окаяма и Амагасаки

плодожорка развивается в 5 генерациях. Опасным, экономически значимым инвазионным видом восточная плодожорка является в плодородных районах Австралии, где она была обнаружена в 1909 г. По наиболее вероятной версии, вредитель попал на этот континент с плодами и посадочным материалом, завезенными мигрантами из Китая, Кореи и Японии.

В США восточная плодожорка была выявлена и идентифицирована в 1913 году – сразу же после ввоза крупных партий посадочного материала из Японии. На Европейском континенте этот вид впервые был зарегистрирован в 1928 году в Италии, а затем в 1946 году во Фран-

В Корею и Китае, где этот вредитель известен с незапамятных времен и развивается в 3-4 поколениях, повреждается 50-60% плодов персиков, груш, яблочек, хотя первые энтомологические статьи о восточной плодожорке появились в 1915-1914 гг.

ции. В 1957 году гусеницы восточной плодожорки выявлялась карантинной службой Англии в плодах, завезенных из Греции и Болгарии. Официально вредитель был идентифицирован в этих странах, а также в Турции, Румынии, Германии (Верхний Рейн) в 1962-1963 годах [7].

На территории Российской Федерации восточная плодожорка впервые обнаружена энтомологом Центральной карантинной лаборатории Н.Н. Шутовой в 1964 г. в Краснодарском крае в районе г. Сочи. В последующие 3 года вредитель был выявлен в Молдавии, на Украине, в Грузии, Азербайджане, Армении.

Дальнейшее расширение ареала восточной плодожорки происходило в юго-восточном направлении. В Среднеазиатском регионе плодоводства восточная плодожорка зарегистрирована: в 1983 г. – в Республике Узбекистан [1], в 1985 г. – в Республике Казахстан, в 1986 г. – в Республике Киргизия. В настоящее время этот вид распространен в 47 странах мира в регионах выращивания косточковых и семечковых плодовых культур.

Плоды и посадочный материал являются той передаточной средой, которая способствовала распространению восточной плодожорки. Однако в широкомасштабном распространении карантинно-

го вредителя в сопредельные страны в период 1964-1986 гг. главную роль сыграло отсутствие прогностической оценки заноса с так называемой «возвратной тарой».

Освобождаемая в торговой сети от ввезенных импортных плодов тара, заселенная гусеницами восточной плодожорки, отправлялась эшелонами в зоны плодоводства для повторного использования. Контроль за обеззараживанием этой тары и условиями ее дальнейшего использования практически отсутствовал.

При расследовании в 1983 году факта выявления восточной плодожорки в садах Ферганской долины Республики Узбекистан одним



Рис. 1. Побеги персика, поврежденные восточной плодожоркой (<http://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=1234036>)

из авторов статьи были обнаружены склады сотен тысяч деревянных ящиков, завезенных из региона Западной Сибири. Они были предназначены для повторного использования после освобождения от импортируемых плодов (яблоки, груши, сливы, персики) из Венгрии, Болгарии, Югославии, Молдавии, Крымской и других областей Украины, где этот вредитель уже акклиматизировался и наносил существенный ущерб плодоводству [2].

Следует отметить, что этот карантинный вид имеет ряд отличительных биологических особенностей, которые необходимо принимать во внимание при оценке вероятности акклиматизации и степени фитосанитарного риска.

Гусеницы восточной плодожорки питаются побегами и плодами. При этом развитие гусениц первой гене-

рации происходит на побегах персика (рис. 1, 2), черешни, абрикоса, сливы, вишни, миндаля и они не способны к диапаузе.

Генеративные органы (плоды) повреждаются позднее, в период начала их созревания. При этом активизируется миграция бабочек в поисках кормовых растений и половых партнеров. При выборе кормового растения самки предпочитают в поисковой зоне косточковые породы, а из семечковых айву [1, 3].

Резкое увеличение численности популяции вредителя начина-

ет с диапаузирующих гусениц. Оптимальная перезимовка их происходит при среднесуточной температуре самого холодного месяца до -12°C . В случае понижения температуры до -25 (-27) $^{\circ}\text{C}$ в течение 3-7 суток наблюдается близкая к 100% гибель зимующих гусениц [4, 5].

По исследованиям биологов США, акклиматизация восточной плодожорки и степень ее вредоносности в Северной Америке находится в зависимости от присутствия в агроценозе излюбленных кормовых растений, таких как персик

Для развития вредителя необходим обязательный период холодной диапаузы в течение 20-25 суток при максимальных среднесуточных температурах $3-5^{\circ}\text{C}$.

со второй генерации после питания гусениц (рис. 3) плодами. Появляются диапаузирующие особи. При этом с каждой последующей генерацией увеличивается процент ди-

и нектарин. В зоне севернее 43° с.ш. при наличии промышленных садов с монокультурой семечковых и в первую очередь яблони вредитель не встречается [8].



Рис. 2. Побег яблони, поврежденные восточной плодовой гусеницей

Существенным фактором, не позволяющим восточной плодовой гусенице адаптироваться севернее 43° с.ш., следует считать также длительный холодный период с температурами ниже -12 °С и влиянием длительных похолоданий в весенние месяцы вегетативного периода.

По нашим исследованиям, проведенным в различных географических точках в 80-90 годы и исходя из анализа научной информации, наиболее оптимальными для акклиматизации и вредоносности восточ-

ного материала или расселяется из находящихся вблизи мест хранения и реализации плодов. Не исключен занос вредителя с тарой, которая используется при хранении собранного урожая, транспортирования плодов к местам торговли.

В последние годы на территории стран Таможенного союза наблюдается расширение очагов восточной плодовой гусеницы. Этому способствуют глобальное потепление, интенсивный ввоз растительной продукции из стран и регионов распростране-

плодоводства восточной плодовой гусеницы можно отнести:

Республику Дагестан, Республику Адыгея, Республику Северная Осетия – Алания, Республику Кабардино-Балкария, Республику Калмыкия, Карачаево-Черкесскую республику, Ростовскую и Астраханскую области, Краснодарский и Ставропольские края;

В Республике Казахстан – Актюбинскую, Алма-Атинскую, Жамбылскую (Джамбульскую), Кызылординскую (Кзыл-Ординскую) и Южно-Казахстанскую области;

В Республике Беларусь восточная плодовая гусеница отсутствует, но может адаптироваться на юге страны, особенно в садах, где произрастает абрикос, в южной части Гомельской области, а также в Брестской и Гродненской областях.

В настоящее время по-прежнему сохраняется высокий риск проникновения восточной плодовой гусеницы с плодами. Пограничная карантинная служба РФ постоянно обнаруживает вредителя в грузах абрикосов, персика и в багаже граждан.

В конце июня 2012 г. в персиках из Греции, поступивших в Брянскую и Смоленскую области, была обнаружена ВП, в конце июля этого года в речном порту Хабаровска вреди-



Рис. 3. Гусеница *G. molesta* (http://www.biokontroll.hu/cms/index.php?option=com_content&view=article&id=41%3Abioalmasokvedelme&catid=112%3Abionovenyektermesztese&Itemid=43&lang=hu)

тель обнаружен в абрикосе из Китая. В персике из Казахстана ВП обнаружена в Новосибирской и Тюменской областях. В конце июня свыше 20 тонн абрикосов прибыло из Китая в Приморье. Часть этой продукции заражена восточной плодовой гусеницей.

Сезонные очаги восточной плодовой гусеницы, выявленные с помощью феромонных ловушек, отмечаются в Калининграде, Республике Беларусь, пограничных районах Дальнего Востока, в окрестностях Москвы и других центрах массового завоза плодов косточковых культур [6].

Современные методы борьбы с карантинными вредными организмами направлены на ликвидацию и локализацию возникших очагов, а в зонах их широкого распространения – на снижение численности до уровня экономического порога вредоносности.

Снижение численности восточной плодовой гусеницы достигается применением интегрированной системы защиты растений с использованием феромонов для массового отлова и дезориентации самцов, обеспечивающей минимальное отри-

цательное воздействие на окружающую среду.

В последнее время ведутся исследования по выявлению эффективных паразитоидов восточной плодовой гусеницы в центре ее происхождения и технологии их (паразитоидов) производства [9]. Также ведутся исследования по поиску селективных инсектицидов, изучению резистентности вида к препаратам, используемым в борьбе с вредителем, и по управлению его численностью [10].

Аннотация

Рассматривается вредитель плодов восточная плодовая гусеница, являющийся карантинным насекомым для стран Таможенного союза. Оценивается ее значение для этих стран, потенциальный ареал и перспективные направления в борьбе с вредителем.

Литература

- Атанов Н.М. Оптимизация борьбы с восточной плодовой гусеницей. Ж. Защита растений. 1993, № 11. С. 32-33.
- Атанов Н.М., Гуммель Э.Р. Восточная плодовая гусеница в Узбекистане. Ж. Защита растений, 1985, № 7. С. 40-41.
- Атанов Н.М., Гуммель Э.Р., Жимеркин В.Н. Миграционная активность восточной плодовой гусеницы. Ж. Защита и карантин растений. 1991, № 12. С. 35.

4. Власова А.А., Хардилов Ф.Ф. Агроклиматическое обоснование возможного ареала и зон вредоносности на территории СССР. В Сб. науч. трудов «Восточная плодовая гусеница», 1980. С. 44-54.

5. Козичева Э.Ф. К методике определения возможного ареала восточной плодовой гусеницы в СССР. В Сб. науч. трудов «Восточная плодовая гусеница», М., 1980. С. 25-43.

6. Овсянникова Е.И., Гричанов И.Я. *Grapholitha molesta* Busck – восточная плодовая гусеница. Агроэкологический атлас России и сопредельных стран. 2012. http://www.greenport.ru/vostochnay_ploдозhorka.html.

7. Шутова Н.Н. Восточная плодовая гусеница в СССР. В Сб. науч. трудов «Восточная плодовая гусеница», М., 1980. С. 1-23.

8. Dustan G. (1967) Range of the oriental fruit moth, *Grapholitha molesta* in apple and peaches in Ontario. The Canadian Entomologist. v. 99, N 6, p. 587-590.

9. Jones M.M. (2010) Susceptibility of oriental fruit moth *Grapholitha molesta* Busck to selected insecticides and mixtures. University Illinois. 124 p.

10. Zhou W. et al. (2006) Control of parasitoid *Pyemotes* sp. against oriental fruit moth *Grapholitha molesta* Busck. Yangtze University. v. 49.

http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAX-AHNY201103050.htm.

Oriental fruit moth *Grapholitha molesta* (Busck): THE QUARANTINE STATUS OF THE PEST DATES BACK 78 YEARS

Nikolay M. Atanov, FGBU VNIKR's Leading Researcher
Vladimir N. Zhimerikin, FGBU VNIKR's Leading Researcher

The Oriental fruit moth (OFM – *Grapholitha molesta* Busck (Insecta: Lepidoptera: Tortricidae: Grapholita), syn.: *Laspeyresia molesta* (Busck), *Cidia molesta* (Busck) is a quarantine pest which got this status in accordance with the “USSR List of Foreign Quarantine Objects” approved by the People’s Commissariat for Agriculture in 1935.

Information on this dangerous pest has been thoroughly gathered and analyzed by the Quarantine Service since 1931, the pest foci have been monitored and phytosanitary situation in relation to this pest in the bordering countries has been forecast.

In countries native for the Oriental fruit moth and in new areas of its establishment with climatic conditions favorable for the species, the pest develops 5-6 generations during the growing season causing serious damage to fruit growing industry.

Crops damaged by the OFM in different regions of its establishment include peach (shoots and fruits), apricot (shoots and fruits), nectarine (shoots and fruits), plum, cherry plum, mirabelle (shoots and fruits), cherry (shoots), sweet cherry (shoots), almond (shoots), quince (shoots and fruits), pear (shoots and fruits), apple (shoots and fruits), medlar (shoots and fruits) and cherry laurel (shoots).

The Oriental fruit moth originated in Eastern Asia – China, Korea, Japan and spread to other continents from these countries. In Japan, the Oriental fruit moth is considered to be an extremely hazardous pest of fruit crops since 1901-1902. In the orchards of Okayama and Amagasaki Prefectures

of Honshu Island, the Oriental fruit moth develops 5 generations. In Korea and China, the pest has been known for ages. However, first articles about it appeared in 1915-1914.

The Oriental fruit moth is regarded as a dangerous economically significant invasive species for the fruit growing regions of Australia where it was recorded for the first time in 1909. Most probably, the pest has been introduced

It develops 3-4 generations damaging 50-60% of peach, pear and apple fruits.

to the continent with fruits and plants for planting imported by migrants from China, Korea or Japan.

In the USA, the OFM was detected and identified in 1913, just after the import of large consignments of plants for planting from Japan. In Europe, the species was recorded for the first time in Italy in 1928, and then in France in 1946. The Oriental fruit moth larvae were detected by the Quarantine Service of Great Britain in fruits imported from Greece and Bulgaria in 1957. The pest was officially identified in these countries, as well as in Turkey, Romania, and Germany (Upper Rhine) in 1962-1963 [7].

In Russia, the Oriental fruit moth was for the first time detected by N.N. Shutova, an entomologist of the Central Quarantine Laboratory, in Sochi area of Krasnodar Krai in 1964. Over the next three years, the pest was recorded in Moldova, Ukraine, Georgia, Azerbaijan, and Armenia.

Further expansion of the Oriental fruit moth habitat occurred in the south-eastern direction. In the Central Asian fruit growing region, the Oriental fruit moth was recorded in the Republic of Uzbekistan in 1983 [1], in 1985 – in the Republic of Kazakhstan, in 1986 – in the Kyrgyz Republic. At present, the species occurs in 47 countries in production areas of stone and pome fruit crops.

The Oriental fruit moth is mainly spread with fruits and plants for planting. But, the most important reason of the wide spread of the pest into the bordering countries during 1964-1986 was the insufficient predictive valuation of the pest’s introduction with the so called returnable tare.

Free tare contaminated by OFM larvae which had already been used in trade channels for fruit imports was transported back to the fruit growing regions to be re-used. There was practically no control of tare disinfection and its further use.

Investigating the case of the Oriental fruit moth detection in the orchards of the Fergana Valley in the Republic of Uzbekistan in 1983, one of the authors of the article found storehouses with hundreds of thousands of wooden boxes brought from Western Siberian regions. They were intended for re-use after the discharge of fruits (apples, pears, plums, peaches) imported from Hungary,



Fig. 1. Apricot shoots damaged by the Oriental fruit moth (<http://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=1234036>)

Bulgaria, Yugoslavia, Moldova, Crimea and other regions of Ukraine where the pest had already established and caused significant damage to the fruit growing industry [2].

It is important to note that this quarantine species is characterized by a number of distinctive biological features which are to be taken into account when its potential to establish and the phytosanitary risk level are assessed.

OFM larvae feed on shoots and fruits. At the same time, development of the first generation larvae occurs on shoots of peach (Fig. 1, 2), sweet cherry, apricot, plum, cherry, almond and larvae are not able to go into diapause.

Generative organs (fruit) are damaged later as ripening begins. At the same time, more active migration of moths takes place in search of host plants and mates. Females in search of host plants

prefer stone fruits and quince of pome fruits in the search zone [1, 3].

Sharp increase in the pest population occurs from the second generation after larval feeding (fig. 3) on fruit. Diapausing individuals emerge. At the same time, the percentage of diapausing larvae increases with each subsequent generation. The

Development of the pest requires the obligatory period of 20-25-day diapause induced by low average daily temperatures of 3-5 °C.

optimum average daily temperature of the coldest month for their overwintering should not be lower than -12 °C. The drop of temperature to -25 (-27)°C results in almost 100 % mortality of overwintering larvae in 3-7 days [4, 5].

Research conducted by US biologists showed that establishment of the Oriental fruit moth and level of its impact in North America depended on the presence of preferred host plants in agrocoenosis – such as peach and nectarine. The pest does not occur in

commercial orchards with pome fruit monoculture, predominantly apples, to the north of 43° NL [8].

A long cold period with temperatures below -12 °C and long cold spells during spring months of the growing season shall be considered essential factors making it impossible for the Oriental

fruit moth to establish to the north of 43° NL.

According to our investigations conducted during 1960-1990 in different geographic zones and based on the analysis of scientific information, regions located between 33-43° NL will be the most suitable for establishment and impact of the Oriental fruit moth. Agrocoenoses of this zone usually include pome species – peach, nectarine, apricot, sweet cherry, cherry, and plum. Development and accumulation of the



Fig. 2. Apple tree shoots damaged by the Oriental fruit moth

pest after winter diapause occurs on the shoots of plants.

Fruit crop plantings in the private sector and small-sized farm orchards

Males in search of females exhibit active flight for a distance of 250 m. Intensive independent flight of females in search of host plants takes place for a distance of 60-100 m.

with different crops are most suitable for the development of the pest in this zone. Primary foci mostly occur in these orchards. The Oriental fruit moth is introduced into the orchards with plants for planting or spreads from places of fruit storage and marketing located in the vicinity. The possibility of the pest introduction with packaging material used during yield storage, transportation of fruits to marketing places should not be excluded.

In recent years, the expansion of the Oriental fruit moth foci has been recorded on the territory of the Customs Union. Global warming, intensive import of plant products from the countries and regions of the pest occurrence, population migration flows are the factors favouring it.

In connection with the aforesaid, it is possible to forecast intensive expansion of the distribution area and increase of the Oriental fruit moth harmfulness in the

climatic zone suitable for peach, apricot, sweet cherry and quince production. The pest may develop 4-6 generations here and a steady progress of the pest population growth may be observed.

In the Russian Federation, the following zones of high phytosanitary risk and economic importance for fruit growing industry are endangered by the Oriental fruit moth – the Republic of Dagestan, the Republic of Adygeya, the Republic of North Ossetia – Alania, the Republic of Kabardino – Balkariya, the Republic of Kalmykiya, the Karachayevo – Cherkessian Republic, Rostov and Astrakhan regions, Krasnodar and Stavropol Krai.

In the Republic of Kazakhstan, Aktubinsk, Alma-Ata, Jambyl (Dzhambul), Kyzylordina and Southern-

Kazakhstan regions are exposed to the phytosanitary risk.

In the Republic of Belarus, the Oriental fruit moth is absent. However, its establishment is possible in the southern part of the country, predominantly in apricot growing orchards in the southern part of Gomel region, and in Brest and Grodno regions, as well.

Today, the high risk of the Oriental fruit moth introduction with fruits still exists. The Border Quarantine Service of the Russian Federation constantly detects the pest in consignments of apricots and peaches, and in passengers' luggage.

In late June, 2012, the OFM was detected in peaches from Greece imported into Bryansk and Smolensk regions, at the end of July of the same year the pest was detected in apricots from China in the Khabarovsk river port. OFM in peaches from Kazakhstan was detected in Novosibirsk and Tyumen regions. Over 20 tons of apricots were imported into Primorye from China at the end of June. Part of the produce was infested with the Oriental fruit moth.

Seasonal foci of the Oriental fruit moth detected with pheromone traps



Fig. 3. A *G. molesta* larva (http://www.biokontroll.hu/cms/index.php?option=com_content&view=article&id=41%3Abioalmasokvedelme&catid=112%3Abionovenyektermesztese&Itemid=43&lang=hu)

are recorded in Kaliningrad region, the Republic of Belarus, border regions of the Far East, Moscow region and other centers of stone crop fruit mass importation [6].

Up-to-date methods of quarantine pest control are applied for eradication and containment of outbreaks and in zones where the pest is widely distributed in order to reduce the population level to the economic threshold of harmfulness.

Reduction of the Oriental fruit moth population is achieved by the integrated system of plant protection and use of pheromones for mass trapping and mating disruption of males ensuring the minimum negative effect on the environment.

Research has been carried out on effective parasitoids for biological control of the Oriental fruit moth in the center of its origin, as well as on the technology of their (parasitoids) production [9]. Besides, the research

work is conducted in the sphere of selective insecticides, and studies are performed on the species resistance to the preparations used to control the pest, as well as on the pest population management [10].

Abstract

This paper deals with the Oriental Fruit Moth (Grapholitha molesta) which is a quarantine pest for the Customs Union countries. It includes the evaluation of the pest significance, its potential habitat and promising approaches for the pest control.

References

1. Atanov N.M. Optimizing the Oriental fruit moth control. Plant Protection Protection Journal, 1993, No.11. pp. 32-33.
2. Atanov N.M., Gummel E.R. Oriental fruit moth in Uzbekistan. Plant Protection Journal, 1985, No. 7. pp. 40-41.
3. Atanov N.M., Gummel E.R., Zhimerikin V.N. Migratory behaviour of the Oriental fruit moth. Plant Protection Journal, 1991, No. 12. p. 35.
4. Vlasova A.A., Khardikov F.F. Agroclimatic justification of the potential habitats and zones of harmfulness on the territory of the USSR. Collection of the

Scientific Papers «Oriental fruit moth», M., 1980. pp. 44-54.

5. Kozicheva E.F. About the methods of identification of the Oriental fruit moth potential habitats in the USSR. Collection of the Scientific Papers «Oriental fruit moth», M., 1980. pp. 25-43.

6. Ovsyannikova E.I., Grichanov I.Ya. Grapholitha molesta Busck – Oriental fruit moth. Agro-ecological atlas of Russia and bordering countries. 2012. http://www.greenport.ru/vostochnay_plodozhorka.html.

7. Shutova N.N. Oriental fruit moth in the USSR. Collection of the Scientific Papers «Oriental fruit moth», M., 1980. pp. 1-23.

8. Dustan G. (1967) Range of the oriental fruit moth, Grapholitha molesta in apples and peaches in Ontario. The Canadian Entomologist. v. 99, N 6, p. 587-590.

9. Jones M.M. (2010) Susceptibility of oriental fruit moth Grapholitha molesta Busck to selected insecticides and mixtures. University Illinois. 124 p.

10. Zhou W. et al. (2006) Control of parasitoid Pyemotes sp. against Oriental fruit moth Grapholitha molesta Busck. Yangtze University. v. 49. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAX-AHNY201103050.htm.

ВОЗБУДИТЕЛЬ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПЯТНИСТОСТИ ТЫКВЕННЫХ КУЛЬТУР

Acidovorax citrulli

Е.В. Каримова, младший научный сотрудник научно-методического отдела ФГБУ «ВНИИКР»
И.П. Смирнова, профессор кафедры биохимии Российского университета дружбы народов

В последние годы фитосанитарные службы разных стран обеспокоены появлением и быстрым распространением опасного заболевания – бактериальной пятнистости тыквенных культур, вызываемого бактерией *Acidovorax citrulli*. Карантинный статус данного возбудителя для Российской Федерации на данный момент еще не определен.

Возбудитель бактериальной пятнистости тыквенных культур представляет интерес в связи с опасностью его завоза с семенным материалом, большими потерями урожая в странах его распространения и широким кругом поражаемых культур, возделываемых на территории нашей страны.

Впервые о бактериальной пятнистости тыквенных культур сообщалось еще в 1960-е гг. В 1965 году Webb R.E. и Goth R.W. описали возбудителя, выделенного из рассады арбузов, семена которых были импортированы из Турции [13]. Позднее, в 1978 году в США Schaad N.W. и др. выделили из зараженных растений арбуза чистую культуру бактерии, которая была патогенна в отношении арбузов, дынь, огурцов и тыкв, и классифицировал ее как *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* [10]. В 1992 году Willems A. и др., основываясь на данных, полученных в результате изучения биохимических, молекулярных и генетических особенностей культуры бактерий, предложили перекласси-

фицировать ее как *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [14]. В 2008 году Schaad N.W. и др. на основании генетических и фенотипических исследований предложили изменить ее таксономическое положение, возведя в ранг вида [11]. Новое название бактерии – *Acidovorax citrulli* – было опубликовано в Международном журнале систематической и эволюционной микробиологии (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) в 2009 году [12].

Возбудитель бактериальной пятнистости тыквенных культур относится к типу Proteobacteria, классу Betaproteobacteria, порядку Burkholderiales, семейству Comanomonadaceae, роду *Acidovorax*, виду *Acidovorax citrulli*.

Род *Acidovorax* состоит из двенадцати идентифицированных видов, которые могут быть разделены на две группы в зависимости от происхождения и места обитания. *Acidovorax citrulli* принадлежит к группе растительных патогенов, куда также относятся *A. cattleya*, *A. avenae*, *A. oryzae*, *A. anthurii*, *A. valerianellae*, *A. konjacii*. Другая группа включает следующие виды: *A. defluvii*, *A. facilis*, *A. delafieldii*, *A. temperans*, *A. caeni*, которые были обнаружены в образцах почвы и воды [3].

Также было обнаружено, что изоляты *A. citrulli* имеют внутривидовую изменчивость. В 1978 г. Schaad N.W. и др. выделили чистую культу-

ру данной бактерии из рассады растений семейства Cucurbitaceae, которая не вызывает симптомов поражения на арбузах и реакцию сверхчувствительности на табаке, однако известно, что возбудитель бактериальной пятнистости тыквенных культур, выделенный из саженцев или плодов арбуза, вызывает реакцию сверхчувствительности на табаке. Последующие исследования, основанные на выявлении характерных особенностей структуры ДНК и анализе жирных кислот, подтвердили предположение о том, что данные бактерии схожи, но не идентичны. С помощью анализа жирных кислот, PFGE, гер-PCR, биохимического анализа и тестов на патогенность были определены две генетически различные группы бактерий. Первая группа (I) включает бактерии, выделенные из рассады и плодов тыквенных культур (кроме арбузов); ко второй группе (II) относятся бактерии, выделенные главным образом из арбузов. При этом считается, что бактерии первой группы более вирулентны, чем бактерии второй группы.

Бактериальная пятнистость тыквенных культур зарегистрирована в странах Северной и Южной Америки (США, Бразилия, Коста-Рика, Никарагуа), Азии (Китай, Индонезия, Иран, Израиль, Малайзия, Тайвань, Таиланд, Япония), Океании (Австралия, Гуам, Северные Марианские острова). В 1995 году



Fig. 1. Colonies of *Acidovorax citrulli* on King B culture medium

Acidovorax citrulli появился в отдельных странах региона ЕОКЗР (Венгрия, Турция, Греция, Италия). В настоящее время имеется информация о том, что в Израиле, Италии и Никарагуа возбудитель был ликвидирован [6].

Данный возбудитель приводит к значительным потерям урожая

и, соответственно, экономическим потерям при возделывании растений семейства Cucurbitaceae.

В последние годы о серьезных экономических потерях, вызванных *A. citrulli* при возделывании арбузов, дынь, огурцов и тыкв, сообщалось из разных стран. В Израиле *A. citrulli* неоднократно перехваты-

В период 1987-1989 гг. в штатах Флорида, Южная Каролина, Индиана (США) на полях бахчевых культур были отмечены потери урожая более 90%, вызванные возбудителем бактериальной пятнистости тыквенных культур. При раннем заражении растений данным бактериозом потери могут составлять до 100% [9].

Рис. 1. Колонии *Acidovorax citrulli* на среде King B

вался в импортируемых семенах арбуза в период 1992-1994 гг. [1]. Молекулярные и биохимические исследования выявили, что в процессе импорта в страну были завезены бактерии из обеих групп (I и II) [2]. В 2000 г. потери урожая в фермерских хозяйствах Бразилии, специализирующихся на возделывании дынь, составили 40-50%, некоторые хозяйства сообщали о полной потере урожая. Потери урожая арбузов в 13 фермерских хозяйствах восточного региона Турции в 2005 году составили 45%.

