

КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

НАУКА И ПРАКТИКА

ДЕКАБРЬ
4/30/2019

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ ЖУРНАЛ

**СИГНАЛЬНЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ – 2019 ЕВРОПЕЙСКОЙ
И СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПО КАРАНТИНУ
И ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ** стр. 2

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ЗОЛОТИСТОЙ
КАРТОФЕЛЬНОЙ ЦИСТООБРАЗУЮЩЕЙ НЕМАТОДЫ
GLOBODERA ROSTOCHIENSIS (WOLLENWEBER)
SKARBILOVICH** стр. 9

***STRIGA HERMONTHICA* (DEL.) BENTH. – ОПАСНАЯ КРАСАВИЦА
ИЗ АФРИКИ** стр. 53

**НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЭКСПЕДИЦИЯ
ФГБУ «ВНИИКР» В РЕСПУБЛИКУ КЕНИЯ** стр. 58

**PCR DIAGNOSTICS TO ENHANCE DETECTION OF *GLOBODERA
ROSTOCHIENSIS* (WOLLENWEBER) SKARBILOVICH** page 16

***STRIGA HERMONTHICA* (DEL.) BENTH. – DANGEROUS BEAUTY
FROM AFRICA** page 55

**RESEARCH EXPEDITION OF FGBU “VNIKR” TO THE REPUBLIC
OF KENYA** page 62

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL

PLANT HEALTH

RESEARCH AND PRACTICE

DECEMBER
4/30/2019

ISSN 2306-9767

«КАРАНТИН РАСТЕНИЙ. НАУКА И ПРАКТИКА»

ДВУЯЗЫЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ №4 (30) 2019 г.

Шеф-редактор:

Светлана Зиновьева,
начальник отдела по связям
с общественностью
и СМИ ФГБУ «ВНИИКР»

Выпускающий редактор:

Анна Колотиевская
e-mail: karantin_vniikr@yandex.ru

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

Швабаускене Ю.А. — заместитель
Руководителя Россельхознадзора

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

Надыкта В.Д. — академик РАСХН,
профессор, доктор технических
наук, главный научный консультант
Всероссийского НИИ биологической
защиты растений

Долженко В.И. — академик
РАН, РАСХН, профессор,
доктор сельскохозяйственных
наук, заместитель директора
Всероссийского НИИ защиты
растений

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

РЕДАКЦИЯ:

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

Волков О.Г. — начальник
отдела биометода

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

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

Копина М.Б. — начальник
научно-методического отдела
микологии и гельминтологии

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

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

Дизайн и верстка:

Ирина Гюнтнер

Корректор:

Татьяна Артемьева

Менеджер по подписке и дистрибуции:

Павел Сафронов
+7 903 505 33 23

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

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

Издатель: ООО «У-Строй»

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

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

Дата подписания в печать 18.12.2019 г. Тираж 3000 экземпляров. Подписной индекс 70195 в Каталоге Агентства «Роспечать»

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

СОДЕРЖАНИЕ CONTENT

Сигнальный перечень – 2019
Европейской и Средиземноморской организации
по карантину и защите растений

2

Взгляд на здоровье растений под другим углом
Балдиссера Джовани, координатор проекта Euphresco
в Европейской и Средиземноморской организации по карантину
и защите растений, ЕОКЗР (Париж, Франция)

4

Об участии ФГБУ «ВНИИКР» в VIII заседании
Координационного совета (КС) по карантину растений государств –
участников СНГ (г. Кишинев, Республика Молдова)
А.А. Улумиев, к.п.н., научный сотрудник отдела фитосанитарных
рисков и международного взаимодействия ФГБУ «ВНИИКР»

7

Совершенствование ПЦР-диагностики золотистой
картофельной цистообразующей нематоды
Globodera rostochiensis (Wollenweber) Skarbilovich
С.В. Сударикова, старший научный сотрудник лаборатории
гельминтологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР»
А.В. Иванов, младший научный сотрудник лаборатории гельминтологии
Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР»
Е.А. Худякова, заведующая лабораторией гельминтологии
Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР»

9

О трактовке объема таксона бодяк полевой *Cirsium arvense*
для решения фитосанитарных задач
Ю.Ю. Кулакова, к.б.н., ведущий научный сотрудник
научно-методического отдела инвазивных видов растений ФГБУ «ВНИИКР»
Ю.В. Орлова, к.б.н., старший научный сотрудник научно-методического
отдела инвазивных видов растений ФГБУ «ВНИИКР»

22

Поиск оптимального метода выделения ДНК
из образцов растений оливы европейской (*Olea europaea* L.),
инфицированных *Xylella fastidiosa* Wells et al.
И.Н. Писарева, научный сотрудник лаборатории
бактериологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР»
С.И. Приходько, заведующая лабораторией
бактериологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР»
Г.Н. Бондаренко, к.б.н., начальник ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», старший
преподаватель Агротехнического института ФГАОУ ВО «РУДН»
К.П. Корнев, к.б.н., заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР»

30

Усач Радде *Neocerambyx raddei* Blessig – угроза дубравам
европейской России
А.В. Шамаев, старший научный сотрудник отдела лесного карантина
ФГБУ «ВНИИКР»

36

Striga hermonthica (Del.) Benth. – опасная красавица из Африки
Н.В. Цинкевич, младший научный сотрудник научно-методического
отдела филиала ФГБУ «ВНИИКР» в Республике Крым
Ю.Ю. Кулакова, к.б.н., ведущий научный сотрудник научно-
методического отдела инвазивных видов растений ФГБУ «ВНИИКР»

53

Научно-практическая экспедиция ФГБУ «ВНИИКР»
в Республику Кения
Я.Н. Коваленко, к.б.н., старший научный сотрудник НМО энтомологии
ФГБУ «ВНИИКР»
Н.В. Цинкевич, младший научный сотрудник научно-методического
отдела филиала ФГБУ «ВНИИКР» в Республике Крым
С.Ю. Муханов, научный сотрудник отдела организации МСИ
ФГБУ «ВНИИКР»

58

Seeing Plant Health from a New Perspective
Baldissera Giovani, Euphresco Coordinator at European
and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO),
Paris, France

6

On the Participation of the FGBU “VNIICR” in the VIIIth Meeting
of the Coordination Council (CC) for Plant Quarantine
of CIS Member States (Chisinau, Republic of Moldova)
A.A. Ulumiev, PhD in Pedagogics, Researcher of the Pest Risk
and International Cooperation Department, FGBU “VNIICR”

8

PCR Diagnostics to Enhance Detection
of *Globodera rostochiensis* (Wollenweber)
Skarbilovich
S.V. Sudarikova, Senior Researcher of the Helminthology
Laboratory of the Laboratory Testing Center of FGBU “VNIICR”
A.V. Ivanov, Junior Researcher of the Helminthology Laboratory
of the Testing Laboratory Center of FGBU “VNIICR”
E.A. Khudiakova, Head of the Helminthology Laboratory of the Laboratory
Testing Laboratory Center of the FGBU “VNIICR”

16

Interpretation of the Taxonomic Scope of *Cirsium arvense*
for Solving Phytosanitary Issues
Y.Y. Kulakova, PhD in Biology, Leading Researcher of the Invasive Plant
Species Department of FGBU “VNIICR”
Y.V. Orlova, PhD in Biology, Senior Researcher of the Invasive Plant Species
Department of FGBU “VNIICR”

26

Searching for the Optimal Method of DNA
Extraction from Samples of *Olea europaea* L. Plants Infected
with *Xylella fastidiosa* Wells et al.
I.N. Pisareva, Researcher of Bacteriology Laboratory
of the LTC of FGBU “VNIICR”
S.I. Prikhodko, Head of the Bacteriology Laboratory
of the LTC of FGBU “VNIICR”
G.N. Bondarenko, PhD in Biology, Head of the Laboratory Testing Center of FGBU
“VNIICR”, Senior Lecturer, Agrotechnical Institute of Russian Peoples’ Friendship University
K.P. Kornev, PhD in Biology, Deputy Director of FGBU “VNIICR”

33

Chestnut Trunk Borer *Neocerambyx raddei* Blessig – a Threat to the Oak
Forests of the European Part of Russia
A.V. Shamaev, Senior Researcher of the Forest Quarantine Department
of FGBU “VNIICR”

45

Striga hermonthica (Del.) Benth. – Dangerous Beauty from Africa
N.V. Tsinkevich, Junior Researcher of the Research and Methodology
Department of the Crimean Branch of FGBU “VNIICR”
Y.Y. Kulakova, PhD in Biology, Leading Researcher of the Invasive Plant Species
Department of FGBU “VNIICR”

55

Research Expedition of FGBU “VNIICR”
to the Republic of Kenya
Ya.N. Kovalenko, PhD in Biology, Senior Researcher of the Research
and Methodology Department for Entomology of FGBU “VNIICR”
N.V. Tsinkevich, Junior Researcher of the Research and Methodology Department
of Crimean Branch of FGBU “VNIICR”
S.Yu. Mukhanov, Researcher of the Department for Interlaboratory Comparison
Testing of FGBU “VNIICR”

62

СИГНАЛЬНЫЙ ПЕРЕЧЕНЬ – 2019 ЕВРОПЕЙСКОЙ И СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ПО КАРАНТИНУ И ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

Сигнальный перечень Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР) предназначен для оперативного оповещения стран – членов организации о новых вредных организмах, которые могут представлять опасность для растительных ресурсов, экономики и природы стран региона.

В отличие от перечней вредных организмов, рекомендуемых для регулирования в качестве карантинных вредных организмов (Перечни А1 и А2 ЕОКЗР), Сигнальный перечень не является основанием для регулирования вредных организмов, то есть для проведения каких-либо фитосанитарных действий, кроме мониторинга.

Вредные организмы – кандидаты для включения в Сигнальный перечень – отбираются Секретариатом ЕОКЗР главным образом по предло-

жениям национальных организаций по карантину и защите растений стран-членов (НОКЗР), а также в результате сканирования информации Секретариатом ЕОКЗР. Основанием для включения в Сигнальный перечень являются, как правило, неоднократные перехваты вредных организмов в импортируемой продукции или новые очаги, зарегистрированные в регионе ЕОКЗР или в других частях мира, сообщения о быстро распространяющихся или новых вредных организмах. В Сигнальный перечень включаются вредные организмы, представляющие фитосанитарный риск для всего региона ЕОКЗР или для большинства стран.

Для каждого вредного организма из Сигнального перечня приводится информация, обосновывающая причины выбора, данные о его географическом распространении, растениях-хозяевах, вредоносно-

сти, путях проникновения и распространения для оценки потенциального риска в регионе ЕОКЗР. Информация дополняется списком источников и по возможности иллюстрациями. Собранная информация переносится в базу данных ЕОКЗР EPPO GD (https://www.eppo.int/RESOURCES/eppo_databases/global_database).

Установленный потенциальный риск является не результатом анализа фитосанитарного риска (АФР), проведенного в соответствии со стандартами ЕОКЗР серии РМ 5 по АФР, а результатом предварительной оценки Секретариатом ЕОКЗР основных элементов риска. Впоследствии некоторые вредные организмы могут быть выбраны соответствующими экспертными группами ЕОКЗР или специально сформированными экспертными рабочими группами для проведе-

Сигнальный перечень ЕОКЗР по состоянию на сентябрь 2019 года

Насекомые и клещи

Название	Растения-хозяева	Дата включения
Червец <i>Crisicoccus pini</i> (Hemiptera: Coccidae)	Сосна <i>Pinus</i> spp.	2019-01
Лубоед <i>Dendroctonus valens</i> (Coleoptera: Scolytidae)	Сосна <i>Pinus</i> spp.	2019-05
Щитовка <i>Fiorinia phantasma</i> (Hemiptera: Diaspididae)	Полифаг	2018-10
Плодожорка <i>Gymnandrosoma aurantianum</i> (Lepidoptera: Tortricidae)	Цитрусовые и другие плодовые культуры	2017-03
Дынная муха <i>Myiopardalis pardalina</i> (Diptera: Tephritidae)	Дыня <i>Cucumis melo</i> и другие тыквенные	2013-06
Долгоносик <i>Naupactus xanthographus</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Плодовые деревья	2018-02
Пилильщик <i>Neodiprion abietis</i> (Hymenoptera: Diprionidae)	Пихта <i>Abies</i> , ель <i>Picea</i> , псевдотсуга <i>Pseudotsuga</i>	2017-05
Усач <i>Saperda tridentata</i> (Coleoptera: Cerambycidae)	Вяз <i>Ulmus</i> spp.	2019-06
Паутинный клещ <i>Tetranychus mexicanus</i> (Acari: Tetranychidae)	Полифаг	2019-09
Короед <i>Xylosandrus compactus</i> (Coleoptera: Scolytidae)	Полифаг (древесные)	2017-02
Короед <i>Xylosandrus crassiusculus</i> (Coleoptera: Scolytidae)	Полифаг (древесные)	2009-03
Усач <i>Xylotrechus chinensis</i> (Coleoptera: Cerambycidae)	Шелковица <i>Morus</i> spp.	2018-08
Дрозофила <i>Zaprionus indianus</i> (Diptera: Drosophilidae)	Инжир (<i>Ficus carica</i>) и другие плодовые культуры	2016-11
Дрозофила <i>Zaprionus tuberculatus</i> (Diptera: Drosophilidae)	Полифаг (плодовые культуры)	2016-11