В связи с высоким экономическим риском, а также высокой ве-

Рис. 2. Жизненный цикл *Acidovorax citrulli* (Источник: Latin R.X., Hopkins D., 1995)

1. Попадание возбудителя заболевания в поле с зараженными семенами.
2. Получение из зараженных семян рассады с характерными повреждениями на семядольных листьях.
3. Распространение возбудителя при орошении. Для вспышки заболевания достаточно нескольких зараженных растений.
4. Высадка в поле растений со скрытой зараженностью.
5. Распространение возбудителя, заражение соседних растений. Плоды могут поражаться на ранней стадии развития.
6. Появление повреждений и трещин на плодах.
7. Попадание семян из пораженных плодов в почву.
8. Оставшаяся в почве кожура (кора) плодов, самосев из семян инфицированных плодов, сорняки семейства тыквенные – источники заболевания и появления бактериоза на следующий год.
9. Степень опасности возбудителя, сохранившегося в самосеве, кожуре и сорняках зависит от условий окружающей среды

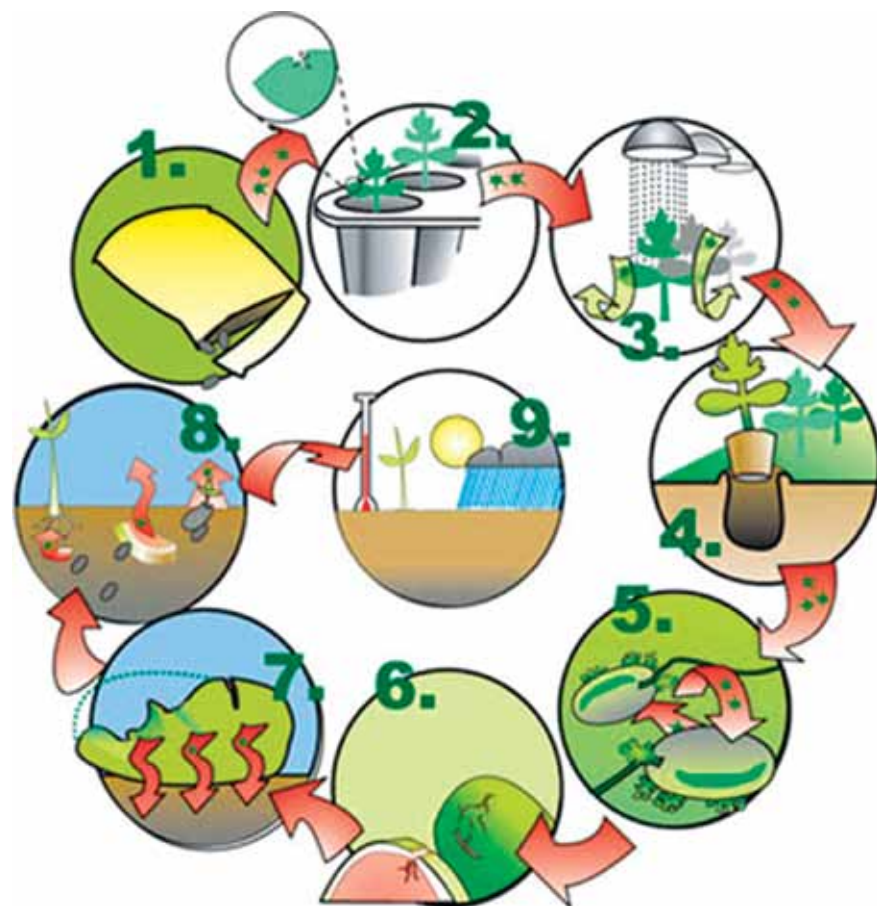


Fig. 2. Life cycle of *Acidovorax citrulli* (Source: Latin R.X., Hopkins D., 1995)

1. Introduction of the pathogen into the field with infested seeds.
2. Seedlings from infested seeds with characteristic lesions on cotyledon leaves.
3. Distribution of the pathogen during irrigation. Several infested plants are sufficient for an outbreak start.
4. Transplanting plants with the latent infection into the field.
5. Spread of the pathogen, infestation of neighbouring plants. Fruit can be damaged at an early stage of development.
6. Appearance of lesions and cracks on fruit.
7. Introduction of seeds from infested fruit into the soil.
8. Fruit peel remaining in the soil, voluntary plants grown from infested seeds and weeds of Cucurbitae family are the source of the disease and the bacteriosis occurrence for the following year.
9. The level of risk imposed by the pathogen remaining in voluntary plants, fruit peel and weeds depends on environmental conditions.

Наиболее восприимчивыми к возбудителю бактериальной пятнистости являются арбуз (*Citrullus lanatus*) и дыня (*Cucumis melo*).

ростью интродукции возбудитель бактериальной пятнистости тыквенных культур был включен в сигнальный перечень ЕОКЗР в 2009 году. *Acidovorax citrulli* также включен в список карантинных организмов Израиля и в список A2 Турции.

Плоды наиболее чувствительны к возбудителю в возрасте 2-3 недель, до образования воскового слоя.

Бактериоз также поражает огурцы (*Cucumis sativus*), разные виды тыкв (*Cucurbita pepo*, *C. moschata*), патиссоны (*Cucurbita pepo* var. *patisoniana*), кабачки (*Cucurbita pepo* var. *giromontina*), бетель (*Piper betle* – семейство перечные). Искусственно могли быть заражены растения семейства пасленовые: перец (*Capsicum* spp.), томаты (*Lycopersicon esculentum*), баклажан (*Solanum melongena*) [5].

Acidovorax citrulli – грамтрицательная бактерия, представляет собой подвижную палочку с одним жгутиком. Клетки прямые, слегка изогнутые, размером 0,2-0,8 x 1,0-5,0 мкм. Строгий аэроб. Имеет положительную оксидазную активность [14]. Хорошо растет на среде King B, YPGA, KAA. Лучший рост культуры наблюдался на среде King B. На данной среде колонии возбудителя были гладкие, округлые, кремовые, блестящие, не флуоресцирующие (рис. 1).

Цикл развития болезни, вызываемой *Acidovorax citrulli*, выглядит следующим образом: возбудитель заболевания попадает в поле с заражен-

ными семенами. Из таких семян получают рассаду, которая, как правило, имеет характерные повреждения на семядольных листьях. В случае скрытой зараженности растения могут оставаться незамеченными в поле. Влажная и теплая погода, орошение дождеванием, травмирование растений, несоблюдение фитосанитарных условий в поле или теплице способствуют развитию болезни и переносу возбудителя на со-

седние здоровые растения. Бактерии *Acidovorax citrulli* с листьев попадают на формирующиеся плоды, которые могут поражаться на ранней стадии развития. Через несколько дней повреждения на плодах становятся видимыми и на их поверхности появляются трещины. Пораженные плоды гниют в поле, в результате чего их зараженные семена, которые являются источником заболевания, попадают в почву (рис. 2).

Симптомы заболевания можно наблюдать на рассаде, листьях и плодах. Характерные признаки заболевания на рассаде – появившиеся вдоль жилок на нижней стороне семядольных листьев водянисто-маслянистые зоны с желтым ореолом. Пораженные участки удлиняются, становятся угловатыми, чернеют, на листьях образуются некрозы. Часто повреждения появляются на гипокотиле, в результате чего рассада погибает [8]. Иногда бактериоз может сохраняться в растении латентно,

Рис. 3. Симптомы бактериальной пятнистости тыквенных культур на листьях дыни (EPPO, 2011; EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System PQR, Ahrea Minuto)



Fig. 3. The symptoms of the bacterial fruit blotch of cucurbits on melon leaves (EPPO, 2011; EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System PQR, Ahrea Minuto)

в этом случае симптомы не проявляются до периода завязывания плодов.

Поражения на листьях (рис. 3) взрослых растений могут появляться в виде небольших пораженных участков от светло-коричневого до красно-коричневого цвета, угловатой формы, как правило, вдоль средней жилки в течение всего вегетационного периода в условиях высокой температуры и влажности. Эти симптомы не очень характерны и их можно легко спутать с симптомами других заболеваний, в частности с угловатой бактериальной пятнистостью, вызываемой *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

Симптомы на поверхности плодов появляются в виде небольших, всего несколько миллиметров, водянисто-маслянистых пятен с неровными границами, которые быстро удлиняются и темнеют. При благоприятных условиях эти пятна в течение нескольких дней расширяются, охватывая всю поверхность плода, оставляя бессимптомным только участки, соприкасающийся с землей. Со временем поверхность плодов трескается и, в результате гниения, выделяет-

ся белая бактериальная масса в виде пеннистого экссудата [8].

Источниками заболевания являются зараженные семена, рассада, самосев тыквенных культур, оставшаяся в почве кожура (кора) плодов, сорняки семейства тыквенные, при этом степень опасности возбудителя зависит от условий окружающей среды.

По данным исследователей из США возбудитель быстро распространяется в условиях теплицы на рассаде [9]. Высокая температура и влажность – идеальные условия для развития болезни. Появившись в поле, бактерия может распространяться с дождем, с порывами ветра, с зараженными инструментами и инвентарем. Распространению заболевания способствует орошение дождеванием. Восковой слой на плодах препятствует заражению растений, в зрелые плоды возбудитель может проникнуть через поранения или механические повреждения.

В настоящее время отсутствуют полностью устойчивые к данному заболеванию сорта тыквенных культур. Однако отмечено, что некоторые сорта арбузов более чувствительны к возбудителю, чем другие:

триплоидные бессемянные сорта, а также арбузы с темной кожурой менее восприимчивы, чем диплоидные и сорта со светлой кожурой. Возбудитель заболевания на бессемянных сортах дынь поражает листья, но инфекция не всегда переходит на плоды [9].

Для предотвращения распространения возбудителя бактериоза и снижения ущерба от болезни специалисты из зарубежных стран, на территории которых был выявлен этот вредный организм, рекомендуют соблюдать следующие фитосанитарные требования:

1. Семена растений должны быть проанализированы на отсутствие возбудителя болезни.

2. Необходимо проводить соответствующие агротехнические мероприятия при выращивании тыквенных культур в теплице и поле, а также регулярные обследования для выявления симптомов болезни на растениях.

3. При обнаружении на растениях подозрительных симптомов требуется отбор растений и проведение экспертизы.

4. При выявлении растений, пораженных возбудителем бактериальной пятнистости, необходимо ликвидировать все растения, выращенные из данной партии семян. Рассада других сортов тыквенных, выращиваемая рядом с пораженными растениями, не должна высаживаться в поле.

5. Если симптомов не наблюдается, но есть подозрение на бактериальную пятнистость, а также в целях профилактики растения начинают обрабатывать при появлении первых мужских цветков препаратами на основе гидроксида меди. Обработки продолжают до периода созревания плодов.

6. Необходимо проводить отдельную посадку триплоидных бессемянных и диплоидных сортов растений.

В Российскую Федерацию ежегодно импортируется большое количество семенного материала тыквенных культур из стран распространения возбудителя заболевания (США, Китай, Турция и др.), который может служить источником инфекции.

Для оценки вероятности проникновения, акклиматизации, распространения бактериальной пятнистости, вызываемой *Acidovorax citrulli*,

возможных потерь при возделывании тыквенных культур и определения карантинного статуса объекта, а также более детального изучения бактериоза необходимо провести анализ фитосанитарного риска для территории Российской Федерации и стран Таможенного союза.

Аннотация

В статье дана краткая информация о новом возбудителе – бактериальной пятнистости тыквенных культур *Acidovorax citrulli*. Представлены данные о возбудителе заболевания, симптомах, поражаемых растениях, путях распространения, требованиях для предотвращения распространения возбудителя бактериоза и снижения ущерба от болезни. Возбудитель включен в сигнальный перечень ЕОКЗР и рекомендован для включения в Единый карантинный перечень стран Таможенного союза.

Литература

1. Assouline I. (1996) The watermelon fruit blotch disease and other diseases caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytoparasitica* 24:136-137.
2. Bahar O. & Burdman S. (2010) Bacterial fruit blotch: A threat to the cucurbit industry. *Israel Journal of Plant Sciences* 58, 19-31.
3. Burdman S., Kots N., Kritzman G., Kopelowitz J. (2005) Molecular, physiological, and host range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. *Plant Dis.* 89: 1339-1347.
4. Choi J-H., Kim M-S., Roh S.W. & Bae J-W. (2010) *Acidovorax soli* sp. nov., isolated from landfill soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2715-2718.
5. EPPO (2011a) *Acidovorax citrulli* – Bacterial fruit blotch of cucurbits. EPPO Alert list.
6. EPPO (2011) EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System PQR.
7. Holeva M.C., Karafla C.D., Glynos P.E. & Alivizatos A.S. (2009) *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* newly reported to cause bacterial fruit blotch of watermelon in Greece. *New Disease Reports* [http://ndrs.org.uk] Volume 20, 13.
8. Hopkins D., Stall B., Kucharek T., Gay D., Gitaitis R., Cook W., Keinath A.

& Latin R. (2000) Bacterial Fruit Blotch of Watermelon. Special Interstate Cooperative [Publication SICP-1].

9. Latin R.X. & Hopkins D.L. (1995) Bacterial fruit blotch of watermelon. The hypothetical exam question becomes reality. *Plant Disease* 79, 761-765.

10. Latin R.X. & Rane K.K. (1990) Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. *Plant Disease* 74 (4), 331.

11. Lewis W. Jett, Timothy P. Baker, Barbara Corwin (2002) Watermelon Bacterial Fruit Blotch. MU Guide. Published By Mu Extension, University of Missouri-Columbia.

12. Schaad N.W., Sowell G. Jr, Goth R.W., Colwell R.R. & Webb R.E. (1978) *Pseudomonas pseudoalcalignes* subsp. *citrulli* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 28 (1), 117-125.

13. Schaad N.W., Postnikova E., Sechler A., Clafflin L.E., Vidaver A.K., Jones J.B., Agarkova I., Ignatov A., Dickstein, E. & Ramundo B.A. (2008) Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. Nov. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 434-446.

14. Schaad N.W., Postnikova E., Sechler A., Clafflin L.E., Vidaver A.K., Jones J.B., Agarkova I., Ignatov A., Dickstein E. & Ramundo B.A. (2009). List of new names and new combinations previously effectively but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 923-925.

15. Webb R.E. & Goth R.W. (1965) A seed-borne bacterium isolated from watermelon. *Plant Disease Reporters*, 818-821.

16. Willems A., Goor M., Thielemans S., Gillis M., Kersters K. & De Ley J. (1992) Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov. comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* and *Acidovorax konjaci*, *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 107-119.

17. Zhao T., Feng J., Sechler A., Randhawa P., Li J. & Schaad N.W. (2009) An improved assay for detection of *Acidovorax citrulli* in watermelon and melon seed. *Seed Science and Technology*, 37, 337-349.

18. http://plantpathology.ark.edu.

THE BACTERIAL FRUIT BLOTCH OF CUCURBITS – *Acidovorax citrulli*

Elena V. Karimova, FGBU VNIKR's Junior Researcher

I.P. Smirnova, Professor, Department of Biochemistry, Peoples' Friendship University of Russia

Over the last few years, phytosanitary services of different countries have been showing concern with regard to occurrence and rapid spread of a hazardous disease – the bacterial fruit blotch of cucurbits caused by *Acidovorax citrulli*. The quarantine status of this pest for the Russian

Federation has not been determined as yet.

The casual agent of the bacterial fruit blotch of cucurbits presents a great interest due to the risk of its being introduced with seeds, as well as due to sufficient crop losses in countries of its distribution and due to a wide

range of crops it affects including those cultivated on the territory of our country.

Fig. 4. The symptoms of the bacterial fruit blotch of cucurbits on watermelon pulp (Holeva et al., 2009)

Рис. 4. Симптомы бактериальной пятнистости тыквенных культур на мякоти арбуза (Holeva et al., 2009)



The bacterial fruit blotch of cucurbits was first reported in the 1960s. Webb R.E. and Goth R.W. described the pathogen in 1965 and isolated it from watermelon seeds imported from Turkey [13]. Later, in 1978, in the USA, Schaad N.W. and others isolated a pure bacterial culture from infested watermelon plants. The bacterium was pathogenic on watermelon, melon, cucumber and pumpkin and it was classified as *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* [10]. In 1992, Willems A. and others proposed to reclassify it as *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* based on the data obtained from the studies on biochemical, molecular and genetic characteristics of the bacterial culture [14]. In 2008, Schaad N.W. and others

The following plants are most susceptible to the bacterial fruit blotch of cucurbits – watermelon (*Citrullus lanatus*) and melon (*Cucumis melo*).

Using fatty acid analysis, PFGE, rep-PCR biochemical analysis and tests on pathogenicity, two genetically distinct groups of bacteria were identified. The first group (I) includes bacteria isolated from Cucurbitae seedlings and fruit (except those of watermelon); the second group (II) consists of bacteria which were mainly isolated from watermelon. The bacteria of the first

added to the EPPO Alert List in 2009. *Acidovorax citrulli* is also included into the Israeli List of Quarantine Pests and into the Turkish Pest List A2.

Moreover, this bacteriosis also damages cucumbers (*Cucumis sativus*), different pumpkin species (*Cucurbita pepo*, *C. moschata*), squash (*Cucurbita pepo* var. *patissoniana*), zucchini (*Cucurbita pepo* var. *giromontina*), and betel (*Piper betle* – pepper family). Solanaceae plants – pepper (*Capsicum* spp.), tomato (*Lycopersicon esculentum*), and eggplant (*Solanum melongena*) could be artificially infested [5].

Acidovorax citrulli, a gram-negative bacterium, is a bacillus with a single flagellum. Cells are straight, slightly

Yield losses of over 90% caused by the bacterial fruit blotch of cucurbits were observed on melon fields in Florida, South Carolina and Indiana (USA) in 1987-1989. In the case of early bacterial infestation of plants, losses can amount to 100% [9].

proposed to change its taxonomy and bring it to the rank of species based on the results of genetic and phenotypic research [11]. The new name of the bacterium – *Acidovorax citrulli* – was published in the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology in 2009 [12].

The causative agent of the bacterial fruit blotch of cucurbits belongs to Proteobacteria phylum, Betaproteobacteria class, Burkholderiales order, Comamonadaceae family, *Acidovorax* genus, *Acidovorax citrulli* species.

The *Acidovorax* genus consists of 12 identified species that can be divided into 2 groups depending on the origin and habitat. *Acidovorax citrulli* is in the group of plant pathogens where *A. cattleya*, *A. avenae*, *A. oryzae*, *A. anthurii*, *A. valerianellae*, *A. konjaci* also belong. The other group includes the following species: *A. defluvii*, *A. facilis*, *A. delafieldii*, *A. temperans*, *A. caeni* found in soil and water samples [3].

Besides, *A. citrulli* isolates were also found to have intra-species variability. In 1978, Schaad N.W. and others isolated the pure bacterial culture from Cucurbitae seedlings which didn't cause any symptoms on watermelons and hypersensitive reaction in tobacco. Nevertheless, the casual agent of the bacterial fruit blotch of cucurbits isolated from watermelon plants or fruit is known to cause reaction of hypersensitivity in tobacco. Further research based on determining the characteristic features of the DNA structure and analysis of fatty acids has confirmed the assumption that these bacteria are similar but not identical.

group are thought to be more virulent than those of the second group.

The bacterial fruit blotch of cucurbits is reported in the countries of South and North America (USA, Brazil, Costa Rica, Nicaragua), Asia (China, Indonesia, Iran, Israel, Malaysia, Taiwan, Thailand, Japan), Oceania (Australia, Guam, the Northern Mariana Islands). In 1995, *Acidovorax citrulli* occurred in some countries of the EPPO region (Hungary, Turkey, Greece and Italy). At present, this pathogen was reported to have been eradicated in Israel, Italy and Nicaragua [6].

The pathogen causes significant yield losses and, consequently, economic losses when Cucurbitae plants are cultivated.

Recently, reports have been received from different countries on sufficient economic losses caused by *A. citrulli* in watermelon, melon, cucumber and pumpkin crop production. In Israel, *A. citrulli* was intercepted in consignments of watermelon seeds imported during 1992-1994 [1]. Molecular and biochemical studies demonstrated that bacteria of both groups (I and II) were imported into the country [2]. In 2000, Brazilian farms specializing in cultivation of melons lost 40-50% of the harvest but some of the farms reported about the total yield loss. In 2005, the harvest losses of watermelon in 13 farms of the the eastern region of Turkey amounted to 45%.

Due to the high economic risk imposed by the bacterial fruit blotch of cucurbits and a high probability of its introduction, the pathogen was

curved of 0.2-0.8 x 1.0-5.0 µm. It is a total aerobe with a positive oxidase activity [14]. It grows well on King B, YPGA, KAA media. The best growth was observed on King B culture medium. On this medium, the colonies of the pathogen were smooth, round, cream-coloured, shiny, not fluorescent (Fig. 1).

The cycle of the disease caused by *Acidovorax citrulli* develops as follows: the pathogen is introduced into a field with infested seeds. The seedlings from these seeds usually get characteristic lesions on cotyledons. In case of latent infection, plants can remain undetected in the field. Humid and warm weather, sprinkler irrigation, plant injuries and failure to maintain phytosanitary conditions in a field or greenhouse contribute to the development of the disease and the pathogen transfer to adjacent healthy plants. *Acidovorax citrulli* bacteria get from leaves onto emerging fruit which can be damaged at an early developmental stage. In several days, lesions on a fruit become visible and its surface cracks. Damaged fruit

Fruit are mostly susceptible to the pathogen at the age of 2-3 weeks before they form a wax layer.

start rotting in the field which results in infested seeds – a source of the disease – getting into the soil (Fig. 2).

The symptoms of the disease can be observed on seedlings, leaves and fruit. Typical symptoms on seedlings



Рис. 5. Симптомы бактериальной пятнистости тыквенных культур на поверхности плода арбуза (David Freeze, 2008, <http://plantpathology.uark.edu>)

Fig. 5. Symptoms of the bacterial fruit blotch of cucurbits on the surface of a watermelon fruit (David Freeze, 2008, <http://plantpathology.uark.edu>)

include the appearance of watery and oily regions with a yellow halo along the veins on the underside of cotyledon leaves. The damaged regions become longer, angular and get black. Necroses appear on leaves. Lesions very often appear on hypocotyls which results in the death of seedlings [8]. Sometimes, the bacterial infection remains latent in the plant and in this case the symptoms are not visible until the period of fruit inception.

Lesions on leaves (Fig. 3) of mature plants may appear in the form of small

damaged areas of light-brown to red-brown colour, angular shaped, along the midrib during the vegetation period under conditions of high temperature and humidity. These symptoms are quite common and can easily be mistaken for symptoms of other diseases, in particular, for the angular leaf spot caused by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*.

The symptoms appear on the surface of fruit in the form of very small-sized, just a few millimeters, watery and oily spots with irregular edges that lengthen rapidly and darken. Under favourable conditions, the spots expand in the course of several days covering the entire surface of the fruit leaving only one symptomless area – the fruit part contacting soil. Gradually, the fruit surface cracks as a

result of rotting; the white bacterial mass in the form of foam fluid is released [8].

The source of the disease is infested seeds, seedlings, Cucurbitae voluntary plants, fruit peel remaining in the soil, weeds of Cucurbitae family, with the pathogen risk level depending on environmental conditions.

According to American researchers, the pathogen spreads rapidly in glasshouses on seedlings [9]. High temperature and humidity are the ideal conditions for disease development. Having once appeared in the field, the bacterium can be transmitted with rain, wind, contaminated tools and equipment. Sprinkling irrigation also contributes. The wax layer on fruit prevents contamination of a plant; the pathogen can be introduced

into a mature fruit through damaged surface or mechanical injuries.

At present, no Cucurbitae varieties resistant to the disease are known. Nevertheless, some watermelon cultivars have been noted to be more susceptible to the pathogen than others – triploid seedless varieties and dark skinned watermelons are less susceptible to the pathogen than diploid varieties with fair skin. The pathogen affects leaves on seedless cultivars of melon but the infection isn't always transmitted to fruit [9].

To prevent the distribution of the bacterium and to reduce the impact of the disease, specialists from different countries where the pest has been detected recommend observing the following phytosanitary requirements:

1. Plant seeds should be tested for the absence of the pathogen.

2. It is necessary to take appropriate agricultural and technical measures for growing pumpkin cultivars in glasshouses and in fields, as well as to conduct regular surveys for detection of the disease symptoms on plants.

3. Plant sampling and testing is necessary if suspicious symptoms are found on plants.

4. If the bacterial fruit blotch of cucurbits affects a plant, it is necessary to destroy all plants grown from the batch of seeds. Seedlings of other pumpkin varieties growing next to infected plants should not be planted in the field.

5. If no symptoms are observed but the presence of the bacterial blotch is suspected, and also for precaution purposes, plants are treated with copper hydroxide preparations when first male flowers appear. Treatments are continued until the period of fruit ripening.

6. Seedless triploid and diploid plant varieties should be planted separately.

Annually, an enormous quantity of Cucurbitae seeds is imported into the Russian Federation from countries where the pathogen occurs (USA, China, Turkey, etc.). This seed material can be the source of infestation.

The pest risk analysis should be conducted for the territory of the Russian Federation and the Customs Union in order to estimate the possible introduction, establishment and spread of the bacterial fruit blotch of cucurbits caused by *Acidovorax citrulli*, as well as possible losses when Cucurbitae crops

are cultivated. The PRA is also necessary for determining the quarantine status of the pathogen and for more detailed studies of the bacterial fruit blotch.

Summary

The article provides a summary on a new pathogen Acidovorax citrulli causing the bacterial fruit blotch of cucurbits. Data are provided on the pathogen, symptoms, affected plants, ways of its distribution, and requirements for preventing the spread of the pathogen and reducing the impact of the disease. The pathogen is included into the EPPO Alert List and recommended to be included into the Pest List of the Customs Union countries.

References

1. Assouline I. (1996) The watermelon fruit blotch disease and other diseases caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytoparasitica* 24:136-137.
2. Bahar O. & Burdman S. (2010) Bacterial fruit blotch: A threat to the cucurbit industry. *Israel Journal of Plant Sciences* 58, 19-31.
3. Burdman S., Kots N., Kritzman G., Kopelowitz J. (2005) Molecular, physiological, and host range characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* isolates from watermelon and melon in Israel. *Plant Dis.* 89: 1339-1347.
4. Choi J-H., Kim M-S., Roh S.W. & Bae J-W. (2010) *Acidovorax soli* sp. nov., isolated from landfill soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2715-2718.
5. EPPO (2011a) *Acidovorax citrulli* – Bacterial fruit blotch of cucurbits. EPPO Alert list.
6. EPPO (2011) EPPO Plant Quarantine Data Retrieval System PQR.
7. Holeva M.C., Karafla C.D., Glynos P.E. & Alivizatos A.S. (2009) *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* newly reported to cause bacterial fruit blotch of watermelon in Greece. *New Disease Reports* [http://ndrs.org.uk] Volume 20, 13.
8. Hopkins D., Stall B., Kucharek T., Gay D., Gitaitis R., Cook W., Keinath A. & Latin R. (2000) Bacterial Fruit Blotch of Watermelon. Special Interstate Cooperative [Publication SICP-1].
9. Latin R.X. & Hopkins D.L. (1995) Bacterial fruit blotch of

watermelon. The hypothetical exam question becomes reality. *Plant Disease* 79, 761-765.