Нематоды

Название	Растения-хозяева	Дата включения
Нематоды <i>Meloidogyne ethiopica</i> и <i>Meloidogyne luci</i>	Полифag	2017-11
Нематода <i>Meloidogyne graminicola</i>	Рис <i>Oryza sativa</i> и другие злаковые Poaceae	2017-11

Грибы

Название	Растения-хозяева	Дата включения
Гриб <i>Neonectria neomacrospora</i>	Пихта <i>Abies</i> spp.	2017-06
Гриб <i>Raffaelea lauricola</i> и его переносчик короед (<i>Xyleborus glabratus</i>)	Авокадо <i>Persea americana</i> и другие лавровые Lauraceae	2014-05

Бактерии

Название	Растения-хозяева	Дата включения
Бактерия <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	Пуансеттия <i>Euphorbia pulcherrima</i>	2017-01

Вирусы

Название	Растения-хозяева	Дата включения
Вирус Grapevine red blotch virus	Виноград <i>Vitis vinifera</i>	2015-05
Вирус Grapevine Roditis leaf discoloration-associated virus	Виноград <i>Vitis vinifera</i>	2018-10
Вирус Tomato brown rugose fruit virus	Томат <i>Solanum lycopersicum</i> и перец <i>Capsicum</i> spp.	2019-01
Вирус Tomato leaf curl New Delhi virus	Тыквенные Cucurbitaceae и пасленовые Solanaceae	2015-06

Заболевание неизвестной этиологии

Название	Растения-хозяева	Дата включения
Beech leaf disease	Бук <i>Fagus crenata</i> и другие виды бука <i>Fagus</i>	2019-04

Инвазионные растения

Название	Растения-хозяева	Дата включения
Альтернантера <i>Alternanthera sessilis</i>	Водно-болотные угодья, прибрежные и эстуарные местообитания, обочины дорог, посеиы и залежи	2019-03
Щирица <i>Amaranthus palmeri</i>	Пахотные земли, пустыни, автомобильные и железнодорожные сети, пустоши	2014-08
Черёда <i>Bidens subalternans</i>	Берега рек, автомобильные и железнодорожные сети, пустыри, виноградники, оливковые рощи, парки и сады	2017-08
Мимозка <i>Prosopis chilensis</i> , <i>P. glandulosa</i> , <i>P. velutina</i>	Сухие русла рек, обочины дорог, нарушенные местообитания	2018-02

ния полного или экспресс-АФР. В случае положительного заключения о фитосанитарном риске вредные организмы могут быть включены в Перечни ЕОКЗР А1 или А2 или, если в результате АФР риск будет оценен как низкий, удалены из Сигнального перечня.

Сигнальный перечень дважды в год пересматривается Экспертной группой ЕОКЗР по фитосанитарным мерам после получения информации от Экспертной группы ЕОКЗР по карантинным лесным вредным организмам, Экспертной группы ЕОКЗР по инвазионным инородным растениям и экспертных рабочих групп. Пересмотренная версия Сигнального перечня представляется для рассмотрения

Рабочей группой по фитосанитарным регламентациям, которая рекомендует включение вредных организмов в Сигнальный перечень Совету ЕОКЗР. После утверждения Советом ЕОКЗР обновленный Сигнальный перечень публикуется на официальном сайте ЕОКЗР (https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/alert_list).

Чтобы Сигнальный перечень не становился чрезмерно длинным, нахождение видов в нем обычно не поддерживается более трех лет, если не будет найдено никакой новой информации или если никаких конкретных фитосанитарных действий не было принято в регионе ЕОКЗР. По просьбе Рабочей группы ЕОКЗР по фитосанитарным регла-

ментациям и Экспертной группы ЕОКЗР по фитосанитарной информации было решено, что информация об организмах, которые ранее были включены в Сигнальный перечень ЕОКЗР, должна оставаться доступной даже после их удаления из Сигнального перечня. Как следствие, информацию, которая была доступна в момент их удаления из Сигнального перечня, т. е. краткие информационные листки о вредных организмах с указанием причин удаления (Mini data sheet), можно получить в базе данных ЕОКЗР. Для вредных организмов, которые были добавлены в Перечни А1 и А2 из Сигнального перечня ЕОКЗР, готовятся более полные информационные листки (Data sheet).



ВЗГЛЯД НА ЗДОРОВЬЕ РАСТЕНИЙ ПОД ДРУГИМ УГЛОМ

Балдиссера Джовани, координатор проекта Euphresco в Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений, ЕОКЗР (Париж, Франция)

Возможно, это трудно представить, но любая страна постоянно находится под угрозой воздействия вредных организмов, таких как вирусы, бактерии или насекомые, которые могут проникнуть в зону, свободную от них, в результате многих видов деятельности современного человека. Как только эти вредные организмы попадают в зону, они могут нанести серьезный ущерб сельскому хозяйству, окружающей среде и даже здоровью человека.

Примером может служить бактерия "*Candidatus Liberibacter solanacearum*", которая заражает различные важные культуры, включая картофель, помидоры, перец и морковь, вызывая значительные потери. В настоящее время бактерия присутствует в Северной и Южной Америке, в некоторых европейских и североафриканских странах и в Новой Зеландии. Другим примером является бактерия *Xylella fastidiosa*, которая с 2013 года была офици-

ально обнаружена в нескольких европейских странах и только в Италии ею уже заражено 22 миллиона оливковых деревьев, что причиняет местному сельскому хозяйству ущерб в размере 1,2 миллиарда евро.

В этой повседневной войне национальные организации по карантину и защите растений (в Российской Федерации – Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору) направляют огромное количество инспекторов и диагностов для проведения мониторинга, лабораторных исследований, оповещения и принятия мер против обнаруженных или недавно интродуцированных вредных организмов на основе правил и международных рекомендаций. Данные правила и рекомендации основаны на научных знаниях. Научно-исследовательская деятельность обеспечивает информацию о биологии вредных организмов, о возможных путях их проникновения в страну и дальнейшего распространения и о методах, которые позволяют однозначно идентифицировать вредные организмы, а также об эффективных методах обработки, обеспечивающих их уничтожение. Например, в Соединенном Королевстве около 1000 вредных организмов включены в Перечень карантинных объектов Великобритании, что позволяет представить, какой объем работы ежедневно выполняют люди, работающие в области фитосанитарии! К сожалению, государственный бюджет, используемый для поддержки научно-исследовательской деятель-



Liberibacter solanacearum (LIBEPS) - <https://gd.eppo.int>

Fig. 1. Zebra chip infected potato tuber *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Munyanza, USDA-ARS, Konnowac Pass, US)

Рис. 1. Картофельный клубень, зараженный *Candidatus Liberibacter solanacearum*, возбудителем заболевания «зебра чип» («Zebra chip») (с разрешения: Дж.Е. Муньянеза, Министерство сельского хозяйства США – Служба по исследованиям в области сельского хозяйства, Конноуак Пасс, США)



ности, в последние годы сокращается. Исследования также страдают от недостаточной координации усилий, поскольку каждая страна определяет исследовательские программы и финансирует исследовательскую деятельность для получения необходимых научных данных, практически не согласовывая их с другими странами. Это сделало исследования в области карантина и защиты растений «национальным вопросом», что является парадоксальным, если учесть, что наука опирается на обмен знаниями и опытом; кроме того, это приводит к дублированию усилий и отсутствию взаимодействия между усилиями стран, которые могут быть заинтересованы в решении одних и тех же проблем. Как гласит старинное изречение: «В единстве сила» («вместе мы выстоим, порознь падём»), странам необходимо укреплять сотрудничество и прилагать усилия для уменьшения разрозненности научно-исследовательской деятельности в области фитосанитарии.

В 2006 году 17 стран (Австрия, Бельгия, Болгария, Швейцария, Кипр, Чехия, Германия, Дания, Испания, Финляндия, Франция, Великобритания, Ирландия, Италия, Нидерланды, Словения, Турция) получили средства от ЕС на создание Европейской сети по координации фитосанитарных исследований и финансированию (Euphresco¹). Основной целью сети стало построение взаимного доверия и содействие сотрудничеству между людьми, которые в каждой стране отвечают за определение приоритетов исследований и финансирование исследовательской деятельности. Это нелегкая задача, если учесть языковой барьер, различия в процедурах и разницу в восприятии исследований в области здоровья растений через национальную призму. Средства ЕС использовались для содействия обмену информацией о национальных



Liberibacter solanacearum (LIBEPS) - <https://gd.eppo.int>

Fig. 2. Potato plant with zebra chip *Candidatus Liberibacter solanacearum* and psyllid yellows symptoms (Munyanza, USDA-ARS, Konnowac Pass, US)

Рис. 2. Растение картофеля с заболеванием «зебра чип» («Zebra chip») и симптомами пожелтения, связанного с насекомыми-переносчиками – листоблошками (с разрешения: Дж.Е. Муньянза, Министерство сельского хозяйства США – Служба по исследованиям в области сельского хозяйства, Конновак Пасс, США)

программах и передовым опытом в области управления процедурами; для определения общих приоритетов и целей, а также барьеров, препятствующих сотрудничеству; для разработки совместных мероприятий между программами и осуществления межнациональной исследовательской деятельности. В 2011 году второй этап финансирования от ЕС позволил активизировать работу по расширению и консолидации членства в сети. В 2014 году Euphresco превратилась в самодостаточную сеть, ответственность за которую несут входящие в нее организации. Она распространилась далеко за пределы Европы, и более 50 стран Аф-

рики, Америки, Азии, Австралии и Европы создают сеть, которая будет решать проблемы XXI века. Было профинансировано более 100 проектов по широкому кругу тем; научные цели этих проектов были различными, но со стратегической точки зрения все они способствовали сближению людей, укреплению национального исследовательского потенциала, рационализации использования национальных фондов и превращению Euphresco в форум для обсуждения проблем исследования здоровья растений и принятия оперативных мер. На войне лучше быть готовым.

¹ Более подробная информация на сайте <https://www.euphresco.net>.



SEEING PLANT HEALTH FROM A NEW PERSPECTIVE

Baldissera Giovani, Euphresco Coordinator at European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), Paris, France

You may not know it, but our country is constantly under siege. From pests, such as viruses, bacteria, or insects that can enter into an area where they are not present, through many activities of modern life. Once these pests enter or emerge in an area, they have the potential to cause serious damages to the agriculture, to the environment and even to human health.

An example is the bacterium '*Candidatus Liberibacter solanacearum*', that infects various important crops including potato, tomato, pepper and carrot causing important losses. The bacterium is currently present in the Americas, in some European and North African countries and in New Zealand. Another example is the bacterium *Xylella fastidiosa* that since 2013 has been officially detected in several European countries and in Italy only it has already infected 22 million olive trees causing damages to the local agriculture for 1.2 billion euros.

In this everyday war, an army of inspectors and diagnosticians is deployed by the national plant protection organisations (in the Russian Federation – the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance) to monitor, analyse, alert and take actions against intercepted or newly introduced pests on the basis of regulations and international recommendations. These regulations and recommendations are based on scientific knowledge. Research activities provide the knowledge on the biology of the pests, on the possible pathways through which they may

'travel' and enter into a country, on methods that allow unambiguous identification of the pests and on efficient treatments that ensure their eradication. In the United Kingdom, 1 000 pests are listed in the UK Plant Health Risk Register, which gives an idea of the amount of the work that people working in plant health undertake every day! Unfortunately, public budget used to support research activities has been decreasing over the last years. Research also suffers from a lack of coordination of efforts, as each country defines the research programmes and funds research activities to produce the needed scientific evidence with little or no concertation with other countries. This has made of plant health research 'a national matter', which is a paradox if we consider that science feeds on sharing of knowledge and expertise; also, this leads to duplication of efforts and lack of synergies between efforts of countries that may be interested on the same problems. As the old saying goes, 'united we stand, divided we fall'; countries need to strengthen cooperation and efforts are being made to reduce the fragmentation of plant health research activities. In 2006, 17 countries (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, ES, FI, FR, GB, IE, IT, NL, SI, TR) received EU funds to put the foundation of a European network for phytosanitary research coordination and funding (Euphresco¹). The main objective of the network was to build mutual trust and foster collaboration between people that in each country are responsible of defining

the research priorities and funding research activities. This is not an easy task if one thinks about the language barrier, the differences in the procedures and the different appreciation that people have when they look at plant health research through the national prism. The EU-funds were used: to favour exchange of information on national programmes and share best practices for the management of procedures; to identify common priorities and goals but also barriers that hinder cooperation; to develop joint activities between programmes and to implement trans-national research activities. In 2011, a second round of EU-funding allowed more work in order to broaden and consolidate network's membership. In 2014, Euphresco evolved into a self-sustainable network under the responsibility of its member organisations. It has expanded well beyond Europe, and more than 50 countries in Africa, America, Asia, Australia, and Europe, are building the network that will address the challenges of the XXI century. More than 100 research projects have been funded on a broad range of topics; the scientific objectives of these projects were different at each time, but from a strategic point of view they all contributed to bringing people together, strengthening national research capacity, rationalising the use of national funds and making of Euphresco a forum to discuss plant health research problems and take rapid actions. In war, you better be prepared.