10. Latin R.X. & Rane K.K. (1990) Bacterial fruit blotch of watermelon in Indiana. *Plant Disease* 74 (4), 331.

11. Lewis W. Jett, Timothy P. Baker, Barbara Corwin (2002) *Watermelon Bacterial Fruit Blotch*. MU Guide. Published By Mu Extension, University of Missouri-Columbia.

12. Schaad N.W., Sowell G. Jr, Goth R.W., Colwell R.R. & Webb R.E. (1978) *Pseudomonas pseudoalcalignes* subsp. *citrulli* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 28 (1), 117-125.

13. Schaad N.W., Postnikova E., Sechler A., Claflin L.E., Vidaver A.K., Jones J.B., Agarkova I., Ignatov A., Dickstein, E. & Ramundo B.A. (2008) Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 434-446.

14. Schaad N.W., Postnikova E., Sechler A., Claflin L.E., Vidaver A.K., Jones J.B., Agarkova I., Ignatov A., Dickstein E. & Ramundo B.A. (2009). List of new names and new combinations previously effectively but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 923-925.

15. Webb R.E. & Goth R.W. (1965) A seed-borne bacterium isolated from watermelon. *Plant Disease Reporters*, 818-821.

16. Willems A., Goor M., Thielemans S., Gillis M., Kersters K. & De Ley J. (1992) Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov. comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* and *Acidovorax konjaci*, *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 107-119.

17. Zhao T., Feng J., Sechler A., Randhawa P., Li J. & Schaad N.W. (2009) An improved assay for detection of *Acidovorax citrulli* in watermelon and melon seed. *Seed Science and Technology*, 37, 337-349.

18. http://plantpathology.uark.edu.

ФЕРОМОННАЯ КОММУНИКАЦИЯ И СИНТЕТИЧЕСКИЙ ФЕРОМОН ЧЕТЫРЕХПЯТНИСТОЙ ЗЕРНОВКИ *Callosobruchus maculatus*

Б.Г. Ковалев, доктор химических наук,

И.О. Камаев, Н.М. Атанов, Н.П. Кузина, М.В. Чирская, А.А. Кузин

научные сотрудники отдела синтеза и применения феромонов ФГБУ «ВНИИКР»

Жуки-зерновки рода *Callosobruchus*, исторически населяющие тропические и субтропические природные зоны, в настоящее время широко распространились по земному шару благодаря активному товарообороту (рис. 1). Зерновки наносят значительный экономический ущерб семе-

нитарного мониторинга карантинных вредных объектов [1]. Также феромоны применяют и в условиях хранения, где не всегда возможно оперативно обнаружить вредителя, такого как четырехпятнистая зерновка. На практике использование феромонов намного удобнее при-

Данная работа посвящена анализу литературных данных по феромонной коммуникации *Callosobruchus maculatus* и лабораторным испытаниям синтезированного в ФГБУ «ВНИИКР» феромона данного вида.

Феромонная коммуникация четырехпятнистой зерновки

В настоящее время сравнительно подробно изучена феромонная коммуникация четырехпятнистой, китайской, азиатской многоядной зерновок, а также *C. rhodesianus* Pic 1902 и *C. subinnotatus* Pic 1939. Для перечисленных видов характерно наличие двух типов половых феромонов: при-

В присутствии четырехпятнистой зерновки 1 кг семян *Fabaceae* повреждается на 80-90% [12].

нам бобовых (*Fabaceae*, рис. 2), на которых жуки трофически специализированы, в хранилищах и в полевых условиях [2].

Например, в присутствии четырехпятнистой зерновки 1 кг семян *Fabaceae* повреждается на 80-90% [12]. Поэтому во многих странах мира виды зерновок являются карантинными вредителями. Для Российской Федерации к наиболее вредоносным и часто встречающимся в импортной продукции относятся четыре вида зерновок рода *Callosobruchus*: четырехпятнистая *C. maculatus* (F. 1775), китайская *C. chinensis* (L. 1758), азиатская многоядная *C. analis* (F. 1781) и индийская фасоловая *C. phaseoli* (Gyll. 1833). Данные виды включены в список отсутствующих видов на территории России Перечня карантинных вредных организмов [1].

Широкое распространение зерновок *Callosobruchus* и наносимый ими вред определили интерес исследователей к методам идентификации и синтезу половых феромонов данных видов для фитосанитарного контроля: мониторинга и непосредственной борьбы. Феромоны служат удобным инструментом для фитоса-



Fig. 1. Laboratory cultures of the cowpea beetle



Fig. 2. Mung bean affected by the cowpea beetle

Рис. 2. Маш, поврежденный четырехпятнистой зерновкой

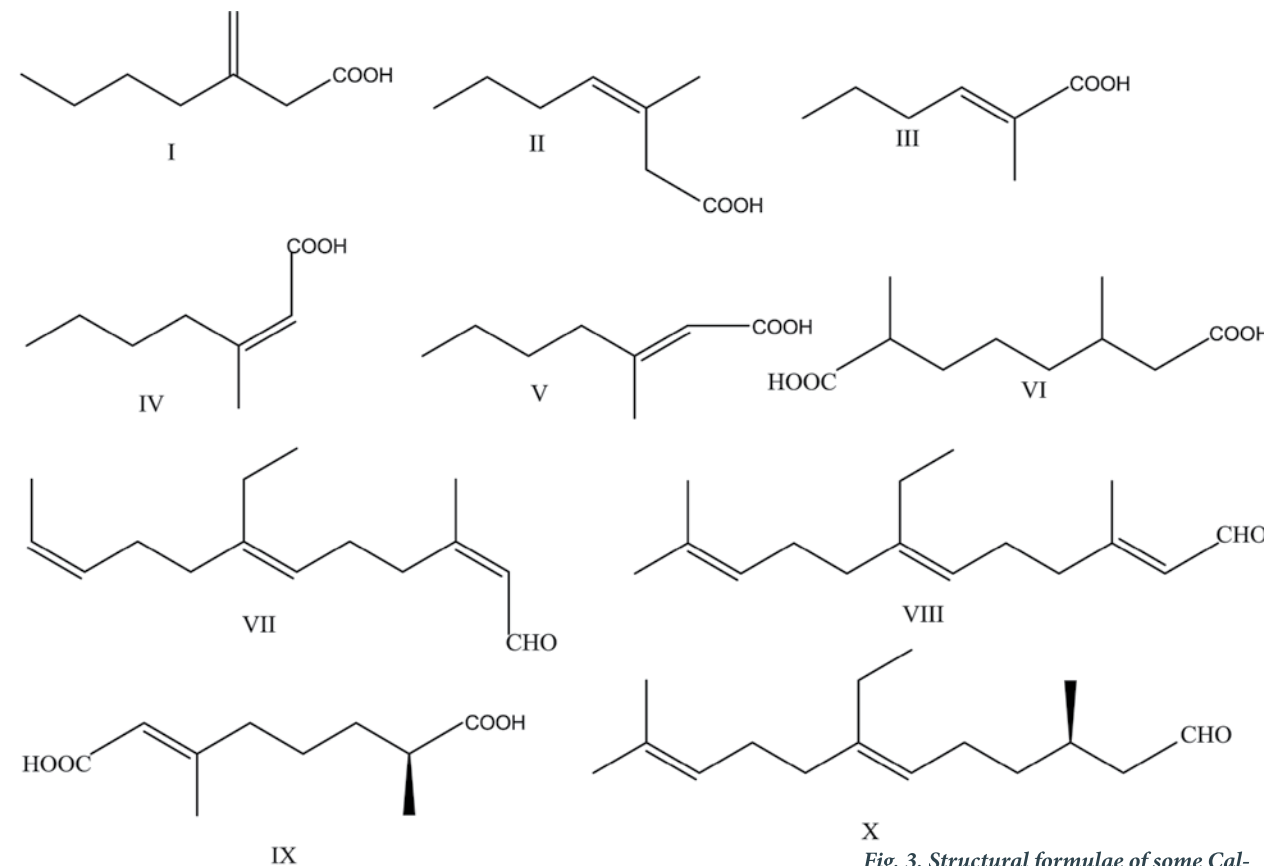
влекающего (половой аттрактант), который действует на расстоянии, привлекая самцов к самке, и контактного, который запускает процесс копуляции при непосредственном контакте особей.

Половой аттрактант самки *C. maculatus* идентифицирован как смесь пяти непредельных метилразветвленных кислот с восемью угле-

родными атомами (Phillips et al., 1996; табл. 1): 3-метилгептановой (рис. 3, I), 3-метил-3Z-гептеновой (II), 3-метил-3E-гептеновой (III), 3-метил-2Z-гептеновой (IV), 3-метил-2E-гептеновой (V). Показано, что аттрактивность смеси кислот выше, чем аттрактивность каждой кислоты по отдельности. Ранее отмечалось, что цис-3-метил-2-гептеновая кислота в отличие от других четырех идентифицирована также как компонент полового феромона *Callosobruchus analis* [13].

Контактный феромон самок *C. maculatus* определен как смесь двух кислот [11]: 2,6-метил-1,8-октандиовой (VI) и нонандиовой с фракцией кутикулярных углеводородов-синергистов, которая, в свою очередь, состоит из смеси прямоцепочечных метил- и диметилразветвленных углеводородов с числом углеродных атомов C₂₇-C₃₅. Последние, по-видимому, определяют видоспецифичность феромонов [11].

Репродуктивная активность четырехпятнистых зерновок отмечена в светлое время суток (фотофаза). Феромоны выделяются мембранами, соединяющими VIII тергит и VIII стернит и содержащими примерно 50 одноклеточных желез. Эти железы не окружены специальными мышцами, поэтому предполагается, что феромоны испаряются с поверхности кутикулы, чему также способствует движение сегментов брюшка [14]. Не спаривавшиеся самки (рис. 4) выделяют наибольшее количество феромона в первую фотофазу, чем во вторую или темное время суток. Выделение феромонов у самок сопровождается характерным поведением (calling behavior) с поднятием усиков, брюшка и задних ног, которые помогают рассеиванию феромонов, тогда как опорой телу служат первые две пары ног. В среднем, оно продолжается 3-5 минут [15]. Выявлено, что, несмотря



X
Fig. 3. Structural formulae of some *Callosobruchus* species pheromone components. The names of the components are given in Table 1

Рис. 3. Структурные формулы компонентов феромонов некоторых видов зерновок рода *Callosobruchus*. Названия веществ приводятся в табл. 1

Таблица 1. Сравнительная характеристика привлекающих и контактных феромонов пяти видов *Callosobruchus*

№ п/п	Вид	Привлекающий феромон	Контактный феромон	Ссылка на источник
1	Четырехпятнистая зерновка <i>Callosobruchus maculatus</i>	3-метилгептановая (I), 3-метил-3Z-гептеновая (II), 3-метил-3E-гептеновая (III), 3-метил-2Z-гептеновая (IV), 3-метил-2E-гептеновая (V)	2,6-метил-1,8-октандиовая (VI) и нонандиовая кислоты C ₂₇ -C ₃₅ -углеводороды	Phillips et al., 1996; Nojima et al., 2007
2	Китайская зерновка <i>Callosobruchus chinensis</i>	7-этил-3,11-диметил-2Z,6E, 10-додекантриеналь (VII) 7-этил-3,7-диметил-2E,6E, 10-додекантриеналь (VIII)	3,7-диметил-2E-октен-1,8-диовая кислота (эректин, IX) C ₂₅ -C ₃₅ углеводороды	Shimomura et al., 2008; Tanaka et al., 1981
3	Азиатская многоядная зерновка <i>Callosobruchus analis</i>	Недостаточно изучен, выделена 3-метил-3Z-гептеновая кислота (IV)	2,6-диметил-октан-1,8-диовая (VI) и 3,7-диметил-2E-октен-1,8-диовая кислоты (каллособруховая, IX)	Cork et al., 1991; Shimomura et al., 2010b
4	<i>Callosobruchus rhodesianus</i>	7-этил-3S, 11-диметил-6E, 10-додекантриеналь (X)	н.д.	Shimomura et al., 2010a
5	<i>Callosobruchus subinnotatus</i>	3-метил-2Z-гептеновая (IV), 3-метил-2E-гептеновая (V) кислоты	н.д.	Shu et al., 1999

Примечание: н.д. – нет данных.

на полиандрию, у самок феромонная активность снижается на 6 день после выхода из куколки, в том числе из-за размножения. Положительные электроантеннографические ответы самцов (рис. 5) вызывали самки возрастом 2-6 дней [22]. Имеются также сведения, что самцов привлекали самки возрастом 1-4 дня [15].

Поведенческие реакции самцов (полет, приближение, контакт с диспенсером) разнятся в зависимости от компонента феромона (каждая кислота по отдельности) и по сравнению с экстрактом самок и контролем (гексаном). Все кислоты, кроме цис-3-метил-2-гептеновой кислоты, вызывают полет (высокий процент ответа). Но при воздействии смеси всех пяти кислот жуки приближались к источнику стимула и контактировали с диспенсером, что было сопоставимо с эффектом экстракта самок. Приближение также вызывается цис- и транс-3-метил-3-гептеновыми кислотами, но на существенно низком уровне, и фактически не отмечено при действии цис- и транс-3-метил-2-гептеновых кислот. Кроме того, при сравнении поведенческих реакций жуков на феромоны *Callosobruchus analis* и *C. maculatus* показана видоспецифичность последнего [13]. Следует отметить, что

C. analis, как и *C. subinnotatus*, слабо или вовсе не реагировали на феромон *C. maculatus* [10].

Чувствительность самцов к низким концентрациям феромона определяли методом электроантеннографии [22]. В случае с цис-3-метил-2-гептеновой кислотой ответ наблюдается (0,8 mV) при наименьшей концентрации в 10 нг, с цис-3-метил-3-гептеновой кислотой (Z33A) ответ достигается при 5 нг (0,7 mV).

Следует отметить, что самцы четырехпятнистой зерновки, а также китайской, могут пытаться спариваться как с особями своего вида независимо от пола, так и близкородственными видами (и также без учета половой принадлежности особи). Более того, отмечены случаи попыток спаривания с мертвыми особями своего вида [21]. Подобная «неразборчивость» самцов *C. maculatus* должна учитываться при проведении исследования поведенческих реакций под влиянием феромонов, как своеобразного маркера положительной реакции.

Лабораторные испытания синтетического феромона
Методика. Для проведения процедуры лабораторного тестирования использовали трехдневных ак-

тивно летающих самцов лабораторной популяции четырехпятнистой зерновки из Таджикистана. Жуков выращивали в стеклянных сосудах (объемом 0,5 л), на треть заполненных смесью бобовых: маш, горох, нут (1:1:1), помещенных в термостат при постоянной температуре 30-31 °C без доступа света.

Отбор материала одного возраста проводили следующим образом. Культуры четырехпятнистой зерновки полностью очищались просеиванием бобов от имаго, на следующий день проводили сбор вышедших из куколок зерновок экстаустером. Каждая особь помещалась в отдельную пластиковую пробирку Эппендорфа с крышкой, объемом 1,5-2 мл. Прижизненное определение пола четырехпятнистых зерновок проводили с использованием следующих признаков: длина тела (визуально), окраска, степень выраженности рисунка надкрылий, длина сегментов антенн. После двухсуточного содержания в термостате (температура 23-25 °C) на третий



Fig. 4. Cowpea female beetle

Рис. 4. Самка четырехпятнистой зерновки

день самцы используются для тестирования феромона.

Исследование проводили на оригинальном ольфактометре без выбора (рис. 6), представляющим собой

площадку, поддерживающую постоянную температуру (столтик для парафиновых срезов), на который помещали диск с фильтровальной бумагой (23 см), накрывая сверху стеклянным колпаком объемом 4 л. В центре диска фильтровальной бумаги находился стимул в виде диспенсера (ТУ 2449-018-04731278-

2011), представляющий собой резиновую пробку (из резины 52-599/3) с нанесенным на него феромоном.

Синтетический феромон представляет собой смесь пяти кислот (с общей формулой – $C_8H_{14}O_2$): (Z3)-3-метил-3-гептеновой кислоты, (E3)-3-метил-3-гептеновой кислоты, (Z2)-3-метил-2-гептеновой кислоты, (E2)-3-метил-2-гептеновой кислоты и 3-метилгептеновой кислоты. В ФГБУ «ВНИИКР» разработан метод синтеза смеси из пяти компонентов для полового феромона четырехпятнистой зерновки на основе реакции Реформатского.

Поскольку реакция синтеза не стереоселективна, то есть не позволяет разделить компоненты феромона, то в данном исследовании использовали полученную в ходе синтеза смесь с имеющимся соотношением компонентов.

Самцов четырехпятнистой зерновки в пробирках извлекали из термостата за 2-3 часа до опыта. Перед исследованием площадку нагревали до температуры 30 °С.

Самцов четырехпятнистой зерновки в пробирках извлекали из термостата за 2-3 часа до опыта. Перед исследованием площадку нагревали до температуры 30 °С.

Тестировали аттрактивность различной концентрации феромона (вариант опыта): 0,25; 0,5; 1 и 2 мкг, в качестве контроля служил гексан. Число наблюдений (повторностей) для каждого варианта опыта составляло от 3 до 6. Для каждого наблюдения использовали 10 самцов.

Таблица 2. Сравнение разных концентраций аттрактивности феромона непараметрическим дисперсионным анализом

Концентрации феромона	F					
	0,25	0,5	1	2	контроль	
p	0,25		1,027	0,06119	10,68	2,24
	0,5	0,3202		0,4997	13,34*	7,848**
	1	1	0,5669		5,841	2,23
	2	0,3375	0,0367*	0,3255		1,612
	контроль	0,0928	0,0023**	0,0983	0,1425	

Примечание: Верхняя часть таблицы – значения критерия F, нижняя часть – значения p. Статистически значимые различия выделены знаком (*) при $p < 0,05$, (**) при $p < 0,01$.



Fig. 5. Cowpea male beetle

Рис. 5. Самец четырехпятнистой зерновки

мок. Каждая кислота по отдельности обладает сравнительно невысокой аттрактивностью. У жуков наблюдается высокая чувствительность к низким количествам феромона.

Проведенные по оригинальной методике испытания позволили сделать вывод о том, что синтезированный в ФГБУ «ВНИИКР» половой феромон четырехпятнистой зерновки обладает биологически активными свойствами и аттрактивен для самцов данного вида вредителя.

Установлена эффективная доза феромона для привлечения самцов четырехпятнистой зерновки в лабораторных условиях, равная 0,5 мкг. Концентрация феромона от 2 мкг характеризуется низкой аттрактивностью.

Самцов размещали на один край диска, приподнимая стеклянный колпак, время одного наблюдения длилось 20 мин (рис. 7). Отмечали особенности поведения жуков и контакт со стимулом. Аттрактивность определяли как отношение числа жуков, контактировавших со стимулом, к общему числу жуков. После каждого контакта со стимулом особь сразу же удаляли из ольфактометра. После каждого наблюдения особи вскрывались для уточнения их половой принадлежности.

Статистическую обработку материала проводили непараметрическим дисперсионным анализом для выявления различий между вариантами.

Результаты. В ходе проведенных испытаний были выявлены основные поведенческие реакции самцов четырехпятнистой зерновки на синтетический феромон: замирание на месте, шевеление антеннами, приподнимание передней части тела (рис. 8), трение задних ног о брюшко с выдвиганием крыльев (рис. 9, 10).

Под воздействием феромона самцы контактируют со стимулом (рис. 11). Вне зависимости от того, напрямую ли контактировали особи с диспенсером или нет, некоторые жуки совершали попытки спариваться с другими жуками (рис. 12, 13). Подобное явление описано в литературе, в частности, известно, что самцы пытаются спариться с жуками вне зависимости от их пола, вида и физического состояния [19].

Исследование аттрактивности феромона четырехпятнистой зерновки в зависимости от его концентрации показало, что наибольшее число особей привлекалось половым аттрактантом с концентрацией 0,5 мкг (86%), а наименьшее – при 2 мкг (30%). Для сравнения: разброс значений аттрактивности жуков на гексан (контроль) варьировал от 0 до 20%.

Сравнение средних значений аттрактивности феромона выявило высокую аттрактивность феромона при концентрации от 0,25 до 1 мкг (рис. 14).

Аттрактивность феромона при концентрации 2 мкг для четырехпятнистой зерновки в 1,9 раз ниже, чем при концентрации 0,5 мкг. Последнее, возможно, связано с тем, что большое количество феромона вызывает у самцов реакцию снижения активности из-за чрезмерного перевозбуждения нервной системы.

Аттрактивность контроля составляет 8%, что существенно ниже показателей всех испытуемых концентраций. Следует заметить, что на диспенсер без феромона и гексана реакция

жуков в виде контакта со стимулом вообще не наблюдалась.

Статистическая обработка данных методом однофакторного непараметрического дисперсионного анализа (табл. 2) подтвердила выявленные различия в аттрактивности феромона при концентрации 0,5 мкг и 2 мкг, а также феромона (0,5 мкг) и контроля. Однако значимых различий между концентрациями 0,25, 0,5 и 1 мкг выявлено не было, хотя существует тенденция к предпочтению жуками 0,5 мкг дозы феромона.

Заключение

Половой привлекающий феромон четырехпятнистой зерновки представлен монокарбонными кислотами и является видоспецифичным. По литературным данным, все пять кислот, входящих в состав полового аттрактанта *C. maculatus*, сопоставимы по аттрактивности с экстрактом феромонных желез са-

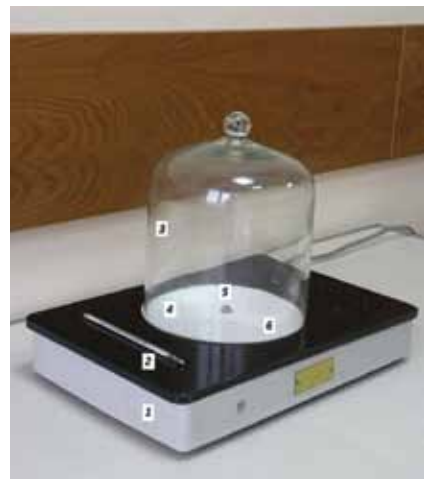


Рис. 6. Ольфактометр без выбора для лабораторных испытаний феромона четырехпятнистой зерновки. Обозначения: 1 – подогреваемая площадка; 2 – термометр; 3 – стеклянный колпак емкостью 3л; 4 – диск фильтровальной бумаги; 5 – диспенсер; 6 – место размещения самцов. Сравнение аттрактивности (%) феромона четырехпятнистой зерновки при разных концентрациях с контролем (гексан)

Fig. 6. Single-choice olfactometer used in laboratory testing of the cowpea beetle pheromone: 1 – heated base; 2 – thermometer; 3 – 3 liter glass cap; 4 – filter paper disk; 5 – dispenser; 6 – male location. Comparison of the cowpea beetle pheromone attractiveness (%) at various concentrations with that of the control (hexane)

Литература

1. Вредные организмы, имеющие карантинное фитосанитарное значение для Российской Федерации / Под ред. С.А. Данкверта, М.И. Маслова, У.Ш. Магомедова, Я.Б. Мордковича. Воронеж: Научная книга, 2009. 449 с.
2. Лукьянович Ф.К., Тер-Минасян М.Е. Жуки-зерновки (Bruchidae) // Фауна СССР. Жесткокрылые. Т. 24. Вып. 1. М.-Л., 1957. 209 с.
3. Перечень вредителей растений, возбудителей болезней растений, растений (сорняков), имеющих карантинное значение для Российской Федерации. Приложение к Приказу Минсельхоза России от 26 декабря 2007 г. № 673.
4. Следзевская Е.Р. Временные рекомендации по выявлению и борьбе с четырехпятнистой зерновкой. Госинспекция по карантину растений, Гос. Агропромышленный комитет СССР. М., 1989. 7 с.
5. Babu A., Hern A., Dorn S. (2003) Sources of semiochemicals mediating

hostfinding in *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) // Bulletin of Entomological Research. V. 93. P. 187-192.

6. Caswell G.H. (1960) Observations on an abnormal form of *Callosobruchus maculatus* (F.) // Bulletin of Entomological Research. V. 50. P. 671-680.

7. Cork A., Hall D.R., Blaney W.M., Simmonds M.S.J. (1991) Identification of a component of the female sex pheromone of *Callosobruchus analis* (Coleoptera: Bruchidae) // Tetrahedron Lett. V. 32. P. 129-132.

8. Fox C.W., Bush M.L., Wallin W.G. Maternal age affects offspring lifespan of the seed beetle, *Callosobruchus maculatus* // Functional Ecology. 2003. V. 17. P. 811-820.

9. Fox C.W., Bush M.L., Roff D.A., Wallin W.G. (2004) Evolutionary genetics of lifespan and mortality rates in two populations of the seed beetle, *Callosobruchus maculatus* // Heredity. P. 92. P. 170-181.

10. Mbata G.N., Shu S., Ramaswamy S.B. (2000) Sex pheromones of *Callosobruchus subinnotatus* and *C. maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): congeneric responses and role of air movement // Bulletin of Entomological Research. V. 90. P. 147-154.

11. Nojima S., Shimomura K., Honda H., Yamamoto I., Ohsawa K. (2007) Contact Sex Pheromone Components of the Cowpea Weevil, *Callosobruchus maculatus* // J. Chem. Ecol. V. 33. P. 923-933.

12. Ndiaye A., Gauthier P., Sembene M. (2011) Genetic discrimination of two cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Bruchid (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae): *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Bruchidius atrolineatus* (Pic.) // International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences. V. 1. № 2. P. 196-201.

13. Phillips T., Phillips J., Webster F., Tang R., Burkholder W. (1996) Identification of sex pheromones from cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*, and related studies with *C. analis* (Coleoptera: Bruchidae) // Journal of Chemical Ecology. V. 22. № 12. P. 2233-2249.

14. Pierre D., Biimont J.-C., Pouzat J., Lextrait P., Thibeaudeau C. (1997) Location and ultrastructure of sex pheromone glands in female *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera : Bruchidae) // J. Insect Morphol. & Embriol. Vol. 25. № 4. P. 391-404.

15. Qi Y., Burkholder W.E. (1982) Sex pheromone biology and behavior of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) // J. Chem. Ecol. V. 8. P. 527-534.

16. Rup R. (1988) Antenna and antennal sensilla dimorphism in *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) // J. stored Prod. Res. Vol. 24. №. 2. P. 83-86.

17. Sano I. (1967) Density effect and environmental temperature as the factors producing the active form of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera, Bruchidae) // J. Stored Prod. Res. Vol. 2. P. 187-195.

18. Shimomura K., Nojima S., Yajima S., Ohsawa K. (2008) Homofarnesals: Female sex attractant pheromone components of the southern cowpea weevil, *Callosobruchus chinensis* // J. Chem. Ecol. V. 34. № 4. P. 467-477.

19. Shimomura K., Koshino H., Yajima A., Matsumoto N., Kagohara Y., Kamada K., Yajima S., Ohsawa K. (2010a) 2,3-Dihydrohomofarnesal: female sex attractant pheromone component of *Callosobruchus rhodesianus* (Pic) // J. Chem. Ecol. V. 36. № 8. P. 824-833.

20. Shimomura K., Akasaka K., Yajima A., Mimura T., Yajima S., Ohsawa K. (2010b) Contact sex pheromone components of the seed beetle, *Callosobruchus analis* (F.) // J. Chem. Ecol. V. 36. № 9. P. 955-965.

21. Shimomura K., Mimura T., Ishikawa S., Yajima S., Ohsawa K. (2010c) Variation in mate recognition specificities among four *Callosobruchus* seed beetles // Entomologia Experimentalis et Applicata. V. 135. P. 315-322.

22. Shu S., Koepnick W.L., Mbata G.N., Cork A., Ramaswamy S.B. (1996) Sex pheromone production in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): electroantennographic and behavioral responses // J. Stored Prod. Res. V. 32. P. 21-30.

23. Shu S., Mbata G.N., Cork A., Ramaswamy S.B. (1999) The chemistry of the sex pheromone of *Callosobruchus subinnotatus* // J. Chem. Ecol. V. 25. № 12. P. 2715-2727.

24. Stillwell R.C., Fox C.W. (2007) Environmental effects on sexual size dimorphism of a seed-feeding beetle // Oecologia. V. 153. P. 273-280.

25. Suzuki Y. (2006) Evolution of Reaction Norm of Reproductive Diapause in *Callosobruchus maculatus*. Dissertation. University of Tsukuba, 92 p.

26. Tanaka K., Ohsawa K., Honda H., Yamamoto I. (1981) Copulation release pheromone, erectin, from the azuki bean weevil (*Callosobruchus chinensis* L.) // J. Pesticide Science. V. 6. P. 75-82.

27. Utida S. (1954) Phase dimorphism in the laboratory population of *Callosobruchus quadrimaculatus* // Oyo Dobutsugaku Zasshi, 18, 161-168.

28. Verma K.K. (2007) Polyphenism in insects and the juvenile hormone // J. Biosci. V. 32. № 2. P. 415-420.

PHEROMONE COMMUNICATION AND SYNTHETIC PHEROMONE OF THE COWPEA BEETLE *Callosobruchus maculatus*

Boris G. Kovaliov, Doctor of Chemistry, Ilya O. Kamaev, Nikolay M. Atanov, Nina P. Kuzina, Marina V. Chirskaya, Anatoliy A. Kuzin, FGBU VNIKR's Researchers, Department for Pheromone Synthesis

The cowpea weevils of the genus *Callosobruchus*, originally tropical and subtropical pests, have now spread throughout the world due to increased volumes of trade (Fig. 1). These pests trophically interact with beans and cause significant economic damage to bean crops (Fabaceae, Fig. 2) both under storage and field conditions [2]. Therefore, the cowpea weevils are considered quarantine pests in many countries. In Russia, the most significant cowpea weevils frequently intercepted in imported products are the cowpea beetle *C. maculatus* (F. 1775), pulse beetle *C. chinensis* (L. 1758), Graham bean

This paper reviews the current state of knowledge on communication in *Callosobruchus maculatus* and presents data on laboratory testing of *Callosobruchus maculatus* pheromones synthesized at the Laboratory of the All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU VNIKR).

Pheromone communication in *Callosobruchus maculatus*

Up to date, comparatively comprehensive studies have been performed on communications in *C. maculatus*, *C. chinensis*, *C. analis*, as well as in *C. rhodesianus* Pic 1902 and

C. subinnotatus Pic 1939. Typically, these species have two types of sex pheromones, i.e. an attracting pheromone (sex-attractant) influencing males over distances and a contact pheromone triggering copulation when adult insects come into contact.

The sex-attractant of *C. maculatus* was identified to be a combination of five unsaturated methyl-branched acids with carbon length of 8 atoms (Phillips et al., 1996; Table 1): 3-methylheptanoic (Fig. 3, I), (3Z)-3-methylheptanoic (II), (3E)-3-methylheptanoic (III), (2Z)-3-methylheptanoic (IV), and (2E)-3-methylheptanoic (V). The combination of the acids has an aggregate attractiveness exceeding that of each individual acid. Unlike the other four acids, (Z)-3-

The presence of the cowpea beetle *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) damages 80-90% of Fabaceae seeds per kilogram [12].

weevil *C. analis* (F. 1781), and cowpea weevil *C. phaseoli* (Gyll. 1833). These species, being absent in Russia, are on the National List of Quarantine Pests [1].

The wide distribution of the *Callosobruchus* species and the damage they cause aroused scientific interest in methods for identification and synthesis of their sex pheromones to be used for phytosanitary purposes, i.e. direct control and monitoring of these pests.

Pheromones are a convenient tool used to monitor quarantine pests [1]. They are also applied in pest monitoring in storage facilities where timely detection of such pests as *C. maculatus* is not always feasible. The usability of pheromones excels that of seed x-ray radiography. Nonetheless, until recently *Callosobruchus maculatus* attractant has not been synthesized in any of the CIS countries.



Рис. 7. Начало биоиспытаний



Рис. 8. Реакция самцов четырехлентистой зерновки на синтетический феромон: приподнимание тела на передних и средних ногах и шевеление антеннами

methyl-2-heptenoic acid had been previously identified as a component of the *Callosobruchus analis* sex pheromone [13].

The contact pheromone of *C. maculatus* males was identified as a combination of two acids [11]: 2,6-dimethyloctane-1,8-dioic acid and

nonanedioic acid with a fraction of cuticular hydrocarbons with synergistic effect representing a mixture of methyl- and dimethyl- branched C_{27} - C_{35} straight-chain hydrocarbons. Apparently, these cuticular hydrocarbons determine the species-specificity of the sex pheromone [11].

Fig. 8. Cowpea beetle male responses to the synthetic pheromone: raised front part of the body and antennal movement

It was observed that the cowpea beetle most actively reproduced during daytime (photophase). Pheromones are



Рис. 9. Реакция самцов четырехлентистой зерновки на синтетический феромон: трение задними ногами о брюшко и высвобождение крыльев

Fig. 9. A Cowpea beetle male responses to the synthetic pheromone: rubbing of hind legs against the abdomen while pulling the wings out

produced by the membranes consisting of about 50 unicellular glands. These connect tergite VIII and sternite VIII. The unicellular glands are not surrounded by muscles, so pheromones easily volatilize off the cuticle surface. Pheromone exuding is also facilitated by the movement of abdominal segments [14]. Virgin females (Fig. 4) produce greater amounts of pheromones during the first photophase than during the second one or night time. Pheromone production in females is characterized by the calling behavior, i.e. lifting of the antenna, abdomen and hind legs while the body is resting on the first

two pairs of the forelegs. This increases pheromone dissemination. The calling behavior lasts from about three to five minutes [15]. In spite of polyandry, the pheromone production in females was observed to decrease by the sixth day after emergence due to certain factors including reproduction. Positive electroantennographic responses in males (Fig. 5) were triggered by females aged 2 – 6 days [22]. There is also evidence that males were attracted by females aged 1 – 4 days [15].

Behavioral responses in males (flying, approaching, contacting the dispenser) depend on the pheromone component (each individual acid). Also, the responses to the pheromone components differ from those caused by various amounts of the female pheromone extract and the control (hexane). In all cases, except for

(Z)-3-methyl-2-heptenoic acid, flight was observed (high level of response). But only the combination of the five acids urged the beetles to approach the source of the stimulus and come into contact with the dispenser. This effect resembled that of the female pheromone extract. Approaching was also caused by

Before testing, the olfactometer base was heated up to 30 °C.

(3Z)-, (3E)-3-methylheptenoic acids, but at significantly lower rates. Virtually, no approaching was observed with (2Z)-, (2E)-3-methylheptenoic acids. Additionally, the comparison of the behavioral responses in beetles to the *C. analis* and *C. maculatus* pheromones

Table 1. Comparative Analysis of the Contact and Attracting Pheromones of the Five *Callosobruchus* Species

№	Species	Attracting pheromone	Contact pheromone	References
1	Cowpea beetle <i>Callosobruchus maculatus</i>	Acids: 3-methylheptanoic (I), (3Z)-3-methylheptenoic (II), (3E)-3-methylheptenoic (III), (2Z)-3-methylheptenoic (IV), (2E)-3-methylheptenoic (V)	2,6-dimethyloctane-1,8-dioic (VI) and nonanedioic acids C_{27} - C_{35} hydrocarbons	Phillips et al., 1996; Nojima et al., 2007
2	Pulse beetle <i>Callosobruchus chinensis</i>	7-ethyl-3, 11-dimethyl-2Z,6E, 10-dodecantriene (VII) 7-ethyl-3,7-dimethyl-2E,6E, 10-dodecantriene (VIII)	3,7-dimethyl-2E-octene-1,8-dioic acid (erectin, IX) C_{25} - C_{35} hydrocarbons	Shimomura et al., 2008; Tanaka et al., 1981
3	Graham bean weevil <i>Callosobruchus analis</i>	Insufficiently studied; (3Z)-3-methylheptenoic acid (IV) was isolated	2,6-dimethyloctane-1,8-diol (VI) и 3,7-dimethyl-2E-octene-1,8-dioic acids (callosobruchusic acid, IX)	Cork et al., 1991; Shimomura et al., 2010b
4	<i>Callosobruchus rhodesianus</i>	(3S, 6S)-7-ethyl-3, 11-dimethyl-6,10-dodecandienal (X)	n/a	Shimomura et al., 2010a
5	<i>Callosobruchus subinnotatus</i>	(2Z) 3-methylheptenoic (IV), (2E) 3-methylheptenoic (V) acids	n/a	Shu et al., 1999

Notes: no (information) available

Table 2. Comparison of Attractiveness at Various Pheromone Concentrations Using Non-Parametric Multivariate Analysis of Variance

Pheromone concentrations	F				
	0,25	0,5	1	2	control
0,25		1,027	0,06119	10,68	2,24
0,5	0,3202		0,4997	13,34*	7,848**
1	1	0,5669		5,841	2,23
2	0,3375	0,0367*	0,3255		1,612
control	0,0928	0,0023**	0,0983	0,1425	

Note: the upper part of the table represents the F criterion; the lower part represents p-level. Statistically relevant values are marked with an asterisk (*) at $p < 0.05$, (**) at $p < 0.01$



Рис. 10. Выявление крыльев самцом четырехмятной зерновки

Fig. 10. Cowpea beetle males pulling out the wings

revealed the species-specificity of the latter [13]. It should be noted that *C. analis* and *C. subinnotatus* showed little or no response to the *C. maculatus* pheromone [10].

The sensitivity of males to low concentrations of pheromones was determined using electroantennography [22]. (2Z)-3-methylheptenoic acid produced a response (0.8 mV) at the lowest concentration of 10 ng while (Z)-3-methyl-3-heptenoic acid produced a response (0.7 mV) at 5 ng.

It should be noted that the males of the cowpea beetle as those of *C. chinensis* may attempt to mate both with females of their own species and adults of closely-related species irrelevant of their sexual identity. Moreover, cases of mating with dead individuals of the same species were observed [21]. Such "promiscuity" of *C. maculatus* males should be taken into account as a marker of a positive reaction when studying behavioral responses to pheromones.

Laboratory testing of a synthetic pheromone

Methods. Laboratory testing was performed using three-day old males in active flight stage obtained from the cowpea beetle laboratory population from Tajikistan. These were reared in glass containers (0.5 L) filled by one third with bean mixture: mung bean, pease and chickpea, and placed in a thermostat at a constant temperature of 30-31 °C with no light.

The beetles of the same age were selected in the following way: the laboratory cultures of the cowpea beetle were completely cleared from the adult insects by sieving the bean mixture; and, on the following day, the emerged insects

were collected with an exhauster. Each individual was placed in a separate 1.5-2 ml Eppendorf plastic tube with a lid. The sexual identity of the live cowpea beetles was identified based on the following characteristics: the length of the body (visually) and antennal segments, the color of the body and intensity of the forewing patterns. After two days of maintaining in the thermostat at 23-25 °C males were used for pheromones testing on the third day.

The study was performed on an improvised single-choice olfactometer. This was made of a base maintaining a constant temperature (a paraffin sectioning tray). A 23-centimeter filter paper disc was placed on the base. At the center of the filter paper, a stimulus, i.e. a pheromone dispenser (Technical Specifications 2449-018-04731278-2011), was set. The dispenser was made of a rubber plug (52-599/3rubber) with the pheromone applied to it. The filter paper was then covered with a 4 liter glass cap.

The synthetic pheromone is a compound containing five acids (with a general formula $C_8H_{14}O_2$): (3Z)-3-methylheptenoic, (3E)-3-methylheptenoic, (2Z)-3-methylheptenoic, (2E)-3-methylheptenoic, and 3-methylheptanoic acids.

At FGBU VNIKR, we developed a synthesis method for the five components of the cowpea beetle sex pheromone based on the Reformatsky reaction. The reaction is not stereoselective, i.e.

it does enable dividing the pheromone into components. Therefore, in this study we used a purified mixture of the components at the obtained rates.

The tubes with the cowpea males were removed from the thermostat 2-3 hours prior to testing. The attractiveness was tested at various concentrations of the pheromone (test variations), i.e. 0.25 µg, 0.5 µg and 2µg. Hexane was used as a control. The testing of each concentration was repeated 3 to 6 times. In each testing, ten males were used.

The males were placed on the edge of the disk, and the glass cap was slightly raised. Each observation period of the male responses lasted 20 minutes (Fig. 7). The behavioral characteristics and contact with the stimulus were registered. Pheromone attractiveness was determined as a ratio of the contacting males to their total number. Males that had contacted the stimulus were immediately removed from the olfactometer. Upon the completion of each observation period, males were desiccated to ascertain their sexual identity.

Statistical analysis of the obtained data was performed using non-parametric multivariate analysis of variance, i.e. dispersive analysis for detection of differences among the test variations.

Fig. 11. A Cowpea beetle male coming into contact with the stimulus (dispenser with the pheromone on it)



Рис. 11. Контакт самца четырехмятной зерновки со стимулом (диспенсером с феромоном)



Рис. 12. Контакт самца четырехмятной зерновки со стимулом (диспенсером с феромоном)

Fig. 12. Two cowpea beetle males attempting to copulate under the influence of the pheromone

Results. The testing revealed the major behavioral responses in males of the cowpea beetle to the synthetic pheromone. These were freezing and raising the front part of the body (Fig. 8), as well as rubbing of hind legs against the abdomen while pulling the wings out (Fig. 9, 10).

The pheromone urges the males to come into contact with the stimulus (Fig. 11). The males attempted to copulate with other insects independent of whether or not the males had contacted the dispenser (Fig. 12, 13). This phenomenon has been described in literary sources. It has been particularly noted that the males attempt to mate with other insects irrelevant of their sex, species or physical condition [19].

The concentration – attractiveness study of the pheromone of the cowpea beetle showed that the greatest number of males was attracted by the sex attractant at 0.5 µg (86%), while the lowest number was observed at 2 µg (30%). For reference, the range of hexane attractiveness (control) varied from 0 to 20%.

The comparison of the mean attractiveness values of the pheromone demonstrated high levels of the pheromone attractiveness at the concentrations from 0.25 to 1µg (Fig. 14). At 0.5 µg, the pheromone is 1.9

times more attractive than at 2 µg. This phenomenon may be explained as follows: high pheromone concentrations cause decreased activity in males due to hyperarousal of the nervous system.

The attractiveness of the control is 8% which is significantly lower than that of all the tested concentrations. It should be noted that the contact responses in males to the dispenser with no pheromone or hexane was not observed.

The statistical analysis of the data conducted using nonparametric dispersive analysis (Fig. 2), confirmed the detected differences between the pheromone attractiveness at 0.5 µg and 2µg, as well as between the pheromone attractiveness (at 0.5 µg) and that of the control. However, there were no significant differences in the male responses registered at 0.25, 0.5 and 1µg, although the preference of 0.5 µg pheromone dose was observed.

Conclusion

The attracting sex pheromone of the cowpea beetle is a species-specific compound consisting of the monocarboxylic acids. According to literary sources all five acids that make up the *C. maculatus* attractant have an aggregate attractiveness comparable to that of the extract of the female pheromone glands. The beetles demonstrate high sensitivity to low pheromone concentrations.

The results of the testing performed using the original method allowed us

to conclude that the pheromone of the cowpea beetle synthesized at FGBU VNIKR has bioactive properties and attracting qualities for males of this species.

The pheromone dose effective for attracting males was identified under laboratory conditions, i.e. 0.5 µg. Concentrations of 2µg and more did not cause neither male's contact with the stimulus nor their increased activity.

References

1. Sergei A. Dankvert, Mikhail I. Maslov, Ullubiy Sh. Magomedov, Yakov B. Mordkovich (2009). Pests of Quarantine Concern for the Russian Federation// Nauchnaya Kniga, Voronezh. 449 p.
2. F. K. Lukianovich, M. E. Ter-Minasyan. Cowpea beetles (Bruchidae) (1957)// The USSR Fauna. Coleoptera. V. 24. Issue I. 209 p.
3. List of Plant Pests, Causative Agents and Weeds of Quarantine Concern for the Russian Federation. Annex to Order № 673 of the Russian Ministry of Agriculture, December 26, 2007.
4. E. R. Sledzevskaya. Provisional Recommendations for Detection and Control of Cowpea Beetles//State Plant Quarantine Inspection. USSR State Agro-industrial Committee, Moscow, 1989. 7 p.
5. Babu A., Hern A., Dorn S. (2003) Sources of semiochemicals mediating hostfinding in *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae) // Bulletin of Entomological Research. V. 93. P. 187-192.



Рис. 13. Попытка копуляции между тремя самцами четырехпятнистой зерновки под воздействием феромона

Fig. 13. Three cowpea beetle males attempting to copulate under the influence of the pheromone

6. Caswell G.H. (1960) Observations on an abnormal form of *Callosobruchus maculatus* (F.) // Bulletin of Entomological Research. V. 50. P. 671-680.

7. Cork A., Hall D.R., Blaney W.M., Simmonds M.S.J. (1991) Identification of a component of the female sex pheromone of *Callosobruchus analis* (Coleoptera: Bruchidae) // Tetrahedron Lett. V. 32. P. 129-132.

8. Fox C.W., Bush M.L., Wallin W.G. Maternal age affects offspring lifespan of the seed beetle, *Callosobruchus maculatus* // Functional Ecology. 2003. V. 17. P. 811-820.

9. Fox C.W., Bush M.L., Roff D.A., Wallin W.G. (2004) Evolutionary genetics of lifespan and mortality rates in two populations of the seed beetle, *Callosobruchus maculatus* // Heredity. P. 92. P. 170-181.

10. Mbata G.N., Shu S., Ramaswamy S.B. (2000) Sex pheromones of *Callosobruchus subinnotatus* and *C. maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): congeneric responses and role of air movement // Bulletin of Entomological Research. V. 90. P. 147-154.

11. Nojima S., Shimomura K., Honda H., Yamamoto I., Ohsawa K. (2007) Contact Sex Pheromone Components of the Cowpea Weevil, *Callosobruchus maculatus* // J. Chem. Ecol. V. 33. P. 923-933.

12. Ndiaye A., Gauthier P., Sembene M. (2011) Genetic discrimination of two cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Bruchid (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae): *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Bruchidius atrolineatus* (Pic.) // International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences. V. 1. № 2. P. 196-201.

13. Phillips T., Phillips J., Webster F., Tang R., Burkholder W. (1996) Identification of sex pheromones from cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*, and related studies with *C. analis* (Coleoptera: Bruchidae) // Journal of Chemical Ecology. V. 22. № 12. P. 2233-2249.

14. Pierre D., Biimont J.-C., Pouzat J., Lextrait P., Thibeaudeau C. (1997) Location and ultrastructure of sex pheromone glands in female *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) // J. Insect. Morphol. & Embriol. Vol. 25. № 4. P. 391-404.

15. Qi Y., Burkholder W.E. (1982) Sex pheromone biology and behavior of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) // J. Chem. Ecol. V. 8. P. 527-534.

16. Rup R. (1988) Antenna and antennal sensilla dimorphism in *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) // J. stored Prod. Res. Vol. 24. № 2. P. 83-86.

17. Sano I. (1967) Density effect and environmental temperature as the factors producing the active form of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera, Bruchidae) // J. Stored Prod. Res. Vol. 2. P. 187-195.

18. Shimomura K., Nojima S., Yajima S., Ohsawa K. (2008) Homofarnesals: Female sex attractant pheromone components of the southern cowpea weevil, *Callosobruchus chinensis* // J. Chem. Ecol. V. 34. № 4. P. 467-477.

19. Shimomura K., Koshino H., Yajima A., Matsumoto N., Kagohara Y., Kamada K., Yajima S., Ohsawa K. (2010a) 2,3-Dihydrohomofarnesal: female sex attractant pheromone component of *Callosobruchus rhodesianus* (Pic.) // J. Chem. Ecol. V. 36. № 8. P. 824-833.

20. Shimomura K., Akasaka K., Yajima A., Mimura T., Yajima S., Ohsawa

Рис. 14. Аттрактивность разных концентраций феромона для самцов четырехпятнистой зерновки (среднее и стандартная ошибка)

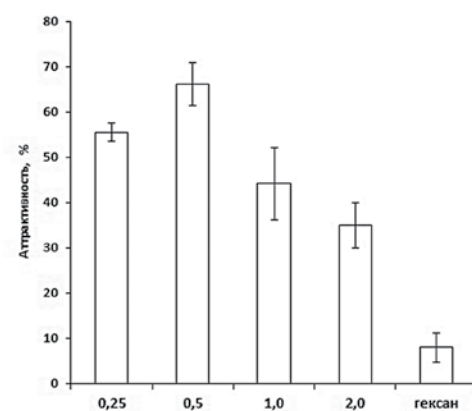


Fig. 14. Attractiveness of the pheromone at various concentrations for the cowpea beetle males (mean value and standard error)

K. (2010b) Contact sex pheromone components of the seed beetle, *Callosobruchus analis* (F.) // J. Chem. Ecol. V. 36. № 9. P. 955-965.

21. Shimomura K., Mimura T., Ishikawa S., Yajima S., Ohsawa K. (2010c) Variation in mate recognition specificities among four *Callosobruchus* seed beetles // Entomologia Experimentalis et Applicata. V. 135. P. 315-322.

22. Shu S., Koepnick W.L., Mbata G.N., Cork A., Ramaswamy S.B. (1996) Sex pheromone production in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae): electroantennographic and behavioral responses // J. Stored Prod. Res. V. 32. P. 21-30.

23. Shu S., Mbata G.N., Cork A., Ramaswamy S.B. (1999) The chemistry of the sex pheromone of *Callosobruchus subinnotatus* // J. Chem. Ecol. V. 25. № 12. P. 2715-2727.

24. Stillwell R.C., Fox C.W. (2007) Environmental effects on sexual size dimorphism of a seed-feeding beetle // Oecologia. V. 153. P. 273-280.

25. Suzuki Y. (2006) Evolution of Reaction Norm of Reproductive Diapause in *Callosobruchus maculatus*. Dissertation. University of Tsukuba, 92 p.

26. Tanaka K., Ohsawa K., Honda H., Yamamoto I. (1981) Copulation release pheromone, erectin, from the azuki bean weevil (*Callosobruchus chinensis* L.) // J. Pesticide Science. V. 6. P. 75-82.

27. Utida S. (1954) Phase dimorphism in the laboratory population of *Callosobruchus quadrimaculatus* // Oyo Dobutsugaku Zasshi, 18, P. 161-168.

28. Verma K.K. (2007) Polyphenism in insects and the juvenile hormone // J. Biosci. V. 32. № 2. P. 415-420.

СТРОЕНИЕ СЕМЯН ПАСЛЕНА КОЛЮЧЕГО *SOLANUM ROSTRATUM* DUN. И БЛИЗКИХ ЕМУ ВИДОВ СЕКЦИИ *ANDROCERAS* (NUTT.) MARZELL

Е.М. Волкова, заведующая лабораторией ФГБУ «ВНИИКР»

Секция *Androceras* включает 12 видов, большинство из них однолетние травы. Морфологически эта группа выделяется среди других групп рода *Solanum* неравными пыльниками, слабо зигоморфными цветками и строением плода, так называемой сухой ягоды [5, 6]. Сухая ягода окружена разрастающейся колючей чашечкой и в зрелости растрескивается, семена разбрасываются или постепенно высыпываются [7].

Большинство видов секции произрастает в Мексике и на Юго-Западе США. Он является ядовитым колючим растением и значительно ухудшает качество кормов. Наряду с картофелем, сорняк служит кормом для колорадского жука и картофельной моли, на нем также могут развиваться болезни картофеля и томатов [2, 3, 4].

Паслен колючий имеет широкое распространение, встречается на всех континентах, в России включен в Перечень карантинных объектов, как ограниченно распространенный вредный организм. Сорняк угнетает посевы люцерны, бахчевых и пропашных культур.

Секция *Androceras* делится на три серии [7]. Мы исследовали семена представителей всех трех серий: *Solanum rostratum* Dun. (серия *Androcera*); *Solanum grayi* Rose (серия *Pacificum*), *Solanum citrullifolium* A.Br. (серия *Violaceiflorum*).

Семена средних размеров (таблица), темно-коричневые или черные; слабо

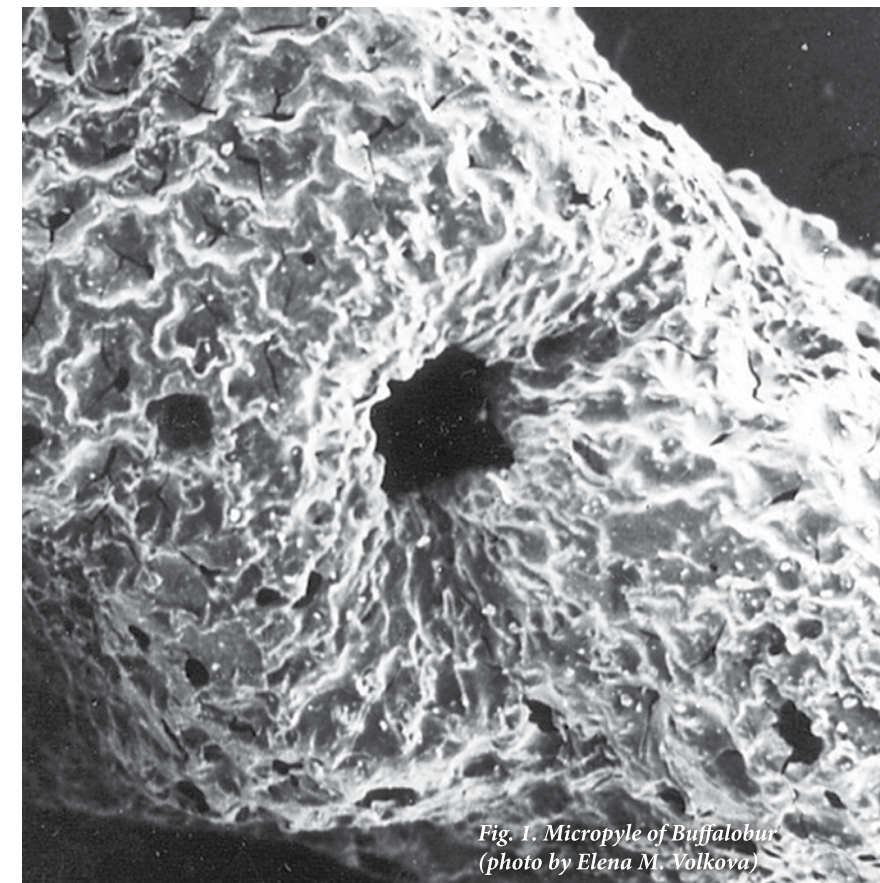


Fig. 1. Micropyle of *Buffalobur* (photo by Elena M. Volkova)

сплюснутые с боков; трех- или четырехугольные в поперечном сечении; в боковой проекции округлые, овальные, почковидные, иногда основание вытянуто в тупой носик. Микропиле округлое (рис. 1).