¹ For more information on the network, please visit the website <https://www.euphresco.net>.

ОБ УЧАСТИИ ФГБУ «ВНИИКР» В VIII ЗАСЕДАНИИ КООРДИНАЦИОННОГО СОВЕТА (КС) ПО КАРАНТИНУ РАСТЕНИЙ ГОСУДАРСТВ – УЧАСТНИКОВ СНГ (Г. КИШИНЕВ, РЕСПУБЛИКА МОЛДОВА)

А.А. Улумиев, к.п.н., научный сотрудник отдела фитосанитарных рисков и международного взаимодействия ФГБУ «ВНИИКР»



В начале ноября 2019 года в г. Кишиневе, Республика Молдова, состоялось VIII заседание Координационного совета по карантину растений государств – участников СНГ.

В заседании приняли участие представители НОКЗР Республики Армения, Республики Беларусь, Кыргызской Республики, Республики Молдова, Российской Федерации, Республики Узбекистан, в качестве наблюдателей – Республики Азербайджан, а также представители Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений, Евразийской экономической комиссии; специалисты Исполнительного комитета СНГ и Секретариата Координационного совета по карантину растений государств – участников СНГ (директор ФГБУ «ВНИИКР» А.А. Са-

пожников, заместитель директора М.М. Абасов, научный сотрудник А.А. Улумиев).

В рамках проведения заседания Координационного совета по карантину растений государств – участников СНГ, в соответствии с Положением о КС, прошли выборы председателя Совета. Новым председателем Совета избрана заместитель генерального директора Национального агентства по безопасности пищевых продуктов Республики Молдова г-жа Малай Элла Андреевна.

На заседании Совета в соответствии с утвержденной повесткой дня обсуждались вопросы:

- о карантинном фитосанитарном состоянии территорий государств – участников СНГ в 2019 году;

- о внесении изменений в Соглашение о сотрудничестве в области карантина растений;

- о системе прослеживаемости подкарантинной продукции и интеграции ФГИС «Аргус-Фито» с информационными системами стран СНГ;

- об основных направлениях деятельности ЕОКЗР и др.

По результатам обсуждений членами Совета был принят ряд решений.

Следующее заседание Совета по предложению начальника фитосанитарной инспекции Государственной службы безопасности пищевых продуктов Министерства сельского хозяйства Республики Армения г-на Никояна Артура Гагиковича запланировано на второе полугодие 2020 года в г. Ереване.

ON THE PARTICIPATION OF THE FGBU “VNIKR” IN THE VIIIth MEETING OF THE COORDINATION COUNCIL (CC) FOR PLANT QUARANTINE OF CIS MEMBER STATES (CHISINAU, REPUBLIC OF MOLDOVA)

A.A. Ulumiev, PhD in Pedagogics, Researcher of the Pest Risk and International Cooperation Department, FGBU “VNIKR”



The VIIIth meeting of the Coordination Council for Plant Quarantine of CIS member states was held in Chisinau, Moldova, at the beginning of November 2019.

The meeting was attended by the NPPO representatives of the Republic of Armenia, the Republic of Belarus, the Kyrgyz Republic, the Republic of Moldova, the Russian Federation, the Republic of Uzbekistan, as observers – the Republic of Azerbaijan, as well as representatives of the European and Mediterranean Plant Protection Organization, the Eurasian Economic Commission; experts of CIS Executive Committee and the Secretariat of the Coordination Council for Plant Quarantine of CIS member

states (Director of FGBU “VNIKR” A.Ya. Sapozhnikov, Deputy Director M.M. Abasov, Researcher A.A. Ulumiev).

Within the framework of the meeting of the Coordination Council for Plant Quarantine of CIS member states and in compliance with the Coordination Council Regulation the election of the Chairman of the Council was held. The Deputy Director General of the National Food Safety Agency of the Republic of Moldova, Mrs. Malay Ella, was elected as a new Chairman of the Council.

At the meeting of the Council, in accordance with the approved agenda, the following issues were discussed:

- quarantine phytosanitary condition of the territories of the CIS member states in 2019,
- amendments to the Agreement on cooperation in the field of plant quarantine,
- traceability system of regulated articles and integration of FSIS “Argus-Fito” with information systems for CIS countries,
- EPPO main activities, etc.

As a result of the discussions, the Council members have taken a number of decisions.

The next meeting of the Council on the proposal of the Head of the phytosanitary inspection of the State Food Safety Service of the Ministry of Agriculture of the Republic of Armenia, Mr. Nikoyan Arthur, is scheduled for the second half of 2020 in Yerevan.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ЗОЛОТИСТОЙ КАРТОФЕЛЬНОЙ ЦИСТООБРАЗУЮЩЕЙ НЕМАТОДЫ *GLOBODERA ROSTOCHIENSIS* (WOLLENWEBER) SKARBILOVICH

С.В. Сударикова, старший научный сотрудник лаборатории гельминтологии
Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР», sudarikovah@mail.ru

А.В. Иванов, младший научный сотрудник лаборатории гельминтологии Испытательного
лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР»

Е.А. Худякова, заведующая лабораторией гельминтологии Испытательного лабораторного
центра ФГБУ «ВНИИКР»

Аннотация. Проведены апробирование и оптимизация тестов на основе полимеразной цепной реакции с использованием коммерческих наборов реагентов российского производства для выделения и амплификации ДНК картофельной цистообразующей нематоды *Globodera rostochiensis* в формате классической ПЦР с праймерами, рекомендованными Стандартом ЕОКЗР РМ 7/40 (4) [7]. Разработан способ гомогенизации цист с помощью встряхивателя для пробирок для механического лизирования MagNa Lyser (фирма «ROCHE», Швейцария). Подтверждена пригодность отечественных коммерческих наборов для данного исследования.

Ключевые слова. Карантин растений, молекулярно-генетические методы, полимеразная цепная реакция, золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis*, бледная картофельная нематода *Globodera pallida*, морфологические признаки, морфометрия, секвенирование.

Введение

Два близких вида цистообразующих нематод: золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Skarbilovich, 1959 и бледная картофельная *Globodera pallida* (Stone,

1973) Behrens, 1975 являются карантинными объектами для Российской Федерации и основной ущерб наносят картофелю. Поражают также томаты, баклажаны, некоторые виды паслена.