Семена паслена колючего (рис. 2) округло-сдавленные. В боковой проекции край семени слегка волни-

Рис. 1. Микропиле паслена колючего (фото Е.М. Волковой)

стый. В основании округлый выступ. Семенной рубчик глубоко вдавленный. Поверхность бугорчато-волнистая, глубоко-ячеистая, матовая. Окраска серовато-черная, темно-коричневая [7].

Параметры семян

Вид	Размеры семени (мм)		
	длина	ширина	толщина
<i>S. rostratum</i>	2,7±0,3	2,0±0,2	1,0±0,2
<i>S. grayi</i>	2,9±0,3	2,5±0,2	1,0±0,2
<i>S. citrullifolium</i>	2,2±0,2	1,8±0,3	0,9±0,2



Рис. 2. Семя паслена колючего (фото Е.М. Волковой)

Семена *Solanum grayi* (рис. 3) имеют характерные крупно-извилистые очертания в боковой проекции за счет складчато-морщинистой структуры поверхности ребра семени. В основании большой выступ. Семенной рубчик вдавленный. Поверхность скалдчато-ребристая, сетчатая. Окраска коричневая.

Семена *S. citrullifolium* (рис. 4) округло-почковидные, сдавленные с боков. В основании небольшой округлый выступ. Рубчик слегка вдавленный. Поверхность морщинистая, мелкоячеистая. Окраска семян черная.

Семенная кожура пасленов секции *Androcera* состоит из двух слоев клеток: экзотесты и эндотесты. У паслена колючего клетки экзотесты в продольном сечении имеют слабо-извилистые очертания (рис. 5), тогда как в двух других сериях очертания клеток экзотесты извилистые, извилины глубоко заходят внутрь клеток (рис. 6, 7).

Внутренние и нижние части боковых стенок клеток экзотесты равномерно утолщены. Верхние части боковых стенок несут утолщения в виде толстых длинных столбиков, участки стенок между столбиками при смачивании ослизняются. Наружные стенки клеток экзотесты не утолщены и легко ослизняются. У паслена колючего внутренняя поверхность клеток экзотесты покрыта мелкими волоскоподобными выростами утолщений, наблюдаемыми только при исследовании ультраструктуры семени (рис. 8). Утолщенные стенки клеток содержат дубильные вещества, окрашивающие их в темно-коричневый цвет.

Рис. 3. Семя *S. grayi* (фото Е.М. Волковой)

У *S. citrullifolium* клетки экзотесты отличаются более короткими и тонкими столбиками утолщений в верхней части боковых стенок, а также отсутствием волосковидных выростов утолщений на внутренней поверхности клеток экзотесты.

S. grayi также не имеет волосковидных выростов утолщений на внутренней поверхности клеток экзотесты, а столбики утолщений в верхних частях боковых стенок практически отсутствуют. Кроме того, равномерно утолщенные внутренние и боковые стенки клеток экзотесты лигнифицированы и содержат очень мало дубильных веществ.

При экспертизе образцов подкарантинной продукции на сорные растения необходимо учитывать сходство внешних морфологических признаков семян паслена колючего не только с близкими видами пасленов, но и с другими представителями семейства *Solanaceae*. В частности, в подкарантинном материале часто встречаются семена дурмана вонючего *Datura stramonium* L., которые можно отличить от семян паслена колючего по размеру, очертанию боковой проекции семени, строению рубчика и структуре поверхности семенной кожуры.

Семена дурмана вонючего сдавленные, почковидные, на спинке округ-



Рис. 4. Семя *S. citrullifolium* (фото Е.М. Волковой)

лые, на брюшной стороне слабовогнутые (рис. 9). Семенной рубчик треугольной формы. Поверхность семенной кожуры слегка волнистая, ячеистая (ячейки неглубокие), матовая. Окраска черная, черно-бурая. Семенной рубчик серовато-желтый. Длина 3-3,5 мм, ширина 2,5-3 мм, толщина 1,5-2 мм.

Аннотация

В статье дано описание внешних морфологических признаков семян и ультраструктуры семенной кожуры карантинного вида паслена колючего *Solanum rostratum* Dun. и близких ему видов рода *Solanum*, секции *Androcera*, также приведено сравнительное описание внешней морфологии семян дурмана вонючего *Datura stramonium* Dun., как вида, часто встречающегося в подкарантинной продукции и имеющего сходные с пасленом колючим признаки строения семян.

Литература

1. Волкова Е.М. и др. Атлас плодов и семян сорных и ядовитых растений, засоряющих подкарантинную продукцию. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. 301 с.
2. Котт С.А. Выявление и уничтожение заносных сорняков. М.: Изд. Наркомзем СССР, 1946. 32 с.
3. Никитин В.В. Сорные растения флоры СССР. Л.: Наука, 1983. 451 с.
4. Фисюнов А.В. Сорные растения и борьба с ними. М.: Знание, 1973. 64 с.
5. Ridley H.N. (1930) The dispersal of plants throughout the world. Ashford Reeve.
6. Van der Pijl L. (1972) Principles of dispersal in higher plants. New York – Heidelberg – Berlin.
7. Whalen M.D. (1979) Taxonomy of *Solanum* section *Androcera*. Gentes Herbarium. № 11, p. 359-426.

SEED STRUCTURE OF BUFFALOBUR *SOLANUM ROSTRATUM* DUN. AND ITS RELATED SPECIES IN SECTION *ANDROCERAS* (NUTT.) MARZELL

Elena M. Volkova, Head of FGBU VNIKR's Laboratory

Section *Androcera* is a group of 12 species. The majority of the species are annual grasses. *Androcera* is differentiated from other *Solanum* groups by unequal anthers, slightly zygomorphic flowers and fruit structure, the so-called dry berry [5,6]. The dry berry is enclosed within the expanding thorny calyx tube. At maturity, the dry berry ruptures and the seeds are gradually released into the calyx tube or shaken out [7].

Most of the *Androcera* species grow in Mexico and the Southwest US. This pest affects lucerne, cucurbits and tilled crops. The Buffalobur is a noxious thorn weed which significantly distorts fodder quality. Along with potato, the weed serves as a host for the Colorado beetle and the potato tuber moth. Other potato and tomato diseases can also develop on it [2, 3, 4].

Section *Androcera* is divided into three series [7]. We performed studies on seeds of all the three series, i.e. *Solanum rostratum* Dun. (series *Androcera*), *Solanum grayi* Rose (series *Pacificum*), *Solanum citrullifolium* A.Br. (series *Violaceiflorum*).

Seeds are of medium size (Table), dark brown or black with slightly flattened edges, triangular or quadrangular in cross-section; in lateral view – round, oval, reniform, sometimes prolated at the

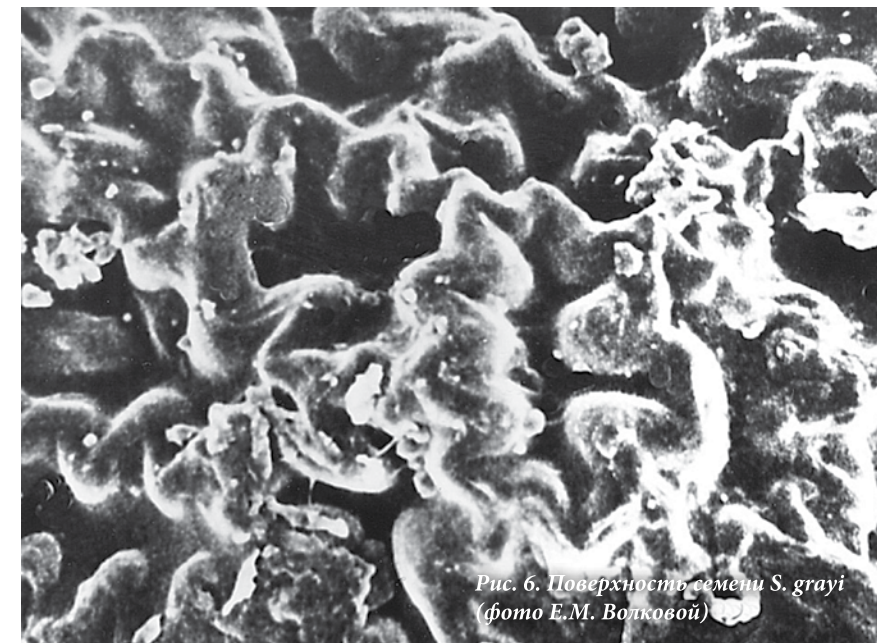


Рис. 6. Поверхность семени *S. grayi* (фото Е.М. Волковой)

The seed of *Solanum grayi* (Fig. 3) is brown. Due to the wrinkled structure of its edge, the seed has a typical wavy appearance in lateral view. There is a large protrudence at the base. The surface is faveolate and wrinkly.

Fig. 6. Surface of a *S. grayi* seed (photo by Elena M. Volkova)

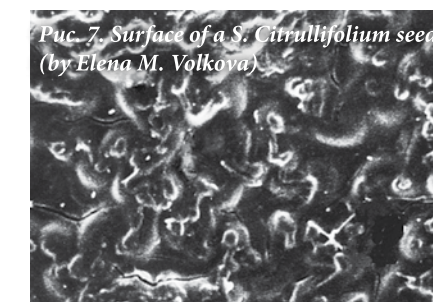


Рис. 7. Поверхность семени *S. Citrullifolium* (фото Е.М. Волковой)

The seed of *S. citrullifolium* (Fig. 4) is black, round and reniform, flattened at the edges, with a small round protrudence at the base. The surface is finely faveolate and wrinkly.

The Buffalobur, *Solanum rostratum* Dun., is widely distributed and occurs on all continents. In Russia, it is on the List of Quarantine Pests as a quarantine pest of limited distribution.

base forming a blunt tip. The micropyle is round (Fig. 1).

Buffalobur seeds (Fig. 2) are grayish-black to dark-brown, elongated, compressed. In lateral view, the seed edge is slightly undulating; the base is with a round protrudence; the raphe is deeply sunken; the surface is matted, lumpy, undulating, and markedly faveolate [7].

Seed measurements

Species	Seed size (mm)		
	Length	Width	Thickness
<i>S. rostratum</i>	2,7±0,3	2,0±0,2	1,0±0,2
<i>S. grayi</i>	2,9±0,3	2,5±0,2	1,0±0,2
<i>S. citrullifolium</i>	2,2±0,2	1,8±0,3	0,9±0,2

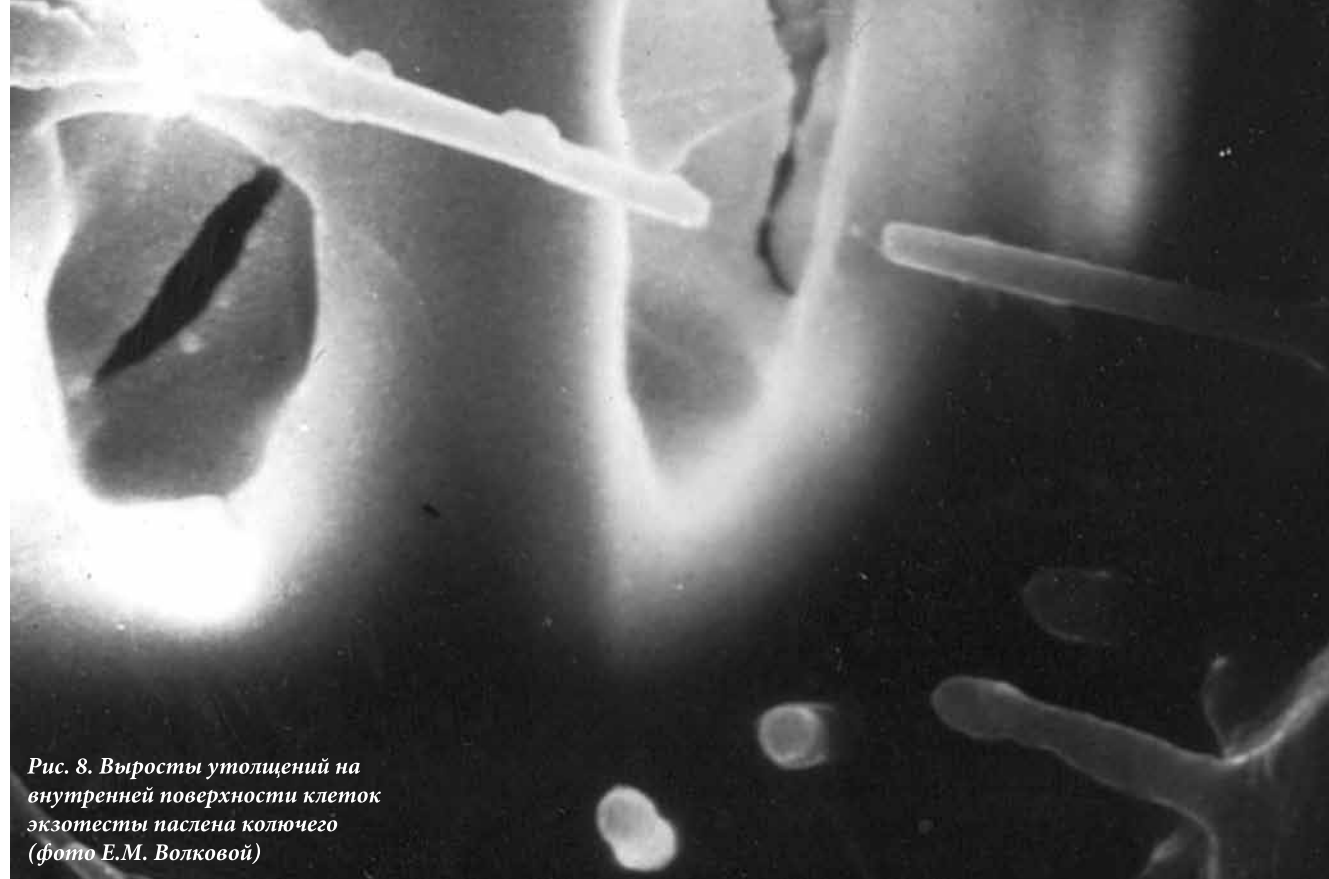


Рис. 8. Выросты утолщений на внутренней поверхности клеток экзотесты паслена колючего (фото Е.М. Волковой)

Fig. 8. Protuberences on the inner surface of the Buffalobur exotesta (photo by Elena M. Volkova)

The testa of Section Androceras is made of two cell layers, i.e. the exotesta and endotesta. In longitudinal section, the cells of the Buffalobur exotesta have a slightly wavy contour (Fig. 5) while those of the other two series have a wavy outline with wrinkles deeply sunken into the cells (Fig. 6, 7).

The inner and lower parts of the cell sidewalls are evenly thickened. The thickening of the lower parts resembles long thick columns with the in-between sites slimming when wetted. The outer walls of the exotesta cells are not thickened and easily slime. The inner surface of the exotesta cells in the Buffalobur are

Fig. 9. Jimsonweed seeds (photo by Elena M. Volkova)

Рис. 9. Семена дурмана вонючего (фото Е.М. Волковой)



covered with tiny hair-like protuberences detectable only by examining the ultrastructure of the seed (Fig. 8). The tannins in the thickened sidewalls of the cells make them dark-brown.

The cells of *S. citrullifolium* exotesta are characterized by shorter and finer columns on the upper part of the cell sidewalls as well as by the absence of hair-like protuberences on the inner surface of the exotesta cells.

The absence of hair-like protuberences on the inner surface of the exotesta cells is also observed in *S. grayi*, along with the virtual absence of columns on the upper part of the cell sidewalls. Moreover, evenly thickened inner walls and sidewalls of the exotesta cells are lignified and contain a very small amount of tannins.

When testing regulated articles for the presence of weeds, it is very important to take into account morphological similarities of the Buffalobur seeds both with seeds of closely related species and, also, with those of other Solanaceae species. Particularly, the Jimsonweed, *Datura stramonium* L., is often intercepted in regulated articles. The seeds of this weed can be differentiated from those of the Buffalobur by their size, contour in lateral view, as well as the structure of their raphe and the surface of the testa.

The seeds of the Jimsonweed are 3-3.5 mm in length, 1.5-2 mm in thickness, black to blackish brown, compressed, reniform, with oval dorsal side and somewhat concave ventral side (Fig. 9). The raphe is triangular. The surface of

the testa is slightly wavy, faveolate (not deeply), matted.

Abstract

The article describes external morphological characteristics of seeds and testa ultrastructure in *Buffalobur*, *Solanum rostratum* Dun., and closely related species of the genus *Solanum*, Section *Androceras*. It also presents a comparative description of external morphological characteristics of the Jimsonweed, *Datura stramonium* L., often intercepted in regulated articles, the seed structure of which is similar to that of the *Buffalobur*.

References

1. Volkova E.M. et al. Atlas of fruits and seeds of weeds and noxious plants contaminating regulated articles. Moscow: Partnership of Scientific Publications KMK, 2007. 301 pp.
2. Kott S.A. Detection and eradication of invasive weeds. Moscow: Publishing house of the USSR People's Commissariat for Agriculture, 1946. 32 pp.
3. Nikitin V.V. Weeds of the USSR flora. Leningrad: Nauka, 1983. 451 pp.
4. Fisyunov A.V. Weeds and their control. Moscow: Znanie, 1973. 64 pp.
5. Ridley H.N. (1930) The dispersal of plants throughout the world. Ashford Reeve.
6. Van der Pijl L. (1972) Principles of dispersal in higher plants. New York – Heidelberg – Berlin.
7. Whalen M.D. (1979) Taxonomy of *Solanum* section *Androceras*. Gentes Herbarium. № 11, p. 359-426.

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ ОЖОГ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР

В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН

Н.В. Дренова, заведующая лабораторией бактериологии ФГБУ «ВНИИКР»

М.М. Исин, А.А. Джаймурзина, Г.А. Жармухамедова – специалисты

ТОО «Казахский НИИ защиты и карантин растений»

А.К. Айткулов, директор ГУ «Республиканская карантинная лаборатория» (РК)

«SOS! Можем остаться без яблок» – так была озаглавлена статья в казахстанской республиканской газете «Караган» от 22 июля 2012 года. Дело в том, что в последние годы садоводы столкнулись с неизвестным им заболеванием плодовых деревьев, первые проявления которого были отмечены

По оценкам ученых Казахского НИИ защиты и карантин растений (КазНИИЗиКР), в отдельных крестьянско-фермерских хозяйствах доля пораженных деревьев в яблоневых садах доходила до 50-60% и более с высокой степенью развития симптомов, на груше поражаемость в большинстве случаев была еще выше.



Fig. 1. Apple tree (Golden Delicious variety) infested with the bacterial fire blight. Koktyube rural district of Almaty Province (photo by B. Kopzhussarov)

в 2008 году, а к 2010 году оно стало наносить существенный урон яблоневым и грушевым садам в нескольких районах Алматинской плодовой зоны. Заболевание проявилось в почернении и увядании цветков, которые долгое время не опадали; побурении и скручивании побегов («пастуший посох») и листьев (рис. 1, 2); появлении на плодах красноватых пятен; выделении на поверхности плодов и коре пораженных ветвей и стволов капель молочно-белого или янтарно-желтого бактериального экссудата (рис. 3,4).

Эти симптомы характерны для опаснейшего карантинного заболевания семечковых и некоторых ко-

сточковых плодовых, декоративных и дикорастущих представителей сем. Розоцветные (Rosaceae) – бактериального ожога плодовых культур, вызываемого энтеробактерией *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. Ранее данное заболевание на территории Республики Казахстан отсутствовало. Однако согласно выданным импортным карантинным разрешениям начиная с 2003 года в республику поступает посадочный материал косточковых и семечковых плодовых и декоративных культур из Германии, Бельгии, Польши, Франции, Нидерландов, Италии, США и других стран, где имеются

Рис. 1. Дерево яблони (сорт Золотое превосходное (Golden Delicious), пораженное бактериальным ожогом. Коктыубинский с/о Алматинской области (фото Б. Копжасарова)

очаги бактериального ожога. В связи с этим не исключается возможность проникновения возбудителя на территорию республики с импортным посадочным материалом. С другой стороны, необходимо отметить, что бактериальный ожог также был выявлен в сопредельных областях Кыргызской Республики. По сообщению Министерства сельского хозяйства и мелиорации



Fig. 2. "Shepherd's crook"
(photo by B. Kopzhasarov)

республики, ожог плодовых появился на территории Кыргызстана (Чуйская область) предположительно в 2008-2009 гг. Очаги болезни в виде отдельных деревьев и участков имеются во всех районах области. В 2011 г. болезнь проникла

годах XX века и поражало исключительно грушу в возрасте до 5 лет. В связи с отсутствием новых производственных посадок этой культуры с 90-х годов и до последнего времени проблема бактериального некроза в республике отпала. Бактерии рода

Рис. 2. «Пастуший посох»
(фото Б. Копжасарова)

фермеров по поводу поражения яблонь и груш. В ходе обследований был проведен тщательный анализ симптомов болезни и отобраны образцы пораженных органов деревьев (завязь, листья, плоды, побеги, ветви, кора).

В результате бактериологического анализа отобранных образцов, проведенного в отделе защиты плодово-овощных культур КазНИИЗиКР, было выделено 230 изолятов бактерий, которые по морфологическим и культуральным признакам были схожи с *P. syringae* и *E. amylovora*. Изоляцию возбудителей бактериозов проводили на картофельном агаре [2]. Следует отметить, что в большинстве случаев из растительных образцов оба вида выделялись одновременно. Данный факт, по мнению специалистов, способствовал увеличению вредоносности заболевания.

Проверка патогенности изолированных бактерий по реакции свечечувствительности инфекционно-инfiltrационным методом

Выявлены очаги в Иссык-Кульском районе (5,8 га), Аксуйском (8 га), Тонском (5,3 га), Тюпском (5,3 га), Джеты-Огузском (0,1 га) районах, городах Балыкчы/Балыкчи (0,4 га) и Каракол (0,1 га).

в Иссык-Кульскую область. Площадь заражения по Чуйской области составила 130 га, по Иссык-Кульской области – 25 га [4] (рис. 5). В настоящий момент вопрос о связи очагов бактериального ожога в Республике Казахстан и Кыргызской Республике остается открытым.

Следует отметить, что большинство симптомов, наблюдаемых в пораженных садах, характерно также для другого заболевания плодовых – бактериального некроза, вызываемого *Pseudomonas syringae* van Hall. Данное заболевание было распространено в садах Алматинской (ранее Алма-Атинской) области в 80-х

Pseudomonas выделялись крайне редко и только из косточковых культур [1]. По этой причине против возбудителя некроза не проводились защитные мероприятия в садах, что могло послужить накоплению инфекции и появлению более агрессивных штаммов патогена, которые могли вызвать эпифитотию.

Учитывая важность проблемы, сотрудниками КазНИИЗиКР в 2011 году были проведены обследования ряда хозяйств в Енбекшиказахском районе Алматинской области и Меркентском районе Жамбылской (ранее Джамбульской) области, откуда поступили обращения обеспокоенных



Fig. 3, 4. Mummification of fruitlets, oozing of bacterial exudates
(photo by B. Kopzhasarov)

Клемента на индикаторном растении – комнатной герани (*Pelargonium zonale* L'Hér) показала, что изоляты, схожие с *P. syringae*, через 12 часов вызвали некроз тканей листа в месте введения патогена, а изоляты, схожие с *E. amylovora*, вызывали на листьях хлороз с некрозом ткани (рис. 6).

При заражении незрелых плодов груши, изоляты, схожие с *P. syringae*, вызывали некроз тканей в местах введения инокулюма, а изоляты, схожие с *E. amylovora*, вызывали некроз тканей с выделением бактериального экссудата (рис. 7), что является одним из диагностических признаков бактериального ожога. Аналогичные различия симптомов на плодах груши наблюдались и при естественном заражении в садах.

Таким образом, изоляты, отнесенные специалистами КазНИИЗиКР к *E. amylovora*, были выделены из образцов груши сорта Талгарская красавица, 2005 года посадки, яблони сортов Апорт (1992 г.), Старкримсон (2004 г.), Золотое превосходное (2004 г.), отобранных в крестьян-

ских хозяйствах Енбекшиказахского района Алматинской области. Зараженные сады были заложены в том числе импортным посадочным материалом.

Учитывая сложность точной идентификации ожога плодовых культур классическими микробиологическими методами, а также карантинный статус заболевания, предписывающий принятие жестких мер борьбы, сотрудники КазНИИЗиКР оповестили службу карантина растений республики о подозрении на выявление карантинного заболевания и дали рекомендацию провести подтверждение в ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), располагающем современной диагностической базой и имеющем многолетний опыт идентификации ожога плодовых культур, распространенного в отдельных регионах Российской Федерации.

Согласно достигнутой договоренности между ГУ «Республиканская карантинная лаборатория» (РКЛ) и ФГБУ «ВНИИКР» в течение мая

Рис. 3, 4. Мумификация незрелых плодов, выделение бактериального экссудата (фото Б. Копжасарова)

2012 г. в отдел диагностики последнего были доставлены 6 образцов ветвей и коры яблони и груши, отобранных в крестьянских хозяйствах Коктюбинского, Маловодненского и Байтерекского сельских округов Енбекшиказахского района Алматинской области. В ходе визуального осмотра образцов было отмечено наличие симптомов, характерных для ожога плодовых культур: некроз цветков, листьев, характерная «мраморность» на срезе коры, клиновидные язвы на коре. Часть образцов была отобрана с деревьев, обработанных медьсодержащими препаратами.

Бактериологическая экспертиза образцов проводилась согласно СТО ВНИИКР 4.001–2009 [3]. Экстракты, выделенные из растительного материала, были протестированы методами иммунофлуоресцентного (ИФ) и иммуноферментного (ИФА) анализов с тест-наборами

Результаты анализа образцов вегетативных частей яблони и груши из трех сельских округов Енбекшиказахского района Алматинской области

Описание образца	Место сбора	ИФ	ИФА	FLASH-ПЦР	Изоляция	ИФ	FLASH-ПЦР	Секвенирование	API 20 E	Тест Уайта
Ветви груши	Коктюбинский с/о	+	+	+	-					
Ветви груши	-//-	+	+	+	-					
Ветви яблони (обработаны)	-//-	-	-	-	-					
Кора груши (сухая)	-//-	-	-	+	-					
Ветви яблони	Байтерекский с/о	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ветви яблони	Маловодненский с/о	+	+	+	+	+	+	+	+	+

производства компании «LOEWE» (Германия) и методом FLASH-ПЦР с тест-наборами производства компании ООО «Агродиагностика» (Россия). Изоляция культуры патогена из экстрактов образцов, показавших положительные результаты хотя бы одного из отборочных тестов, проводилась на левановой среде и среде Кинга Б. «Идентификация выделенных бактериальных культур была проведена с использованием ИФ-анализа, FLASH-ПЦР, биохимической идентификации на коммерческих стрипах API 20 E (Франция), а также методом прямого секвенирования гена 16S rRNA со стандартными праймерами 8UA/519B». Впоследствии изоляты также были протестированы по Уайту на незрелых плодах яблони и груши.