Центр происхождения обоих видов – нагорье Анд в Южной Америке, откуда они с картофелем были завезены в Европу, возможно, в середине XIX века. Отсюда они с семенным картофелем распространились в другие регионы. В настоящее время картофельные цистообразующие нематоды распространены в умеренных широтах на уровне моря и в тропических широтах на больших высотах. Распространение их связано с возделыванием культуры картофеля.

В 1923 году был описан вид *Heterodera rostochiensis sensu lato*. В 1973 году А.Р. Стоуном (A.R. Stone) вид был разделен на два: *Heterodera rostochiensis* и *Heterodera pallida* [9, 10]. После того как Т.С. Скарбилович выделила новый род *Globodera*, данные виды были отнесены к нему и переименованы [3].

В России ограниченно распространена только золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis*, патотип Ro1. Впервые в бывшем СССР эта нематода была обнаружена в 1948 году в Калининградской области и до 1973 года

имела название «картофельная нематода» [2]. В настоящее время (по состоянию на 1 января 2019 года) золотистая картофельная нематода встречается в 59 субъектах на площади 1,12 млн га [4].

Цикл развития золотистой и бледной картофельных нематод одинаков и типичен для рода *Globodera*. Нематода сохраняется в стадии яиц и личинок, находящихся в цистах. Весной личинки инвазируют молодые корни, питаются и превращаются в самок и самцов. Самки этого рода шарообразные с выступающим головным концом. Они продуцируют яйца, которые остаются внутри их тела. Внутренние органы самок после вызревания внутри них яиц отмирают, их кутикула утолщается, затвердевает и приобретает коричневый цвет (рис. 1). Такие отмершие самки с яйцами внутри называются цистами. В конце вегетационного периода картофеля цисты с корнями осыпаются в почву и там перезимовывают. Цисты являются источником инфекции. Основным путем распространения является почва, зараженная цистами картофельных нематод [1, 3, 6, 7], а также загрязненный семенной материал.

В последние годы в лаборатории гельминтологии Испытатель-



Fig. 1. Cysts of genus *Globodera* extracted for analysis (photo by S.V. Sudarikova)

Рис. 1. Цисты *Globodera rostochiensis*, отобранные для анализа (фото С.В. Судариковой)

ного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР» неоднократно выявлялась золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis*. Был зарегистрирован один случай выявления *Globodera pallida* в импортном материале.

Диагностика *Globodera rostochiensis* и *Globodera pallida* основывается на морфологическом и молекулярном методах. Постоянное совершенствование молекулярных методов требует новых подходов к разработке методик по выявлению и идентификации. В связи с важным экономическим значением этих нематод для культуры картофеля в 2003 году был принят Стандарт ЕОКЗР РМ 7/40 (4) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*, в 2017 году в него были внесены последние изменения [7]. В ФГБУ «ВНИИКР» в 2010 году был разработан Стандарт организации по выявлению и идентификации этих видов нематод (СТО ВНИИКР 6.001-2010 «Картофельные цистообразующие нематоды *Globodera rostochiensis* и *Globodera pallida*», где описаны морфологические и молекулярные методы, в частности, классический ПЦР-анализ, рекомендованный Стандартом ЕОКЗР РМ 7/40 (4), и ПЦР-FLASH-анализ (FLASH – Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization), разра-

ботанный ООО «АгроДиагностика» (Россия) [5, 7, 14]. Этот метод ПЦР с детекцией по «конечной точке» позволяет учитывать результаты ПЦР, не открывая пробирки, непосредственно после проведения ПЦР, что исключает возможность загрязнения ПЦР-лаборатории ампликонами.

Морфологический и морфометрический методы определения рассматриваемых видов цистообразующих нематод в некоторых случаях могут быть недостаточно точными, так как морфологические признаки разных популяций одного и того же вида могут варьировать или быть плохо различимыми на старых цистах. В этих случаях молекулярные методы являются незаменимыми. Согласно схеме проведения диагностики Стандарта ЕОКЗР и СТО ВНИИКР 6.001-2010 в случае обнаружения цист нематод с жизнеспособными яйцами и личинками необходимо проведение ПЦР-анализа. Что касается ПЦР-FLASH-анализа, то этот метод отработан и валидирован в лаборатории гельминтологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР» и филиалах. Базовые комплекты для проведения анализа ПЦР-FLASH выпускаются ООО «АгроДиагностика» в виде пробирок с готовой реакционной смесью, содержащих базовую смесь

с ВК (внутренний контроль), запечатанную парафином. Реакционная смесь объемом 35 мкл рассчитана на амплификацию 5 мкл ДНК.

Классический же метод нуждается в оптимизации с учетом реагентов, имеющихся в лаборатории, и в последующей валидации.

В СТО ВНИИКР для обоих рассматриваемых молекулярных методов описан один способ выделения ДНК – растирание пестиком в готовом ТЕ-буфере. Как показала практика, этот метод пробоподготовки в некоторых случаях не давал ожидаемого результата, высока зависимость результата от субъективного фактора (пестик не плотно соприкасается с микропробиркой, недостаточно хорошо растерта проба). Для устранения этих недостатков целесообразно использовать для гомогенизации исследуемого материала специальный прибор – встряхиватель для пробирок для механического лизирования MagNa Lyser.

Кроме того, в настоящее время российские компании предлагают широкий набор реагентов для выделения ДНК и амплификации. В частности, ЗАО «Синтол» (Россия) предлагает набор для выделения нуклеиновых кислот из тканей животных «ДНК-Экстран-2» [18]. Базовые комплекты для проведения амплификации, содержащие все необходимые компоненты, за исключением видоспецифичных олигонуклеотидов, предлагают ЗАО «Синтол», ЗАО «Евроген» (Россия), ООО «АгроДиагностика», Компания «Диалат Лтд.» (Россия) [12, 13, 14, 15]. Видоспецифичные олигонуклеотиды изготавливает ООО «Биотехиндустрия» (Lumiprobe), ЗАО «Евроген», ЗАО «Синтол».

Целью исследования являлось испытание и оптимизация способов подготовки проб и тестов классической ПЦР с доступными отечественными коммерческими наборами для эффективной идентификации золотистой и бледной картофельных нематод.

Задачи исследования

1. На основании сравнительных испытаний выявить наиболее эффективный способ выделения ДНК *Globodera rostochiensis* из цист.