В результате проведенных анализов в пяти образцах вегетативных частей яблони и груши из всех представленных сельских округов был выявлен ожог плодовых культур (см. таблицу).

Из образцов ветвей груши, отобранных в Коктыбинском с/о, изоляция патогена на бактериологические среды не удалась, в сухом образце коры была выявлена ДНК возбудителя, а в образце протравленных ветвей яблони, несмотря на наличие симптомов ожога плодовых, патоген выявлен не был. Из двух образцов ветвей яблони из Байтерекского и Маловоденского с/о были выделены и идентифицированы чистые культуры *E. amylovora*, которые

Морфологические свойства штамма сохраняются и после проведения культуры через живое растение (незрелые плоды яблони), а также после 6 месяцев хранения при температуре -80 °С.

позднее были включены в бактериологическую коллекцию ФГБУ «ВНИИИКР» под номерами соответственно VNIKRFa10 и VNIKRFa11. Следует отметить, что штамм VNIKRFa11 на левановой среде образует атипичные колонии. После 48 часов инкубации при температуре 27 °С колонии округлые, суховатые, морщинистые, беловато-сероватые, плоские по краям, с приподнятым центром. После 7-9 суток в центре колонии образуется капля гладкой мукоидной бактериальной массы (рис. 8).

По факту подтверждения обнаружения на территории Алматинской области ожога плодовых культур незамедлительно было проведено аппаратное совещание у Главного государственного инспектора

по карантину растений Республики Казахстан. На заседании было принято решение о проведении в 2012-2014 гг. полномасштабного обследования всей территории республики, где возделываются семечковые плодовые культуры. В первую очередь это Алматинская, Жамбылская, Южно-Казахстанская и Кызылординская области, относящиеся к зоне промышленного садоводства, где выращиваются высококачественные южные сорта. Северо-восточные области – зона потребительского садоводства, где в сортименте преобладают сорта среднерусского, уральского и сибирского происхождения, – также являются зоной риска в отношении распространения и вредности бактериального ожога.

По результатам проведенных в 2012 г. обследований установлено очаговое распространение ожога плодовых культур в Енбекшиказахском районе Алматинской области (рис. 5).

В связи с засушливыми погодными условиями, наблюдавшимися в течение вегетационного периода 2012 г., отмечено резкое снижение вредности заболевания по сравнению с предыдущими годами. Для сдерживания и искоренения инфекции в хозяйствах применяется обрезка и удаление деревьев (рис. 9), а также обработки медьсодержащими препаратами.

18 февраля 2013 года состоялось расширенное заседание Комитета государственной инспекции в агропромышленном комплексе с участи-

ем руководителей подведомственных учреждений Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан. Было принято решение о создании в каждой области мобильных групп из числа специалистов территориальных инспекций, РКП «Казахский НИИ плодородия и виноградарства», КазНИИЗиКР, РКЛ, методического центра и представителя местного исполнительного органа. Также утвержден план действий по решению проблемы пропаганды в СМИ (телевидение, радио, журналы, газеты, Интернет), предложено проведение семинаров, всеобщей по проблеме ожога плодовых культур. Кроме того, рассмотрен вопрос о выделении денежных средств на локализацию и ликвидацию очагов бактериально-

го ожога, а также выплату компенсации сельхозпроизводителям за уничтоженные деревья. Было внесено предложение об объединении усилий Республики Казахстан, Кыргызской Республики и Республики Узбекистан по предотвращению распространения бактериального ожога в регионе, в рамках которого планируется оповещение НОКЗР республик о фактах обнаружения новых очагов, а также обмен опытом по вопросам борьбы с заболеванием.

В декабре 2012 года проект по изучению бактериального ожога, разработанный группой ученых КазНИИЗиКР, был заявлен на участие в конкурсе по фундаментальным исследованиям Министерства образования и науки Республики Казахстан. Проблемой бактериального ожога заинтересовалась Ассоциация «Казахстанский Деловой Совет АПК», куда также была представлена программа НИР по данному заболеванию для рассмотрения вопроса финансирования работы.

В связи с обнаружением на территории Республики Казахстан бактериального ожога плодовых культур остро встал вопрос об организации современной диагностической лаборатории. Принято решение о ее создании в отделе карантина КазНИИЗиКР. В настоящее время выделено помещение, разрабатывается план оптимального оснащения лаборатории, ведется подбор кадров, планируются стажировки для будущих сотрудников.

Выявление бактериального ожога в Республике Казахстан представляет огромный научный интерес для всего мирового сообщества, т.к. данная территория является одним из центров происхождения и генетического разнообразия видов р. *Malus*. В связи с этим штаммы *E. amylovora* VNIKRFa10 и VNIKRFa11 были включены в программу исследований в рамках международного проекта «PHYTFIRE» (Фитосанитарная диагностика, выявление в полевых условиях и эпидемиология ожога плодовых культур) [6]. Проект «PHYTFIRE» реализуется в течение 2012-2014 гг. в рамках Европейской программы координирования фитосанитарных исследований (EUPHRESKO II) [5]. Основной



Рис. 5. Очаги ожога плодовых культур в Енбекшиказахском районе Алматинской области и сопредельных территориях Кыргызской Республики

Fig. 5. Fire blight outbreaks in Enbekshikazakh region of Almaty Province and bordering areas of the Kyrgyz Republic

целью проекта является создание международной системы по борьбе с бактериальным ожогом. Для этого разрабатываются новые доступные методы диагностики и мониторинга возбудителя ожога плодовых и близких видов, проводится обмен опытом между лабораториями и институтами разных стран, организуются стажировки для специалистов, планируется ознакомление с результатами исследований всех заинтересованных сторон, в том числе ученых, НОКЗР, сельхозпроизводителей и т.п. Сотрудники ФГБУ «ВНИИИКР» в настоящее время работают в рамках проекта по двум направлениям: совершенствование диагностики возбудителя бактериального ожога и амилороподобных бактерий, а также определение источника инфекции и путей распространения бактериального ожога в Европе на основе генетического сходства штаммов. Изучение штаммов VNIKRFa10 и VNIKRFa11 в рамках проекта может позволить установить регион происхождения инфекции и понять пути ее проникновения на территорию республики. В связи с выявлением заболевания в Республике Ка-

захстан организаторами проекта был предоставлен грант для участия сотрудников КазНИИЗиКР в 13-й Международной конференции по ожогу плодовых культур и в приуроченном к ней научно-практическом семинаре в рамках проекта «PHYTFIRE», которые состоятся в июле 2013 года в г. Цюрихе (Швейцария).

Аннотация
С 2008 года в Республике Казахстан наблюдаются вспышки бактериальных, поражающих яблоневые и грушевые сады Алматинской плодовой зоны. Анализ зараженных образцов, проведенный в ТОО «КазНИИЗиКР» и ФГБУ «ВНИИИКР» в 2011-2012 гг., показал наличие в них смешанной инфекции возбудителя бактериального некроза (*Pseudomonas* sp.) и ранее отсутствовавшего на территории республики возбудителя ожога плодовых культур (*Erwinia amylovora*). Два штамма *E. amylovora* изучаются в рамках международного проекта «PHYTFIRE» (EUPHRESKO II) с целью определения источника инфекции. В г. Алматы начата работа по организации диагностической лаборатории, подготовлена программа

по изучению ожога и разработке комплексной защиты садов.

Литература

- Исин М.М. Инфекционное усыхание плодовых культур. – Алматы, 2007. – 341 с.
- Чумаевская М.А., Матвеева Е.В. Методические указания по изоляции и идентификации фитопатогенных бактерий. – М., 1986.
- СТО ВНИИИКР 4.001–2009. Бактериальный ожог плодовых культур *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. Методы выявления и идентификации.
- www.agroprod.kg. Официальный сайт Министерства Сельского Хозяйства и Мелиорации Кыргызской Республики. Пресс-релиз от 21.01.2013 г.
- www.euphresco.org.
- www.phytfire.org.

BACTERIAL FIRE BLIGHT

IN THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

Natalia V. Drenova, Head of FGBU VNIKR's Bacteriological Laboratory
M.M. Isin, A.A. Dzhamurzina, G.A. Zharmukhamedova, experts, Kazakh Research Institute for Plant Protection and Quarantine
A.K. Aitkulov, Director, Republican Quarantine Laboratory, Republic of Kazakhstan

“SOS! We May Run Short of Apples”. This was the title of an article published in the Republican Newspaper *Karavan* on July 22, 2012. It happens that over the past few years, horticulturists have been facing an unknown disease of fruit trees, with its first manifestations

and leaves turning dark brown and bending (“shepherd’s crook”) (Fig. 1, 2); in appearance of reddish spots on fruit; and in droplets of creamy white or amber yellow bacterial ooze exuding on the surface of fruit and bark of infected branches and stems (Fig. 3, 4).

issued since 2003, plants for planting of pomaceous and stone fruit and ornamental crops have been imported from Germany, Belgium, Poland, France, the Netherlands, Italy, the USA and other countries with outbreaks of *Erwinia amylovora*. In this respect, the

According to the experts of the Kazakh Research Institute for Plant Protection and Quarantine, the portion of infested trees exceeded 50-60% in apple gardens of certain farms, symptoms developing extensively and in the majority of cases pear trees being more affected.

reported in 2008 and sufficient damage to apple and pear gardens inflicted in several regions of Almaty fruit production area by 2010. The disease showed up in darkening and wilting of flowers which remained attached to branches for a long time; in shoots

These symptoms are typical of the bacterial fire blight, one the most hazardous disease of pomaceous and some stone fruit, ornamental and wild species in the rose family (Rosaceae). It is caused by the enteric bacterium *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow at al. This disease didn’t occur on the territory of Kazakhstan before. However, judging by import permits

possibility of the causative agent’s entry into the territory of the Republic with imported plants for planting should not be excluded. On the other hand, it should be noted that the bacterial fire blight was also found in bordering regions of the Kyrgyz Republic. As the Ministry of Agriculture and Land Reclamation reported, the fire blight appeared in Kyrgyzstan (Chui Province) presumably in 2008-2009. The outbreaks of the disease in the form of separate trees and sites are found in all regions of the Province. In 2011, the disease was introduced into Issyk Kul Province.

It should be mentioned that the majority of symptoms observed in infested gardens are typical of another disease of fruit crops – the bacterial necrosis caused by *Pseudomonas syringae* van Hall. This disease was spread in gardens of Almaty Province in 1980s and affected only pear trees under 5 years of age. Due to new fruit trees not having been planted on an industrial scale since 1990s, the issue of the bacterial necrosis is no longer essential. Bacteria of the *Pseudomonas* genus were isolated very rarely and only from stone fruit crops [1]. For this reason, no protective measures were taken against the pathogen in the gardens which could favour accumulation of the infection and emergence of more aggressive strains able to cause epiphytotics.

Fig. 6. Pathogenicity test on a pelargonium plant (photo by B. Kopzhasarov)



Рис. 6. Тест на патогенность на растении пеларгонии (фото Б. Копжасарова)

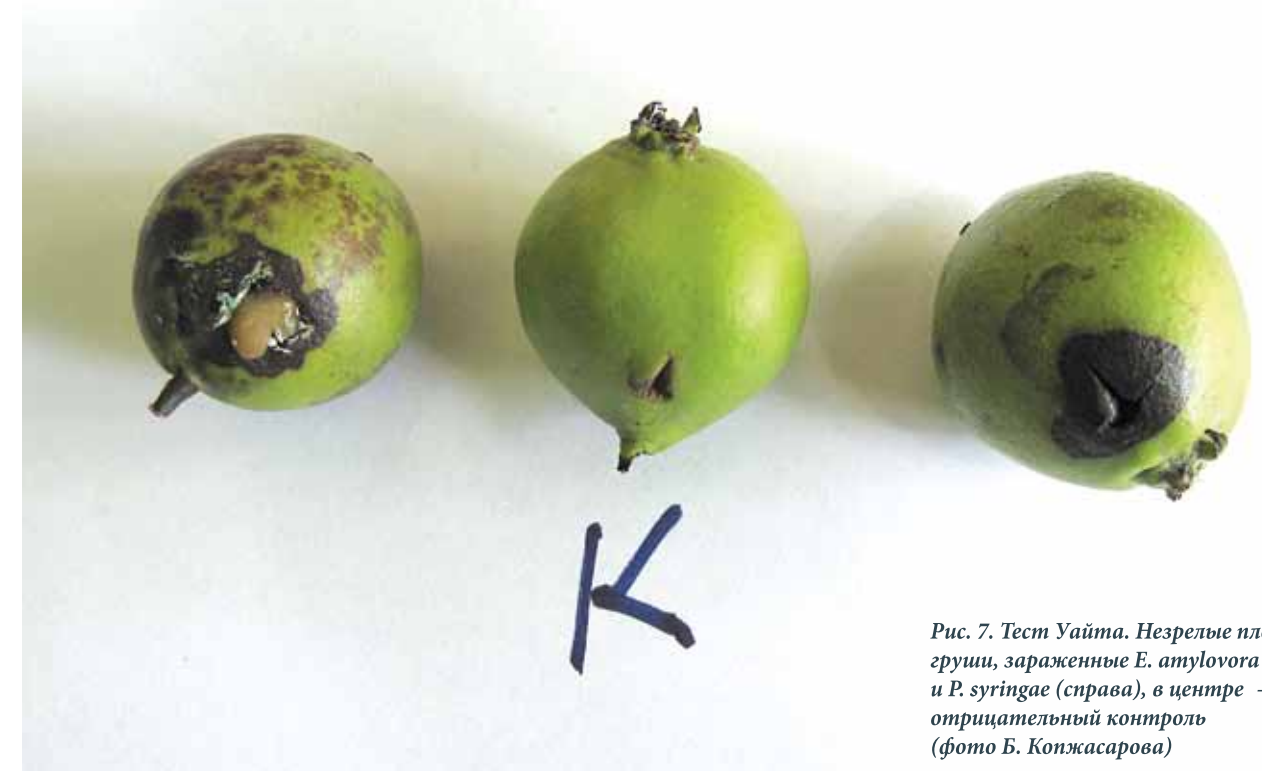


Рис. 7. Тест Уайта. Незрелые плоды груши, зараженные *E. amylovora* (слева) и *P. syringae* (справа), в центре – отрицательный контроль (фото Б. Копжасарова)

Fig. 7. White’s test. A pear fruitlet infested with *E. amylovora* (on the left) and *P. syringae* (on the right), a negative control is in the centre (photo by B. Kopzhasarov)

In 2011, taking into consideration the gravity of the issue, the experts of the Kazakh Research Institute for Plant Protection and Quarantine conducted surveys in a number of farms in Enbekshikazakh region of Almaty Province and Merki region of Zhambyl Province. From these areas, anxious farmers reported on damage of apple and pear trees. In the course of the surveys, the disease symptoms were scrutinized and damaged tree parts (ovary, leaves, fruit, twigs, branches, and bark) were sampled.

The bacteriological analysis of the samples was conducted at the Fruit and

for the growing destructiveness of the disease.

The pathogenicity of the isolated bacteria was verified by a hypersensitivity reaction on an indicator plant – a horseshoe geranium (*Pelargonium zonale* L’Hér) using Klement’s injection-infiltration method. The results demonstrated that within 12 hours the isolates similar to *P. syringae* induced necrosis of leaf tissue where the pathogen was injected, while the isolates similar to *E. amylovora* caused chlorosis with tissue necrosis on leaves (Fig. 6).

Immature pear fruit being infected, the isolates similar to *P. syringae*

Outbreaks were discovered in Issyk Kul (5.8 ha), Aksuisk (8 ha), Tonsk (5.3 га), Tiupsk (5.3 га), Dzhetty-Oguz (0.1 ha) regions, the cities of Balykchy (0.4 ha) and Karakol (0.1 ha).

Vegetable Crop Protection Department of the Kazakh Research Institute for Plant Protection and Quarantine; 230 bacteria isolates showing morphological and cultural similarity with *P. syringae* and *E. amylovora* were found. The pathogens were isolated on potato agar [2]. It should be noted that in the majority of cases both species were isolated simultaneously. According to the expert judgment, this fact allowed

induced tissue necrosis in the inoculation region and the isolates similar to *E. amylovora* invoked tissue necrosis with bacterial exudate (Fig. 7), these being one of the bacterial fire blight diagnostic features. Comparable distinctions of symptoms on pear fruit were observed upon natural infestation in the gardens.

Thus, the isolates classified as *E. amylovora* by the experts of the Kazakh

Research Institute for Plant Protection and Quarantine were isolated from samples of the pear variety “Talgarskaya krasavitsa” planted in 2005, and apple varieties – “Aport” (1992), “Starcrimson” (2004), and “Golden delicious” (2004). The samples were taken at farms in Enbekshikazakh region of Almaty Province. For laying out the infested gardens, imported propagative plant material had also been used.

Taking into account the complexity of the fire blight accurate identification with the use of conventional microbiological methods and the quarantine status of the disease requiring stringent control measures, the experts of the Kazakh Research Institute for Plant Protection and Quarantine informed the Republican Plant Protection Service on a suspected detection of the quarantine disease and recommended to have it confirmed at the All-Russian Plant Quarantine Center (FGBU VNIKR) possessing the state-of-the-art diagnostic facilities and longstanding experience in identification of the fire blight, it being spread in some regions of the Russian Federation.

Following agreement between the Republican Quarantine Laboratory, Kazakhstan, and FGBU VNIKR, the Diagnostics Division of the latter received 6 samples of branches and bark of apple and pear trees in May, 2012. The samples were taken at farms in Koktyube, Malovodnoe and Baiterek rural districts of Enbekshikazakh region of Almaty Province. Upon visual inspection of the samples, symptoms typical of the fire blight were observed: necrosis on flowers and leaves, distinctive mottled bark in the cross-section, and cuneiform lesions on the bark. Some samples were taken from trees which had been treated with plant protection products containing copper.

The bacteriological testing of the samples was conducted in compliance with VNIKR Proprietary Standard (STO VNIKR) 4.001–2009 [3]. Extracts from the plant material were tested using LOEWE (Germany) diagnostic kits for immunofluorescence and immunoenzyme assays and Agrodiagnostics (Russia) kits for FLASH-PCR. Levan and King's B media were used to isolate the pathogen culture from the extracts of the samples which had shown a positive result in at least one screening test. The isolated bacterial cultures were identified using immunofluorescence assay, FLASH-PCR, biochemical identification on commercial API 20 E test strips (France), as well as using the method of direct 16S rRNA gene sequencing with standard primers 8UA/519B.

Subsequently, the isolates were also tested on immature apple and pear fruit according to White's method.

As a result of the analyses, five samples of apple and pear tree vegetative parts from all the rural districts were tested positive for the fire blight (see the Table).

The pathogen was not isolated on bacteriological culture media from the pear branches sampled in Koktyube rural district, although the pathogen DNA was detected in the sample of dry bark. Notwithstanding the fire blight

The morphological features of the strain are retained after the culture goes through a living plant (apple fruitlets), as well as after 6 months of storage at -80 °C.

symptoms, the pathogen was not detected in the sample of treated apple branches. Pure *E. amylovora* cultures were isolated from apple branches sampled in Baiterek and Malovodnoe rural districts. These cultures were later added to the bacteriological collection of the All-Russian Plant Quarantine Centre under the numbers of VNIKR FEa10 and VNIKR FEa11, respectively. It should be noted that VNIKR FEa11 strain forms atypical colonies on Levan medium. After 48-hour incubation at 27 °C, the colonies are roundish, dryish, wrinkled, white-greyish, flat on the edges with an elevated central part. Within 7-9 days, a droplet of smooth mucoid bacterial mass is formed (Fig. 8).

The detection of the fire blight on the territory of Almaty Province having been confirmed, an operational meeting was held by the Chief State Plant Quarantine Inspector of the Republic of Kazakhstan. A decision was made to conduct a full-scale survey of pomaceous fruit crop production areas on the territory of the Republic in 2012-2014. Primarily, areas of commercial horticulture, where southern varieties of high quality are grown, will be surveyed in Almaty, Zhambyl, South

Kazakhstan and Kyzylorda Provinces. Northeastern provinces belong to the area of horticultural production for consumption with the prevalent number of varieties originating in Central Russia, the Urals and Siberia. These provinces are also endangered with regard to the bacterial fire blight spread and impact.

In 2012, surveys showed that the fire blight had focal distribution in Enbekshikazakh region of Almaty Province (Fig.5).

Dry weather conditions being observed during the growth period of 2012, a sharp decrease in the disease's harmfulness was noted as compared with the previous years. For containment and eradication of the infection at the farms,

Analyses Results for the Samples of Apple and Pear Tree Vegetative Parts from Three Rural Districts of Enbekshikazakh Region of Almaty Province

Sample description	Place of sampling	Immunofluorescence	ELISA	FLASH-PCR	Isolation	Immunofluorescence	FLASH-PCR	Sequencing	API 20 E	White's test
Pear branches	Koktyube rural district	+	+	+	-					
Pear branches	-//-	+	+	+	-					
Apple branches (treated)	-//-	-	-	-	-					
Pear bark (dry)	-//-	-	-	+	-					
Apple branches	Baiterek rural district	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Apple branches	Malovodnoe rural district	+	+	+	+	+	+	+	+	+

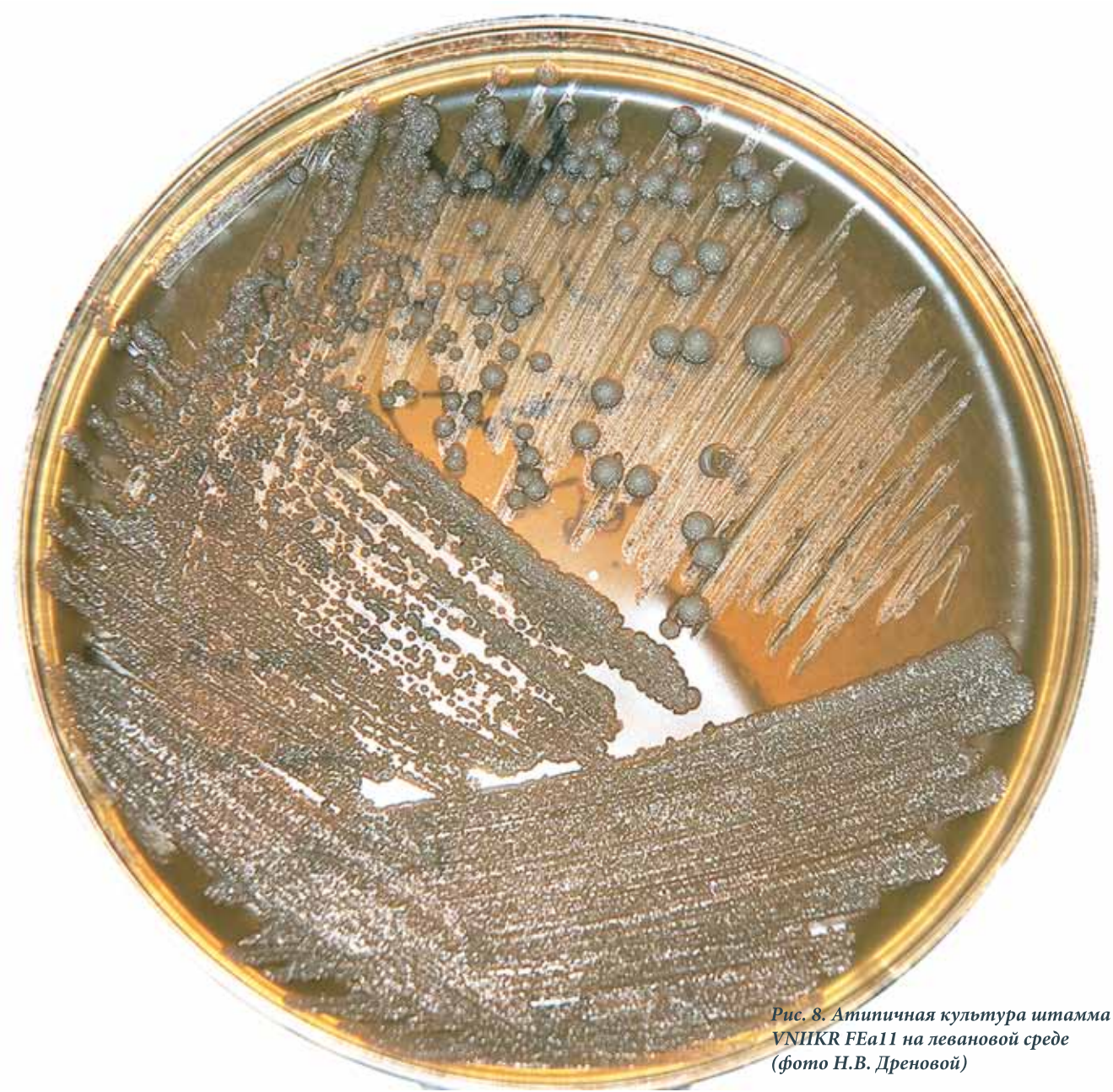


Рис. 8. Атипичная культура штамма VNIKR FEa11 на левановой среде (фото Н.В. Дреновой)

Fig. 8. Atypical culture of VNIKR FEa11 strain on Levan medium (photo by N. Drenova)

cutting and removal of trees (Fig. 9), as well as treatments with plant protection products containing copper have been applied.

On February 18, 2013, an extended meeting was held at the Committee of the State Inspection in the Agro-industrial Complex, with heads of institutions within jurisdiction of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan attending. A decision was made to have mobile groups established in every province consisting of specialists of territorial inspections, the Kazakh Research Institute for Horticulture and Vine Growing, Kazakh Research Institute for Plant Protection and Quarantine, Republican Quarantine Laboratory, and technical centres, as well as representatives of local executive authorities. Also, an action plan was approved with regard to information campaign in Mass Media (television, radio, magazines, newspapers, and internet). Workshops and seminars on the fire blight were

proposed. Besides, the discussion was held on the issue of allocating financial resources for containment and eradication of *E. amylovora* outbreaks and for compensation payments to agricultural producers for destroyed trees. A proposal was made for the Republic of Kazakhstan, Kyrgyz Republic and Republic of Uzbekistan to join efforts in order to prevent the spread of the fire blight in the region. The NPPOs of the countries concerned are to be informed on findings of new outbreaks; experience on the disease control is to be exchanged.

In December 2012, a project proposal on fire blight studies developed by a group of scientists from the Kazakh Research Institute for Plant Protection and Quarantine was submitted for a fundamental research contest announced by the Ministry of Education and Research of the Republic of Kazakhstan. The fire blight issues interested the Kazakh Agricultural Business Council Association. The research programme

on the disease was also sent to the Association for financial support.

The bacterial fire blight of fruit crops found on the territory of the Republic of Kazakhstan threw into sharp relief a necessity to set up an up-to-date diagnostic laboratory. A decision was made on its establishment at the Quarantine Department of the Kazakh Research Institute for Plant Protection and Quarantine. At present, a premise has been allocated; a plan for optimal laboratory facilities is being drawn; personnel are recruited; and, training is being planned for prospective employees.