2. Оптимизировать тест на основе классической ПЦР с приме-

Таблица 1. Используемые способы выделения ДНК для исследуемых цист

Шифр образца	Способ гомогенизации	Способ выделения ДНК
1	При помощи пестика	В деионизированной воде денатурацией нагреванием согласно СТО ВНИИКР 6.001-2010 (для FLASH-PCR)
2		
3	При помощи встряхивателя MagNa Lyser	
4		
5		
6	При помощи пестика	В ТЕ-буфере денатурацией нагреванием согласно СТО ВНИИКР 6.001-2010 (для FLASH-PCR)
7		
8	При помощи встряхивателя MagNa Lyser	
9		
10		
11	При помощи пестика	При помощи набора «ДНК-Экстран-2» («Синтол»), используя лизирующий раствор и протеиназу К согласно инструкции
12		
13		
14		
15		
16	При помощи пестика	В ТЕ-буфере денатурацией нагреванием согласно СТО ВНИИКР 6.001-2010 (для классической ПЦР)
17		
18	При помощи встряхивателя MagNa Lyser	
19		
20		

рами, разработанными Bulman & Marshal (1997) и рекомендованными Стандартом ЕОКЗР РМ 7/40 (4) и СТО ВНИИКР 6.001-2010, и базовыми комплектами для амплификации для выявления *Globodera rostochiensis*.

Материалы и методы

При проведении исследований использовали цисты *Globodera rostochiensis* из лизиметра ФГБУ «ВНИИКР», с картофеля восприимчивого к нематоду сорта Лорх в количестве 20 шт. Перед выделением ДНК провели идентификацию используемой для исследования нематоды морфологическим методом согласно СТО ВНИИКР 6.001-2010.

Для проведения теста классической ПЦР использовали коммерческий набор «5xScreenMix» ЗАО «Евроген» (окрашенная смесь для постановки амплификации с последующим внесением продуктов в гель) и следующие олигонуклеотиды, изготовленные по заказу в ЗАО «Евроген»:

Прямой универсальный праймер ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCTGTAACAAGG-3'), а также специфичные праймеры для *G. pallida*

(PITSp4: 5'-ACAACAGCAATCGTCGAG-3') и *G. rostochiensis* (PITSr3: 5'-AGCGCAGACATGCCGCAA-3'), которые амплифицируют фрагменты 265 bp для *G. pallida* и 434 bp для *G. rostochiensis* [7, 8].

В качестве положительного контроля использовали ДНК *Globodera rostochiensis* из лабораторной коллекции. В качестве отрицательного контроля использовали ДНК *Heterodera glycines* из лабораторной коллекции.

Морфологическое исследование перед выделением ДНК

и определение жизнеспособности

Идентификацию каждой цисты и определение жизнеспособности проводили в соответствии с СТО ВНИИКР 6.001-2010. Каждую цисту разрезали, вычищали содержимое в каплю воды и определяли под микроскопом жизнеспособность. Готовили анально-вulварную пластинку, а оставшуюся половинку цисты помещали в пробирку для последующего молекулярного анализа.

G. rostochiensis и *G. pallida* морфологически и морфометрически очень близки. Самые важные отличительные особенности цист

получены изучением перинеальной области (число кутикулярных складок между анусом и вульвой и индекс Гранека), а также размеров стилета и форм базальных головок.

Индекс Гранека – расстояние от ануса до края вульварного окна, разделенное на диаметр вульварного окна.

Самыми надежными характеристиками личинок второй стадии являются длина стилета и форма базальных вздутий.

Для анализа молекулярными методами отбирали цисты *G. rostochiensis*, содержащие жизнеспособные яйца и личинки, так как это гарантирует достоверный результат (рис. 1). Жизнеспособные личинки имели типичную червеобразную форму тела и ненарушенную структуру внутренних органов. Стоит отметить, что количество жизнеспособных личинок в цистах было различным. В образцах 1 и 5 было мало жизнеспособных личинок, много пустых яиц.

Гомогенизация с помощью MagNa Lyser

Проводили предварительные испытания для подбора оптимальных параметров. В пробирку помещали цисту, боросиликатные шарики диаметром 1 мм до уровня 0,2-0,6 мл и соответствующий раствор – деионизированную воду или ТЕ-буфер (элюирующий раствор) (объем раствора подбирали исходя из начального 80 мкл и до 120 мкл), так как объема 80 мкл, рекомендуемого в СТО ВНИИКР 6.001-2010, оказалось недостаточно для отделения супернатанта объемом 50 мкл, который рекомендует данный СТО. Встряхивали на гомогенизаторе. Параметры и режимы определяли опытным путем. Суспензию объемом более 60 мкл, полученную после гомогенизации образцов, переносили в микропробирку.

Предварительным испытанием были установлены следующие оптимальные параметры: объем боросиликатных шариков 0,5 мкл, объем раствора 110 мкл, режим встряхивания – 60 сек при скорости 3000 об/мин.

Гомогенизацию цист для выделения ДНК при помощи набора «ДНК-Экстран-2» («Синтол») проводили пестиком. Предваритель-

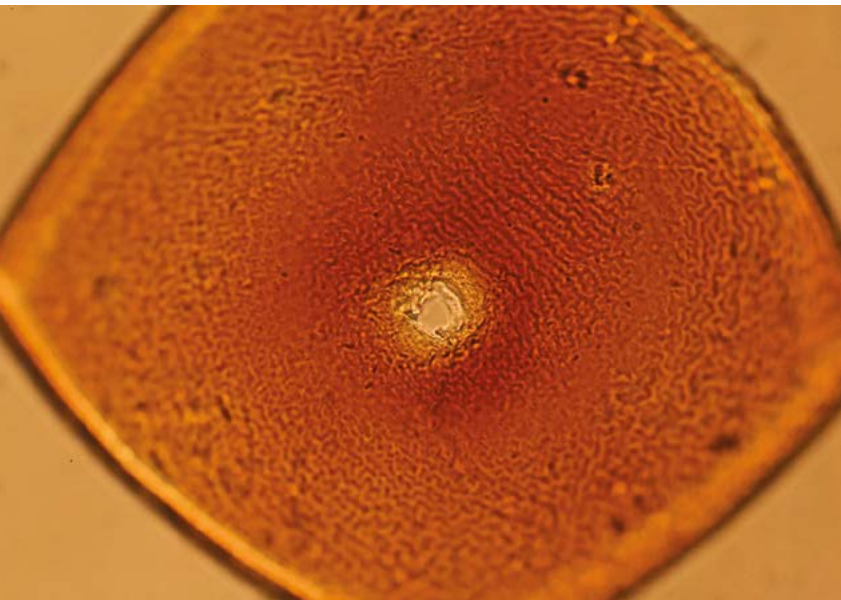


Fig. 2. Typical perineal pattern *Globodera rostochiensis* (sample 2)
(photo by S.V. Sudarikova, A.V. Ivanov)

Рис. 2. Типичная анально-вульварная пластинка цисты *Globodera rostochiensis* (образец 2)
(фото С.В. Судариковой, А.В. Иванова)



Fig. 3. Second-stage juveniles of *Globodera rostochiensis* (sample 3)
(photo by S.V. Sudarikova, A.V. Ivanov)

Рис. 3. Личинки второго возраста *Globodera rostochiensis* (образец 3)
(фото С.В. Судариковой, А.В. Иванова)

ным экспериментом гомогенизации цисты в лизирующем растворе при помощи «ДНК-Экстран-2» было установлено, что встряхивание приводит к образованию обильной пены.