The bacterial fire blight finding in the Republic of Kazakhstan presents a great scientific interest for the whole world community because this territory is one of the centres of *Malus* spp. origin and genetic diversity. For this particular



Рис. 9. Ликвидация зараженных садов в Енбекшиказахском районе Алматинской области (фото Б. Копжасарова)

Fig. 9. Eradication of infested gardens in Enbekshikazakh region of Almaty Province (photo by B. Kopzhasarov)

reason, VNIKR FEa10 and VNIKR FEa11 *E. amylovora* strains were included into the research work plan within the framework of an international project – PHYTFIRE, Phytosanitary diagnostic, on-site detection and epidemiology tools for *Erwinia amylovora* [6]. This project is being conducted as part of EUPHRESKO II project (European phytosanitary research coordination) in 2012-2014 [5]. The project aims at setting up an international system for the fire blight control. For this to be achieved, new comprehensible diagnostic and monitoring methods for the fire blight causative agent and its closely related species are being developed. Experience is exchanged between laboratories and research institutions of different countries. Trainings are organized for specialists. The results of the research are planned to be made available for all stakeholders including scientists, NPPOs, growers, etc. At present, FGBU VNIKR's experts are working within the framework of the PHYTFIRE project on the following two tasks: improving the diagnostic method for the bacterial fire blight causative

agent and *Amylovora*-like bacteria and determining the source of the infection and the fire blight pathway in Europe based on the genetic similarity of strains. Studying the strains VNIKR FEa10 and VNIKR FEa11 within the framework of the project may allow for determining the region where the disease originates from and understanding its pathways onto the territory of Kazakhstan. Due to the fire blight having been found in the Republic of Kazakhstan, the PHYTFIRE project coordinators provided a grant for the specialists of the Kazakh Research Institute for Plant Protection and Quarantine to be able to participate in the 13th International Fire Blight Workshop and a PHYTFIRE research and practice seminar timed to coincide with the Workshop which will be held in July, 2013, in Zurich (Switzerland).

Summary

Since 2008, outbreaks of bacterial blights damaging pear and apple gardens of Almaty fruit production area have been observed in the Republic of Kazakhstan. In 2011-2012, the infested samples were tested at the Kazakh Research Institute for Plant Protection and Quarantine and the All-Russian Plant Quarantine Centre. The analysis showed that a mixed

infection of *Pseudomonas* sp. and *Erwinia amylovora*, which had been absent in Kazakhstan, was present in the samples. Two *E. amylovora* strains are being studied within the framework of an international project – PHYTFIRE (EUPHRESKO II) in order to determine the source of the infection. In Almaty, the work has been launched to set up a diagnostic laboratory; a programme on the fire blight studies and development of the complex protection measures for gardens has been drawn.

References

1. Isin M.M. Infectious wilt of fruit crops. – Almaty, 2007. – 341 pp.
2. Chumayevskaya M.A., Matveeva E.V. Procedural guidelines on isolation and identification of plant pathogenic bacteria. – M., 1986.
3. VNIKR Proprietary Standard (STO VNIKR) 4.001–2009. The bacterial fire blight of fruit crops *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al. Detection and identification methods.
4. www.agroprod.kg. The official web-site of the Ministry of Agriculture and Land Reclamation of the Kyrgyz Republic. Press-release dated 21.01.2013.
5. www.euphresco.org.
6. www.phytfire.org.

ФИТОФТОРОЗНЫЕ ГНИЛИ КОРНЕЙ ЗЕМЛЯНИКИ

И.Н. Александров, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»
М.Б. Копина, начальник отдела ФГБУ «ВНИИКР»
И.П. Дудченко, старший научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»

Как и многие культурные растения, земляника подвержена поражению рядом грибных, бактериальных и вирусных патогенов, вызывающих заболевание всего растения. Проявление инфекции на надземных частях достаточно известны и хорошо распознаваемы, в то время как поражения подземных органов диагностируются значительно труднее. Нередко их путают с последствиями действия абиотических факторов (недостаток или избыток влаги, воздействие низких температур и др.).

В числе организмов, поражающих корневую систему земляники, чаще всего упоминаются возбудители вертициллезного увядания *Verticillium* spp., черной корневой гнили *Pythium* spp., ризоктониозной гнили *Rhizoctonia solani*. В последнее время наряду с названными упоминаются заболевания, вызываемые различными видами из рода *Phytophthora* (фитофторозная гниль).

Видовой состав возбудителей фитофторозных корневых гнилей земляники

Фитофторозная корневая гниль земляники впервые была обнаружена в Шотландии в 1926 г. и с тех пор начала быстро распространяться. Одним из исследователей, С.В. Уордлоу (1927), отмечались пораженные в весенний период растения земляники, отличавшиеся

от здоровых замедленным ростом, обесцвеченными листьями и отсутствием плодов [33]. Заболевание связали с недостатком элементов питания и дали название «Ланаркширской болезни земляники» – по географическому названию места ее обнаружения [27]. В 1930 году N.L. Alcock и ее коллеги указали, что болезнь была вызвана видом *Phytophthora*, т.к. в зараженных корнях было большое количество ооспор и спорангиев, однако попытки выделить возбудителя в чистую культуру оказались неудачными (рис. 1). Исследователи

В Северной Каролине (США) в 1985-1987 годах ежегодные убытки от этой болезни исчислялись от 50 тыс. до 100 тыс. долларов.

предложили название данной болезни «красная сердцевина корней», т.к. центральный цилиндр корня приобретает кирпично-красный цвет [11].

В США болезнь покраснения сердцевин корневых земляники впервые была обнаружена в 1935 г. в восточной части штата Иллинойс. Н.Ф. Бэйн и Дж. Демаре в 1938 году выделили культуру возбудителя красной стелы корня земляники в штате Мэриленд (США) и подчеркнули его заметное сходство с родом *Phytophthora* [13]. В 1938 году С.Дж. Никман выделил на питательную среду возбудителя красной стелы земляники из пораженных растений с полей Англии, а в 1940 году

он описал этот вид как новый – *Ph. fragariae*. Попытка С.Дж. Никман заразить *Ph. fragariae* другие растения помимо земляники не привела к результату [23] (рис. 2).

В большинстве стран возбудитель проявил себя как один из наиболее вредоносных на землянике. Особенно активно *Ph. fragariae* развивается и причиняет вред культуре в регионах с прохладным и влажным климатом и в периоды с пониженной температурой на фоне избыточного увлажнения. В месте первого обнаружения болезни в Великобритании по причине фитофтороза корней за короткий промежуток времени произошло сокращение площадей земляники в 3 раза. При значительном поражении фитофторозом урожайность культуры может составлять всего 1 тонну с гектара, с преобладанием мелких плодов низкого качества [29].

Высокая степень вредоносности возбудителя болезни, его способность проникать в новые районы и акклиматизироваться в них стали основанием для включения *Ph. fragariae* в перечень карантинных организмов Европейской и Средиземноморской организации карантинной и защиты растений (ЕОКЗР) [14, 29], а позднее в Перечень карантинных объектов (вредителей, возбудителей болезней растений и рас-

тений (сорняков)) Российской Федерации [8].

В России это заболевание впервые было обнаружено, идентифицировано и описано Г.Ф. Говоровой в 1962 г. По сообщению автора, очаги в Краснодарском крае ликвидированы совместно с Госкарантинном и руководителями хозяйств [1]. В печати также были сообщения Г.Ф. Маклаковой об обнаружении в 1956-1957 гг. фитофтороза на землянике в Ленинградской области и Е.И. Гревцовой о выявлении болезни в 1961 г. в Орловской области. Однако указанные сообщения относятся к разряду предположительных, поскольку в этих публикациях не представлены данные по идентификации возбудителя [5, 7].

По сообщениям D.E.L. Cooke и соавторов (2000), более 5 видов *Phytophthora* spp. описано на землянике в Европе, наиболее важными считаются *Ph. cactorum* и *Ph. fragariae* (рис. 3). На территориях, где присутствуют эти два патогена, возделывание земляники напрямую зависит от использования химикатов [19].

В 1983 году на Тайване после продолжительных дождей исследова-

раженных растений выделялся вид *Ph. cactorum*.

По сообщениям С.Е. Головина (2010), вид *Ph. citricola* был отмечен на увядающих растениях земляники в 1988 году в совхозе «Ульинское-Усово», в 1992 году патоген был выявлен в маточнике земляники РГАУ-МСХА им. Тимирязева, а в 2000 году – в маточнике защищенного грунта «Совхоз им. Ленина» [4].

Присутствие в большом количестве возбудителя *Ph. syringae* в прикорневой почве земляники сорта «Надежда» отмечалось в 1987 г. на плантации культуры, которая была заложена после выращивания яблони, что свидетельствует о влиянии культуры-предшественника на видовой состав возбудителей фитофторозных гнилей. Похожая ситуация была на Кунаширском опорном пункте (Башкирия): при посадке земляники после люцерны из прикорневой почвы земляники выделялся вид *Ph. porri* Foister, в других вариантах этот вид отсутствовал [4].

Возбудитель болезни сохраняется в почве в виде покоящихся спор (ооспоры), которые остаются жизнеспособными в течение несколь-

Иногда увядание протекает быстро, что приводит к гибели растения. При слабом заражении увядают лишь наружные листья или только цветоносы. В этом случае растения даже могут плодоносить, образуя небольшое количество мелких ягод [11, 23, 25].

При выкапывании пораженных кустов земляники видна слаборазвитая корневая система: боковые питающие придаточные корни отмирают, а основные корни поражены с кончиков и часто имеют в зоне поражения серую или коричневую окраску, напоминая своим видом крысиный хвост. При продольном разрезе такого корня можно обнаружить типичный признак фитофтороза – покраснение осевого цилиндра (стелы).

Как уже упоминалось ранее, наиболее благоприятными для развития патогена являются умеренные температуры, порядка 13-17 °С. Именно в этом температурном диапазоне идет активное прорастание ооспор и заражение растения, хотя образование зооспор может происходить и при более низких температурах. Вторым необходимым условием является достаточное насыще-

Поражение растений фитофторозом было обнаружено: в ряде хозяйств Московской, Тульской, Владимирской, Смоленской, Брянской и Волгоградской областях.

тели наблюдали обширные выпадения растений на плантациях земляники. Из некротизированных корней в ряду с наиболее часто встречаемыми видами *Ph. cactorum* и *Ph. citricola* удалось выделить *Ph. citrophthora*. Патоген ранее был известен как возбудитель гнили плодов цитрусовых культур, а как возбудитель корневой гнили земляники он был описан впервые [24].

Также на большое количество обнаружений *Ph. cactorum* и *Ph. citricola* в насаждениях земляники указывают С. Winterbottom, F. Westerlund, J. Mircetich (1998). Согласно сообщению, на коммерческих полях Калифорнии помимо *Verticillium dahliae*, *Colletotrichum acutatum* довольно часто встречались несколько видов *Phytophthora* spp. (*Ph. cactorum*, *Ph. citricola*, *Ph. fragariae*, *Ph. parasitica*) [34] (рис. 4).

Что касается распространенности оомицетов *Phytophthora* spp. Изучение морфологических и биологических особенностей возбудителей показало, что во всех случаях из по-

ких лет. Ооспоры прорастают в спорангии, внутри которых образуются подвижные зооспоры, способные передвигаться в почве и поражать корни земляники [13, 18, 23].

Симптомы фитофторозных корневых гнилей земляники

Первые симптомы заболевания можно обнаружить на корнях поздней осенью, но, как правило, они не проявляются на надземных органах земляники до весны. Летом при повышении температуры патоген теряет активность, а осенью при спаде температуры и выпадении обильных осадков фитофтороз может возобновиться с новой силой [15, 25, 27].

Болезнь начинается с небольших очагов, представляющих несколько пораженных растений в рядке; затем очаги увеличиваются в размерах (рис. 5). Симптомы на надземных частях первоначально наблюдаются у растений, оказавшихся в условиях стресса, обычно в пониженных местах, затопленных водой. Растения замедляют рост и начинают увядать.

ние почвы водой, которая необходима для перемещения зооспор. Поэтому наивысшие пики развития инфекции приходятся на ранневесенний и осенний периоды. По наблюдениям исследователей, фитофтороз прогрессирует наиболее активно на тяжелых, плохо аэрируемых почвах, на которых причиняет более существенный вред [11, 13, 15, 18, 23, 25].

В 1995 году в Московской области из пораженной малины выделена другая специализированная форма возбудителя болезни *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, которая ранее уже была выявлена в ряде европейских стран и в Северной Америке [2, 14, 20, 27].

Методы идентификации фитофторозов земляники

Для выявления фитофтороза корней земляники рекомендуется проводить обследование посадок в два срока: весной и осенью. Лучшие сроки первого обследования в период фаз бутонизации – цветения, когда наиболее типично проявляются



Fig. 1. Strawberry plant, affected by *Phytophthora fragariae*; *Phytophthora fragariae* sporangium

Рис. 1. Растение земляники, пораженное *Phytophthora fragariae*, спорангий *Phytophthora fragariae*

симптомы болезни, второе обследование проводится осенью (сентябрь – октябрь). При обследовании должна равномерно охватываться вся площадь посадок. Особое внимание следует обращать на растения в пониженных частях участка, в местах застаивания воды. Для выявления фитофтороза в защищенном грунте проводится осмотр материала перед посадкой маточника или розеток на укоренение [2].

При проведении экспертизы с целью выявления и идентификации возбудителя болезни используется комплекс методов, от визуального анализа до более сложных (микроскопический, метод биоприманок и др.).

Традиционное определение возбудителей *Phytophthora* основано на морфологии спорангиев, оогониев и антеридиев, наличии или отсутствии хламидоспор, характере роста колоний на селективных или полуселективных средах. В основе этого метода лежит использование ингибиторов роста сопутствующих грибов, бактерий и актиномицетов. В качестве таких ингибиторов используются антибиотики, органические кислоты и селективные фунгициды. Однако существенным недостатком этого метода является длительность его исполнения, а также сложность с выделением некоторых возбудителей фитофторозных корневых гнилей из растительного материала в чистую культуру [17].

Достаточно надежным методом идентификации возбудителей рода *Phytophthora* является применение биоприманок. Основной принцип

метода биоприманок заключается в активизации возбудителей фитофтороза. При создании благоприятных температурных условий, периода освещения и влажности зооспоры, формируемые оомицетом, поражают биоприманку. Последующее изучение патогена проводят по морфологическим признакам мицелия, спорангиев или ооспор [22]. В зависимости от времени года, во время которого отбирается образец, способность обнаружения возбудителя находится в диапазоне от 0 до более чем 90%.

Для выявления фитофторозной гнили земляники в 90-е годы XX века во многих европейских странах применялся приманочный метод, разработанный J.M. Duncan [21]. С его помощью возможно не только проводить оценку посадочного материала, но и выявлять наличие инфекции в почве. Несмотря на свою высокую



Fig. 2. Strawberry plant, affected by *Phytophthora fragariae*; *Phytophthora fragariae* oospore

чувствительность и специфичность, метод имел серьезный недостаток – продолжительность исследования составляла 5-6 недель, что для практического использования в производственных условиях было слишком долгим и трудоемким [16].

Во ВСТИСП С.Е. Головиным (2001) была разработана модифицированная и эффективная методика диагностики фитопфторозных корневых гнилей малины и земляники с использованием черешков и самих листьев малины и земляники в качестве биоприманок [3] (рис. 6). Метод отличается простотой и экономичностью, а также оперативностью по сравнению с аналогичной зарубежной методикой. Предложенная методика диагностики фитопфторозов требует в 3 раза меньше затрат на проведение теста, а также она в 4-5 раз оперативней зарубежной аналогичной мето-

дики. По сообщению автора, с помощью биоприманок успешно диагностировалась почва на наличие 8 видов рода *Phytophthora*, поражающих садовые и декоративные растения (рис. 7).

По мере развития новых методов диагностики для выявления возбудителей корневых гнилей малины и земляники стали применять серологические методы. В 90-е годы XX века были разработаны иммунологические анализы для выявления основных возбудителей фитопфторозов *Ph. fragariae*, *Ph. cinnamomi*, *Ph. ramorum* и др. Коммерческие наборы для выявления *Phytophthora* spp. на основе иммуноферментного анализа считались наиболее быстрым методом идентификации почвенных оомицетов. Однако при использовании наборов определение патогена проходило только на уровне рода, также было отмечено, что

Рис. 2. Растение земляники, пораженное *Phytophthora fragariae*, ооспора *Phytophthora fragariae*

антитела часто давали перекрестные реакции с некоторыми видами *Pythium* sp. [12].

Появление и внедрение в фитопатологию молекулярных методов диагностики стало, безусловно, знаменательным событием, так как оно радикально расширило возможности изучения возбудителей болезней, усовершенствовало диагностику и обозначило новые подходы к изучению патогенов. Все более распространенным становится метод молекулярной диагностики, основанный на полимеразной цепной реакции (ПЦР), дающей оптимальное сочетание высокой чувствительности и специфичности [18, 19]. Применение метода ПЦР позволяет выявлять возбудителей *Phytophthora*

spp. не только в чистой культуре, но и в растительных и почвенных образцах.

Большинство молекулярно-генетических методов для идентификации и выявления оомицетов рода *Phytophthora* были разработаны на основе внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) рибосомальной ДНК [16, 18]. Однако при диагностике близкородственных видов *Phytophthora* spp. последовательность этого участка оказалась недостаточно вариабельной. При определении внутривидового различия возникла необходимость проведения дополнительного анализа.

Среди генов-мишеней, известных для молекулярных исследований *Phytophthora* spp., наиболее перспективным для видовой диагностики фитопфторозов в пределах рода оказалась амплификация фрагмента гена *ras*-related protein (*Ypt1*) [31]. Высокий полиморфизм этого участка имеет большое значение для дифференциации тесно связанных видов, для которых характерны почти идентичные последовательности ITS-регионов. Регион гена *Ypt1* был использован для

разработки мультиплексной ПЦР «в реальном времени» для идентификации основных возбудителей фитопфторозов малины и земляники, в том числе и карантинного биотипа *Ph. fragariae*. В состав реакционной смеси входила пара праймеров, универсальных для рода *Phytophthora*, и четыре зонда, специфичных для *Ph. fragariae*, *Ph. cactorum*, *Ph. nicotianae* и *Ph. citricola*. В результате проведенных экспериментов была показана высокая специфичность разработанного метода, при котором только в положительных образцах наблюдалась детекция по соответствующему красителю [6].

Меры защиты от фитопфторозных корневых гнилей земляники
Возбудитель фитопфторозной корневой гнили земляники *Phytophthora fragariae* является карантинным ор-

ганизмом, не получившим в последние десятилетия распространения на территории Российской Федерации. Поэтому Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору РФ осуществляется ряд регламентирующих мероприятий, направленных на предотвращение его проникновения в нашу страну. Разрешается ввоз в страну только сертифицированного посадочного материала земляники, который проходит дополнительную проверку. С целью своевременного выявления фитопфторозной корневой гнили в посадках земляники требуется проведение систематических обследований.

Следует избегать размещения плантаций земляники на тяжелых, плохо аэрируемых, холодных почвах или на почвах, затопляемых водой в периоды межсезонья. Обработка почвы должна улучшать дренаж участка. Опытами, проведенными в ряде стран, установлено, что при выращивании растений на гребнях или поднятых грядах снижается степень развития фитопфторозов.

В «Списке пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации» (2002 год) упоминался препарат альетт для применения в питомниках на землянике [9], однако в после-

Согласно данным ЕОКЗР, для выявления зараженности земляники фитопфторозом со степенью поражения менее 1% достаточно осмотреть 500 растений на площади 0,1-0,2 га [29].

ганизмом, не получившим в последние десятилетия распространения на территории Российской Федерации. Поэтому Федеральной службой

Рис. 3. Ооспоры (слева) и спорангии (справа) *Phytophthora cactorum*

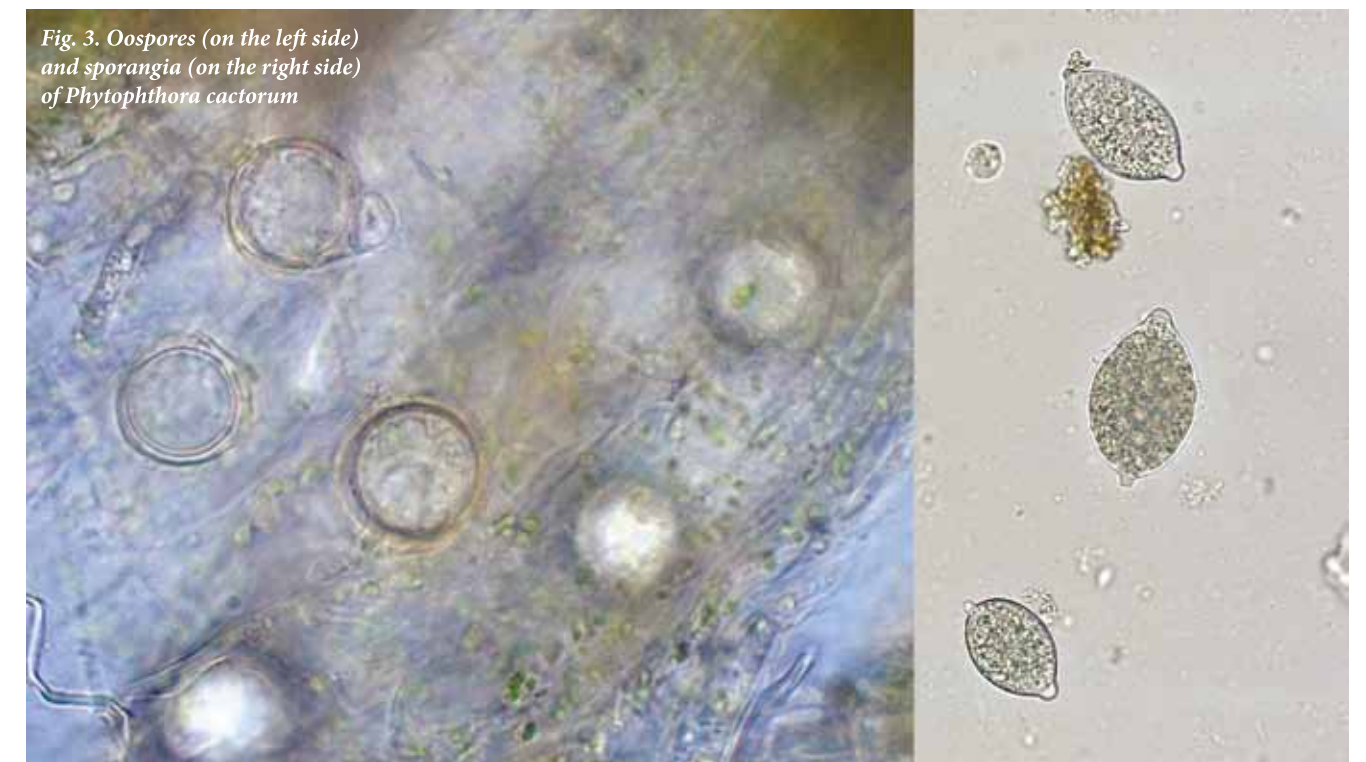


Fig. 3. Oospores (on the left side) and sporangia (on the right side) of *Phytophthora cactorum*



Fig. 4. Sporangia of *Phytophthora citricola* (on the left side) and *Phytophthora nicotianae* (on the right side)

Рис. 4. Спорангии *Phytophthora citricola* (слева) и *Phytophthora nicotianae* (справа)

дующих списках, включая и последний (2012 год), отсутствуют препараты, рекомендованные для борьбы с видами *Phytophthora* spp. Фундазол СП (смачивающийся порошок, 500 г/кг), привент СП (250 г/кг), бордоская смесь ВРП (водорастворимый порошок) рекомендованы для использования на землянике против ряда болезней, однако данных об их использовании против фитопфторозов не имеется [10].

За рубежом наиболее эффективными препаратами в борьбе с оомицетами рода *Phytophthora* зарекомендовали себя металаксил и фосэтил алюминия при различных способах применения препаратов (обработка посадочного материала, опрыскивание насаждений, пропитка почвы) [14, 18]. Для оздоровления посадочного материала проводилось погружение розеток земляники в смесь, содержащую 500 мг д.в. металаксил (ридомил 25% СП), 500 мг д.в. беномила (бенлат 50% СП) и 2 мг/л цитовета. Для защиты рассады земляники корни замачивались в течение 30 минут в суспензии фосэтил алюминия (альетт 80% СП 3 кг д.в. в 1000 л воды) перед посадкой. Хорошие результаты были получены

при опрыскивании насаждений земляники осенью после сбора урожая (до наступления состояния покоя) металаксилем или фосэтилом алюминия (2-3 кг д.в. в 1000 л/га). При необходимости обработка одним из названных препаратов повторялась весной в период до распускания почек – образования первых новых листьев [15, 27].

Следует иметь в виду, что многократное применение металаксилы может вызвать явление фунгорезистентности у *Phytophthora fragariae*, что уже было зарегистрировано в отдельных странах [30].

Пропитка почвы при посадке земляники может осуществляться суспензией металаксилы и беномила (по 500 мг д.в. каждого препарата) при норме расхода смеси 100 мл на 1 растение. Пропитка почвы может также проводиться фосэтилом алюминия, который, помимо действия на активную стадию патогена (зооспоры), оказывает ингибирующее воздействие на неактивные покоящиеся ооспоры.

Для борьбы с фитопфторозными корневыми гнилями земляники применяют устойчивые к данным патогенам сорта. Смена сортимента зем-

ляники с восприимчивых сортов на толерантные (Эстафета, Троицкая, Боровицкая и др.) привела к снижению на территории России вредности фитопфтороза земляники, вызываемого *Ph. cactorum*. В Европе и США имеются отдельные сорта, обладающие устойчивостью к тем или иным расам возбудителя *Ph. fragariae*: Frith, Aberdeen, MD 683 и другие, а виды *Fragaria chiloensis* и *F. virginiana* могут быть использованы в качестве источников устойчивости [28].

Заключение

В настоящее время фитопфторозные гнили выделяются по сравнению с другими болезнями ягодных культур по своей опасности и экономической значимости. Серьезную угрозу среди возбудителей корневых гнилей земляники представляет биотип *Ph. fragariae*, который, по некоторым данным, широко распространен в странах Балтии. Есть большая вероятность проникнове-

ния этого патогена в Россию, особенно в районы, граничащие с прибалтийскими странами. Для идентификации карантинных видов применяются традиционные методы определения, которые довольно трудоемки и не всегда дают достоверные результаты. Применение современных методов диагностики позволяет достоверно различать карантинные виды фитопфторозов от близкородственных и морфологически сходных оомицетов рода *Phytophthora*.

Аннотация

В статье представлены данные о фитопфторозной гнили корней земляники: симптомы заболевания, методы ее выявления и диагностики, меры борьбы с болезнью.

Литература

1. Говорова Г.Ф. Фитопфтороз земляники. Защита растений, 1966, 7, 44-45.
2. Головин С.Е. Фитопфторозная гниль корней малины: причины возникновения, диагностика и меры борьбы. Сб. науч. работ ВСТИСП, 1995, 2, 203-209.
3. Головин С.Е. Методические указания по диагностике и учету болезней корней и стеблей земляники и малины, передающихся через почву. ВСТИСП, М., 2001. 42 с.
4. Головин С.Е. Корневые и прикорневые гнили ягодных и плодовых культур, их диагностика: монография. М.: ООО НИЦ «Инженер», 2010. 306 с.
5. Гревцова Е.И. Фитопфтороз земляники. Защита растений, 1968, 11, 49.
6. Копина М.Б., Мазурин Е.С., Головин С.Е. Сочетание метода биоприманок и ПЦР «в реальном времени» для диагностики корневых гнилей малины и земляники, вызываемых оомицетами рода *Phytophthora* // Плодоводство и ягодоводство России. 2012. Т. 29. № 1. С. 245-252.
7. Маклакова Г.Ф. Фитопфтора на землянике. Защита растений, 1958, 6, 54.
8. Перечень карантинных объектов (вредителей растений, возбудителей болезней растений и растений (сорняков)). Приложение к Приказу Минсельхоза России от 26 декабря 2007 г. № 673.

9. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, М., 2002.

10. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, М., 2011.

11. Alcock N.L., Howells D.V., Foister C.E. (1930) Strawberry disease in Lanarkshire. Scottish Journal of Agriculture, July 1930, 242-251.

12. Ali-Shtayah M.S., MacDonald J.D., Kabashima J. (1991) A method for using commercial ELISA tests to detect zoospores of *Phytophthora* and *Pythium* species in irrigation water Plant Dis. // № 75. P. 305-311.

13. Bain H.F., Demaree J.B. (1945) Red stele root disease of the strawberry caused by *Phytophthora fragariae*, Journal of Agricultural Research, 70, 1, 11-29.

14. Bulletin OEPP. (1982) EPP0 List 2 *Phytophthora fragariae* Hickman. 1982, 12, 1, 1-2.

15. Bolay A., Varady C., Ducrot V. (1984) Fair face a la maladie des racines ruge du fraisier. Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic., 16, 2, 5-9.

16. Bonants P. J.M., Hagenaarde Weerd M., van Gent-Pelzer M., Lacourt I., Dooke D.E.L., Duncan M. (1997) Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction // European Journal of Plant Pathology. V. 103. P. 345-355.

17. Cacciola S.O., Williams N.A., Cooke D.E.L., Duncan J.M. (2001) Molecular identification and detection of *Phytophthora* species on some important Mediterranean plants including sweet chestnut // For. Snow Landsc. Res. V. 76. № 3. P. 351-356. 22.

18. Cooke D.E.L., Duncan J.M., Uncles S. (1995) Diagnosis and detection of *Phytophthora fragariae* in raspberry and strawberry. Bulletin OEPP, 25, 1, 95-98.

19. Cooke D.E.L., Young V., Guy D., Duncan J.M. (2000) Validation and Exploitation of a PCR-based Diagnostic for Detecting *Phytophthora* in Strawberry and Raspberry // Scottish Crop Research Institute. P. 34-37.

20. Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe (1998), maps 241, 242.

21. Duncan J.M. (1980) A technique for detecting red stele (*Phytophthora fragariae*) infection of strawberry

stocks before planting. Plant Disease 64: 1023-1025.

22. Erwin D.C. (1996) Ribeiro O.K. *Phytophthora* diseases worldwide. // American Phytopathol. Soc., St. Paul, Minn. 263 p.

23. Hickman C.J. (1940) The red cor root disease of the strawberry caused by *Phytophthora fragariae*, n. sp. Journal of Pomology, 18, 89-118.

24. Kao C.W., Leu L.S. (1979) Strawberry fruit rot by *Phytophthora cactorum* and *P. citrophthora* // Plant Protection Taiwan. V. 21. P. 239-243.

25. McKeen W.E. (1958) Red stele root disease of the loganberry and strawberry caused by *Phytophthora fragariae*. Phytophthology, 48, 2, 229-232.

26. Milholland R.D. (1994) A monograph of *Phytophthora fragariae* and the red stele disease of strawberry / R.D. Milholland North Carolina Agricultural Research Service, 1994. 306.

27. Nourisseau J.G., Bandry A. (1987) Un *Phytophthora* cause de divertissement du framboisier en France. Phytoma, 384, 39-41.

28. Pepin H.S. (1967) Susceptibility of member of the Rosaceae to races of *Phytophthora fragariae*. Phytophthology, 57, 7, 782-784.

29. Quarantine Pests for Europe (1997) CABI-EPP0, 920-924.

30. Seemuller E., Sun C. (1989) Occurrence of metalaxyl resistance in *Phytophthora fragariae*. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 41, 71-73.

31. Schena L., Duncan J.M., Cooke D.E.L. (2008) Development and application of a PCR-based 'molecular tool box' for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems // Plant Pathol. V. 57. P. 64-75.

32. Wardlaw C.W. (1927) The strawberry disease in Lanarkshire. Ann. Appl. Biol. 14: 197-201.

33. Wilcox W.F., Duncan J.M. (1993) *Phytophthora fragariae* Hickman var. *rubi* var. *nova*. Mycological Research, 97, 8, 830.

34. Winterbottom C., F. Westerlund, J. Mircetich, Larry Galper (1998) Evaluation of relative resistance of different strawberry cultivars to *Phytophthora* and *verticillium dahliae* as a potential alternative to methyl bromide.



PHYTOPHTHORA ROOT ROTS OF STRAWBERRY

Рис. 5. Очаг *Phytophthora fragariae* в насаждениях земляники

Igor N. Aleksandrov, FGBU VNIKR's Leading Researcher
Maria B. Kopina, Head of FGBU VNIKR's Department
Irina P. Dudchenko, FGBU VNIKR's Senior Researcher

Strawberry, as many other cultivated plants, is prone to various fungal, bacterial and viral diseases affecting the whole plant. Above-ground symptoms of such diseases are well studied and easily recognized while the detection of below-

ground symptoms is very challenging. The latter are often attributed to the effects of abiotic factors, such as water excess or water deficiency, low temperatures, etc.

Causal agents of Verticillium wilt, black root rot and Rhizoctonia rot

caused by *Verticillium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, respectively, are most frequently intercepted root pathogens. Recently, some species of the genus *Phytophthora* (*Phytophthora* rots) have been reckoned among dangerous root

pathogens along with those mentioned above.

Species composition in *Phytophthora* root rots of strawberry

Phytophthora root rot was first detected in Scotland in 1926. Wardlaw C.W. (1927) reported early spring detection of affected plants demonstrating the disease symptoms, i.e. stunted growth, leaf discoloration and absence of fruits

[33]. These symptoms were erroneously taken for effects of nutrient deficiency. The disease was named the Lanarkshire disease after the place of its first detection [27]. Alcock N.L. and her coworkers (1930) first noted that the disease was caused by a *Phytophthora* species as there were large numbers of oospores and sporangia in the affected roots. Their attempts to isolate the organism in pure culture were unsuccessful. The researchers proposed to name the disease

Fig. 5. Phytophthora fragariae outbreak in strawberry plantings

“red core (stele)” as the disease turned the central cylinder of the root brick-red [11].

In the US, the disease was first reported from eastern Illinois in 1935. In 1938, Bain and Demaree isolated the fungus causing red stele root disease of strawberries in Maryland (US) and emphasized its marked resemblance to

the genus *Phytophthora* [13]. In 1938, Hickman isolated the causal fungus of red core on a growing medium from strawberries collected from the fields in England and in 1940 he described it as a new species, *P. fragariae*. Hickman's efforts to inoculate *Ph. fragariae* to plants other than strawberry yielded no results [23].

This plant pathogen proved to be one of the most virulent among those affecting strawberry in the majority

The annual damage caused by the disease amounted to 50-100 thousand dollars in North Carolina (US).

of the countries where it occurs. *Ph. fragariae* most actively develops in cool areas with high humidity at lower temperatures (associated with excessive moistening) where it causes significant damage to strawberry plantings.

In Great Britain, in the place of the pathogen's first detection, three-fold scale-down of the the strawberry cultivated area caused by *Phytophthora* root rot of strawberry was registered. In 1985-1987, the annual damage caused by the disease amounted to 50-100 thousand dollars in North Carolina (US). High levels of infestation may reduce yields to 1 ton per ha with the dominating number of low quality fruits [29].

Due to high virulence and potential for introduction and establishment in new areas, *Ph. fragariae* was included into to the A2 List of the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) [14, 29] and, later, into the List of Pests of Quarantine Concern for the Russian Federation [8].

In Russia, the causal agent of *Ph. fragariae* was first detected and identified by Givovrova G. F. in 1962. According to the author, the outbreaks of the disease in Krasnodar Krai had been eradicated in cooperation with the State Quarantine Service (Goskarantin) and farm managers [1]. There were also publications by G.F. Maklakova and E. I. Grevtsova on the detection of the disease in Leningrad region in 1956-1957 and in Orlov region in 1961. These reports are hypothetical as they are not supported with data on the pest identification [5,7].

According to Cooke D.E.L., et al. (2000), over five species of *Phytophthora* spp. affecting strawberry have been described in Europe, *Ph. cactorum* and *Ph. fragariae* being most significant among them.

In 1983, substantial plant mortality was observed in Taiwan in strawberry

plantings after continuous rainfalls. Along with most frequently occurring *Ph. cactorum* and *Ph. citricola*, *Ph. citrophthora* was isolated from necrotized roots. This pathogen had been previously described as the causal agent of citrus fruit rot; it was for the first time described as the causal agent of root rot [24].

Winterbottom C., F. Westerlund and J. Mircetich (1998) reported frequent interceptions of *Ph. cactorum* and *Ph. citricola* in strawberry plantings. One of the reports stated that in commercial fields in California along with *Verticillium dahlia* and *Colletotrichum acutatum* several *Phytophthora* spp., namely *Ph. cactorum*, *Ph. citricola*, *Ph. fragariae* and *Ph. Parasitica*, were also detected [34]. The study of morphological and biological characteristics of the causal agents revealed that *Ph. cactorum* was isolated from the affected plants in all cases.

According to Golovin S. E. (2010), *Ph. citricola* was detected in wilting strawberry plants in 1988 in the Ulinskoe-Usovo state owned farm. In 1992, the pathogen was detected in a strawberry mother plantation of the Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy and, in 2000, in a mother plantation, the Lenin State Farm, under the conditions of protected cultivation [4].

The presence of *Ph. syringae* in the rhizogenous soil of the Nadezhda variety of strawberry was detected in strawberries planted after the cultivation of apples which indicated the first crop influence on the composition of species

In Russia, the Phytophthora disease was detected in Moscow, Tula, Vladimir, Smolensk, Briansk and Volgograd regions.

causing *Phytophthora* rot. This was also observed in the Kunashir locality in Bashkiria where *Ph. porri* Foister was isolated from the soil around the roots of strawberry planted after Lucerne [4].

The causal agents of the *Phytophthora* disease remain in soil as resting spores (oospores) and stay viable for several years. The oospores germinate to sporangia. In the sporangia, mobile zoospores capable of moving in the soil and infecting the root are produced [13, 18, 23].

Symptoms of Phytophthora root rot of strawberry

First symptoms of the disease are detectable in the roots in early autumn, but, as a rule, become visible on above-ground parts of the plant only in spring.

In summer, at higher temperatures the pathogen becomes inactive, but in autumn, due to lower temperatures and abundant precipitation, the disease regains its destructive power [15, 25, 27].

The disease starts as small outbreaks, i.e. several affected plants in a row, that later expand. Above-ground symptoms are first observed in stressed plants that are often found in low-lying floodable areas. Affected plants demonstrate stunted growth and wilting. Rapid wilting kills the plant. At low levels of infestation wilting affects only outer leaves and peduncle and plants may even yield very few small fruits [11, 23, 25].

When dug out, affected strawberry plants demonstrate a poorly developed root system with the secondary lateral feeding roots dieback; primary root infestation starts at the tips that turn grey or brown resembling rat tails. In longitudinal section, a typical symptom of the *Phytophthora* disease, i.e. the red central cylinder, is observed.

Lower temperatures of circa 13-17 °C are most favorable for the pathogen development. This temperature range allows for oospore germination and infestation of the plant. Oospore germination may occur even at lower temperatures. High water content in the soil is also important for the pathogen development as it facilitates oospore movement. Peaks of the development take place in early spring and autumn. Observations revealed that heavy, poorly-aerated soils are most suitable for the *Phytophthora* disease where it

causes most substantial damage [11, 13, 15, 18, 23, 25].

In 1995, a biotype *Phytophthora fragariae* var. was isolated from affected strawberry plants in Moscow region. This species had been previously detected in several European and Central American countries [2, 14, 20, 27].

Identification methods for Phytophthora root rots of strawberry

For detection of the *Phytophthora* disease, surveys of strawberry plantings in spring and autumn are recommended. The period from bud formation to flowering, when most typical symptoms become visible, is the best time for conducting the first survey. The second survey should be



Рис. 6. Метод биоприманок для диагностики фитопторозных корневых гнилей

Fig. 6. Baiting method for detection and identification of *Phytophthora* rots

conducted in autumn (September/October). The whole planting area should be covered evenly. Plants in low-lying floodable areas should be given special attention. To detect the disease

According to the EPPO, a sample of 500 plants per 0.1-0.2 ha is enough to detect levels of infection well below 1% [29].

in protected cultivation, a survey of the material used for arranging the mother plantation or rosettes for rooting should be conducted before planting [2].

A toolbox of techniques is used for detection and identification of the causal agent of the *Phytophthora* disease. These are visual examination, microscopy and morphometry, baiting,

etc. The conventional method for identification of species in the genus *Phytophthora* is based on the analysis of the morphological characteristics of sporangia, oogonia and antheridia, presence or absence of chlamydozoospores, growth habit of colonies on selective and semi-selective media. Growth of coexisting fungi, bacteria and actinomycetes is inhibited by the use of antibiotics, organic acids and selective fungicides. However, this method is very time-consuming. Also, isolation of certain causal agents of the diseases caused by *Phytophthora* spp. from plant material in pure culture may be complicated [17].

Baiting method is another reliable technique for identification of *Phytophthora* spp. This method is based on activation of the causal agents, i.e. under favorable temperature, light and humidity conditions zoospores produced by the oomycete infect the bait. Further study of the pathogen is performed based on morphological characteristics of the

mycelium, sporangia and oospores [22]. Depending on the season of sampling, the probability of detection varies from 0 to 90%. In 1990's, the baiting method for detection of the *Phytophthora* disease of strawberry developed by J. M. Duncan was used in many countries [21]. This method allowed for both evaluation of the phytosanitary condition of plants for planting and detection of infestation in soil. Although being high sensitive, the method was very time-consuming (5-6 weeks) which was a serious disadvantage in terms of its feasibility [16].

In 2001, Golovin S.E. from the State Research Institution *All-Russian Selection and Technology Institute for Horticulture and Nurseries* developed a modified method for detection and identification of rot diseases caused by *Phytophthora* spp. using leafstalks and leaves as baits [3]. Compared to the original method, the modified method was more efficient, i.e. it was three times less time-consuming and

4-5 times more reliable. According to the author, the baiting method was successfully used for detection of eight *Phytophthora* species affecting garden and ornamental plants in soil.

In 1990's, immunoassays for detection of major causal agents of the *Phytophthora* diseases, *Ph. fragariae*, *Ph. cinnamomi*, *Ph. ramorum* etc, were developed. The use of commercial kits for detection of *Phytophthora* spp. by enzymoimmunoassay was considered the most rapid method for identification of soil oomycetes. However, the kits enabled to identify the pathogen only to the genus level. It was also noted that the antibodies often cross reacted with certain species of *Pythium* spp. [12].

Development and practical application of molecular diagnostic methods greatly enhanced the capacity for studying the causal agents of the disease, improved the methods of diagnosis and identified new opportunities for the pathogen studies.

Molecular diagnostics is becoming more and more popular. This method is based on the polymerase chain reaction (PCR) and strikes a compromise between high sensitivity and specificity [18, 19]. Application of PCR allows the pathogen detection not only in pure culture, but also in plant and soil samples. Most molecular genetic methods for identification and detection of *Phytophthora* oomycetes were developed based on internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA [16, 18]. However, the diagnosis of the sequence of this site in closely related *Phytophthora* species revealed its lack of variability. For inter-species differentiation of the *Phytophthora* diseases additional testing was required. Among known target genes used in molecular analysis of *Phytophthora* spp., amplification of a fragment of the ras-related protein (Ypt1) gene seems to be the most promising for the diagnosis of the species within the genus *Phytophthora* [31]. The high polymorphism of the site is crucial for the differentiation of closely related species which are characterized by almost identical sequences of the ITS-region. The Ypt1 gene region was used to develop a multiplex «real time» PCR-method to identify major causal agents of *Phytophthora* diseases of raspberry and strawberry, including the quarantine biotype *Ph. fragariae*. The reaction mixture contained a pair of universal primers for *Phytophthora* spp., and four probes specific for *Ph. fragariae*, *Ph. cactorum*, *Ph. nicotianae* and *Ph. citricola*. The results showed high specificity of the developed method, i.e.

detection by a corresponding dye was observed only in positive samples [6].

Protective measures against *Phytophthora* root rots of strawberry

Phytophthora fragariae, a causal agent of the *Phytophthora* disease of strawberry, is a quarantine pest absent in the Russian Federation. Therefore, the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance of the Russian Federation applies measures aimed at preventing its entry into the country. Only certified plants for planting of strawberries are approved for import into the Russian Federation. These are subject to additional inspection. For early detection of the disease in strawberry plantings, regular surveys should be conducted.

To protect strawberry plantings from the disease, the cultivation of the crop in heavy, poorly aerated, cool soils or soils floodable during inter-season should be avoided. Improved soil drainage is achieved by application of appropriate treatments. Trials carried out in several countries showed that growing plants in raised beds or ridges reduced the degree of the disease development.

Alett, a plant protection product, used for treatment of strawberry plants in nurseries, had been previously included in the List of pesticides and agricultural chemicals approved for the use in the Russian Federation (2002). [9] However, in the subsequent issues, including the latest issue (2012), there are no products recommended for *Phytophthora* spp. control. Fundazol SP (wettable powder, 500 g / kg), Privent SP (250 mg / kg) and Bordoskaya mixture GRP (water soluble powder) are recommended for treatment of strawberry against a number of diseases, but there are no data on their use against *Phytophthora* spp. [10] Metalaxyl and fosetyl-aluminum have proven to be the most effective products for the control of *Phytophthora* oomycetes in many foreign countries. These could be applied in different ways: by treating plants for planting, spraying plantings and soil soaking [14, 18]. For health improvement of plants for planting, strawberry runners were immersed in a mixture containing 500 mg of Metalaxyl (Ridomil 25% wettable powder), 500 mg benomyl (benlate 50% wettable powder) and 2 mg / l tsitoveta. To protect strawberry seedlings, prior to planting the roots were soaked in a suspension of fosetyl-aluminum (3 kg of 80% alett (wettable powder) per 1000 liters of water) for 30 minutes. Good results were obtained when spraying strawberry plantings in autumn after



Рис. 7. Биоприманка (лист земляники), пораженная *Phytophthora* spp.

Fig. 7. Bait (a strawberry leaf) affected by *Phytophthora* spp.

already been registered in some countries [30].

For impregnation of soil when planting strawberries, a suspension of metalaxyl and benomyl (500 mg of each product) may be used at a rate of 100

ml of a mixture per plant. Impregnation of soil can also be conducted with fosetylom aluminum, which in addition to its influence on the active stage of the pathogen (zoospores) produces an inhibitory effect on inactive resting oospores.

To control *Phytophthora* root rot of strawberry, resistant cultivars are used.

In Russia, the shift from susceptible cultivars to tolerant cultivars (Relay, Trinity, Borovitskaya, etc.) has led to a decreased virulence of the disease of strawberry caused by *Ph. cactorum*. In Europe and the US, there are cultivars resistant to various races of *Ph. Fragariae*. These are Frith, Aberdeen, MD 683 and others. *Fragaria chiloensis*

and *F. virginianae* could be used as sources of resistance [28].

Conclusion

Currently, *Phytophthora* rots are most significant among the diseases of small-fruit crops in terms of their virulence and economic impact. A serious threat is also posed by a *Ph. fragariae* biotype which, according to available data, is widely distributed in the Baltic countries. The pathogen is very likely to enter Russia, particularly areas bordering on the Baltic countries. To identify *Phytophthora* spp., often time-consuming and unreliable conventional methods are used. The use of advanced diagnostic techniques can reliably distinguish quarantine species of *Phytophthora* from closely related and morphologically similar *Phytophthora* oomycetes.

Abstract

The paper provides data on Phytophthora root rots of strawberry: symptoms, methods of detection, identification and control.

References

1. Govorova G.F. Strawberry Phytophthora Disease. Plant Protection, 1966, 7, P. 44-45.
2. Golovin S.E. Phytophthora root rot of raspberry: cause of emergence, diagnosis and control measures. Collection of scientific papers of the All-Russian Breeding and Technological Institute of Horticulture and Nursery of the Russian Academy of Agricultural Sciences, 1995, 2, P. 203-209.
3. Golovin S.E. Guidelines on diagnostics and registration of diseases of roots and footstalks of strawberry and raspberry transmitted through soil. The All-Russian Breeding and Technological Institute of Horticulture and Nursery of the Russian Academy of Agricultural Sciences, Moscow, 2001. 42 pp.
4. Golovin S.E. Root and Rhizogenous Rots of Berry and Fruit Crops, Their Diagnosis: Monograph. Moscow: Engineer LLC, 2010. 306 pp.
5. Grevtsova E.I. Phytophthora disease of strawberry. Plant Protection, 1968, 11, 49 pp.
6. Kopina M.B., Mazurin E.S., Golovin S.E. The combination of biobating and real-time PCR for diagnosis of root rots of raspberry and strawberry caused by oomycetes of the genus *Phytophthora* // Fruit and Berry Farming in Russia. 2012. Volume 29. № 1. P. 245-252.

7. Maklakova G.F. Phytophthora on strawberry. Plant Protection, 1958, 6, 54.
8. The List of Quarantine Objects (plant pests, causal agents of diseases and plants (weeds)). Annex to the Order of the Ministry of Agriculture of Russia dated December 26, 2007, № 673.
9. List of pesticide and agro-chemicals allowed for the use in the Russian Federation, Moscow, 2002.
10. List of pesticide and agro-chemicals allowed for the use in the Russian Federation, Moscow, 2011.
11. Alcock N.L., Howells D.V., Foister C.E. (1930) Strawberry disease in Lanarkshire. Scottish Journal of Agriculture, July 1930, 242-251.
12. Ali-Shtayeh M.S., MacDonald J.D., Kabashima J. (1991) A method for using commercial ELISA tests to detect zoospores of *Phytophthora* and *Pythium* species in irrigation water Plant Dis. // № 75. P. 305-311.
13. Bain H.F., Demaree J.B. (1945) Red stele root disease of the strawberry caused by *Phytophthora fragariae*, Journal of Agricultural Research, 70, 1, 11-29.
14. Bulletin OEPP. (1982) EPPO List 2 *Phytophthora fragariae* Hickman. 1982, 12, 1, 1-2.
15. Bolay A., Varady C., Ducrot V. (1984) Fair face a la maladie des racines ruge du fraesier. Revue Suisse Vitic. Arboric. Hortic., 16, 2, 5-9.
16. Bonants P. J.M., Hagenaar-de Weerd M., van Gent-Pelzer M., Lacourt I., Dooke D.E.L., Duncan M. (1997) Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction // European Journal of Plant Pathology. V. 103. P. 345-355.
17. Cacciola S.O., Williams N.A., Cooke D.E.L., Duncan J.M. (2001) Molecular identification and detection of *Phytophthora* species on some important Mediterranean plants including sweet chestnut // For. Snow Landsc. Res. V. 76. № 3. P. 351-356. 22.
18. Cooke D.E.L., Duncan J.M., Uncles S. (1995) Diagnosis and detection of *Phytophthora fragariae* in raspberry and strawberry. Bulletin OEPP, 25, 1, 95-98.
19. Cooke D.E.L., Young V., Guy D., Duncan J.M. (2000) Validation and Exploitation of a PCR-based Diagnostic for Detecting *Phytophthora* in Strawberry and Raspberry // Scottish Crop Research Institute. P. 34-37.
20. Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe (1998), maps 241, 242.

21. Duncan J.M. (1980) A technique for detecting red stele (*Phytophthora fragariae*) infection of strawberry stocks before planting. Plant Disease 64: 1023-1025.
22. Erwin D.C. (1996) Ribeiro O.K. *Phytophthora* diseases worldwide. // American Phytopathol. Soc., St. Paul, Minn. 263 p.
23. Hickman C.J. (1940) The red cor root disease of the strawberry caused by *Phytophthora fragariae*, n. sp. Journal of Pomology, 18, 89-118.
24. Kao C.W., Leu L.S. (1979) Strawberry fruit rot by *Phytophthora cactorum* and *P. citrophthora* // Plant Protection Taiwan. V. 21. P. 239-243.
25. McKeen W.E. (1958) Red stele root disease of the loganberry and strawberry caused by *Phytophthora fragariae*. Phytophthology, 48, 2, 229-232.
26. Milholland R.D. (1994) A monograph of *Phytophthora fragariae* and the red stele disease of strawberry / R.D. Milholland North Carolina Agricultural Research Service, 1994. 306.
27. Nourisseau J.G., Bandry A. (1987) Un *Phytophthora* cause de divertissement du framboisier en France. Phytoma, 384, 39-41.
28. Pepin H.S. (1967) Susceptibility of member of the Rosaceae to races of *Phytophthora fragariae*. Phytophthology, 57, 7, 782-784.
29. Quarantine Pests for Europe (1997) CABI-EPPO, 920-924.
30. Seemuller E., Sun C. (1989) Occurrence of metalaxyl resistance in *Phytophthora fragariae*. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 41, 71-73.
31. Schena L., Duncan J.M., Cooke D.E.L. (2008) Development and application of a PCR-based 'molecular tool box' for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems // Plant Pathol. V. 57. P. 64-75.
32. Wardlaw C.W. (1927) The strawberry disease in Lanarkshire. Ann. Appl. Biol. 14: 197-201.
33. Wilcox W.F., Duncan J.M. (1993) *Phytophthora fragariae* Hickman var. *rubi* var. *nova*. Mycological Research, 97, 8, 830.
34. Winterbottom C., F. Westerlund, J. Mircetich, Larry Galper (1998) Evaluation of relative resistance of different strawberry cultivars to *Phytophthora* and *verticillium dahliae* as a potential alternative to methyl bromide.

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. Резюме (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. Иллюстрированные материалы (фото, картинки) допускаются хорошей контрастности, с разрешением не ниже 300 точек на дюйм (300 dpi), оригиналы прикладываются к статье отдельными файлами в формате tiff или jpeg (Рисунки, 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 и «вмещаться» в печатное поле страницы. Название таблицы – над таблицей; название рисунка/графика – под рисунком/графиком.

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

Адрес: 105122, г. Москва, Щелковское шоссе, д. 13, офис 402

Контактное лицо: Бададгулова Юлиана Георгиевна

Телефон: +7 915 477 78 36



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 23 филиала на территории Российской Федерации

Россия, 140150, Московская область, Раменский район,
пос. Быково, ул. Пограничная, д. 32

Тел./факс: (499) 271-38-24

e-mail: vniikr@mail.ru, <http://www.vniikr.ru>