Подготовка проб и выделение ДНК (табл. 1)

1. Выделение ДНК из образцов цист (шифр образца: 1-5) гомогенизацией и нагреванием до температуры денатурации белка в деионизированной воде проводили согласно СТО ВНИИКР 6.001-2010 для ПЦР-FLASH [5].

Для выделения ДНК часть цисты помещали в микропробирку объемом 1,5 мл, добавляли 40 мкл деионизированной воды. Затем образцы 1, 2 растирали пестиком вручную согласно СТО ВНИИКР 6.001-2010. Параллельно образцы 3, 4, 5 гомогенизировали с помощью MagNa Lyser. В пробирку помещали цисту, боросиликатные шарики диаметром 1 мм до уровня 0,5 мл и соответствующий раствор – деионизированную воду или ТЕ-буфер (элюирующий раствор) объемом 110 мкл. Встряхивали на гомогенизаторе 60 сек при скорости 3000 об/мин. Суспензию объемом более 60 мкл, полученную после гомогенизации образцов, переносили в микропробирку. Пробирки 1-5

помещали в термостат на 5 мин при температуре 85 °С, затем каждую пробирку встряхивали на вортексе в течение нескольких секунд и центрифугировали при скорости 13000 об/мин в течение 1 мин для осаждения частиц растертой цисты.

Затем вновь помещали в термостат при указанном режиме. В пробирки 1, 2 добавляли еще по 40 мкл деионизированной воды, встряхивали и центрифугировали. В новую пробирку переносили 50 мкл суспензии из исходной пробирки. Полученный раствор ДНК хранили при –20 °С.

2. Выделение ДНК образцов цист (шифр образца: 6-10) гомогенизацией и нагреванием до температуры денатурации белка в ТЕ-буфере проводили согласно СТО ВНИИКР 6.001-2010 для FLASH-PCR. Все процедуры проделывали как в предыдущем пункте, только растворяли ДНК не в деионизированной воде, а в ТЕ-буфере. Образцы 6, 7 гомогенизировали с помощью пестика, образцы 8, 9, 10 прибором MagNa Lyser.

3. Для выделения ДНК образцов цист (шифр образца: 11-15) коммерческим набором «ДНК-Экстран-2» ЗАО «Синтол» отобранную часть цисты гомогенизировали пестиком в микропробирке

объемом 1,5 мл в лизирующем растворе объемом 300 мкл [18].

Согласно инструкции производителя для лизиса клеток в пробирку с растертой пестиком в лизирующем растворе частью цисты добавляли 1 мкл 2-меркаптоэтанол и 10 мкл протеиназы К и оставляли на ночь в термостате при 56 °С. Белки осаждали, добавляя 100 мкл осаждающего раствора и центрифугируя 5 мин при 13000 об/мин. Затем проводили осаждение ДНК. Для этого супернатант, содержащий ДНК, переносили в полном объеме в пробирки с соосадителем ДНК (2 мкл), добавляли 300 мкл осаждающего раствора и перемешивали переверачиванием 10-12 раз до появления видимого осадка ДНК. Центрифугировали смесь при 13000 об/мин 5 мин. Осторожно сливали супернатант. Промывали осадок 400 мкл промывочного раствора, центрифугировали 2 мин при 13000 об/мин, удаляли супернатант, подсушивали пробирки. Затем растворяли ДНК в 50 мл элюирующего раствора, прогревали при 65 °С 5 мин до растворения ДНК. Полученный раствор ДНК хранили при –20 °С.

4. Выделение ДНК образцов цист (шифр образца: 16-20) гомогенизацией и нагреванием до температуры денатурации белка

в ТЕ-буфере проводили согласно СТО ВНИИКР 6.001-2010 для классической ПЦР.

Часть цисты помещали в микропробирку объемом 1,5 мл, добавляли 40 мкл ТЕ-буфера и образцы 16,17 растирали до гомогенного состояния с помощью пестика. Образцы 18, 19, 20 гомогенизировали прибором MagNa Lyser. Инкубировали 2 часа при 60 °С. Центрифугировали 10 мин при 7000 об/мин. Супернатант переносили в чистую пробирку и добавляли 40 мкл ТЕ-буфера. В образцы 18-20 ничего не добавляли. Полученный раствор ДНК хранили при –20 °С.

Измерение концентрации ДНК

Концентрацию и чистоту выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 («Thermo Fisher», США) для количественного определения

ДНК. Оценку качества экстрагированной ДНК проводили на основании измерения оптической плотности раствора ДНК при 280 и 260 и 230 нм. Для качественно очищенных образцов ДНК соотношение оптических плотностей, полученных при 260/280 нм, должно быть в интервале 1,8-2,2.

Апробация метода классической ПЦР (Bulman & Marshal, 1997) [7, 8]

При проведении исследований использовали готовый «5xScreenMix» ЗАО «Евроген», состав реакционной смеси в ходе исследования был оптимизирован: увеличен объем праймеров и тотальной ДНК.

Состав реакционной смеси: 5xScreenMix – 5 мкл, ITS₅ – 2 мкл, PITS₄ – 2 мкл, PITS₃ – 2 мкл, H₂O – 10 мкл, образец ДНК (исследуемый образец) – 4 мкл. Всего 25 мкл.

Режим амплификации: 2 минуты при 94 °С, 35 циклов по 30 сек при 94 °С, 30 сек при 60 °С, 30 сек при 72 °С, финальная элонгация – 5 мин при 72 °С.

Анализ фрагментов ДНК проводили с помощью метода горизонтального электрофореза.

После проведения электрофореза проводили секвенирование и биоинформационный анализ фрагментов ДНК. Проверку, выравнивание и редактирование последовательностей проводили с помощью программного обеспечения «BioEdit v.7.0.5.3». Сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с последовательностями базы данных Q-bank [11].

Результаты и обсуждение

В ходе морфологических исследований отобранных цист получены следующие результаты (таблица 2).

Таблица 2. Морфометрические характеристики исследуемых цист

Шифр образца	Цисты				Личинки II возраста	
	Диаметр fenестры, мкм	Расстояние анус – fenестра, мкм	Индекс Гранека	Количество складок между анусом и fenестрой	Форма бугров стилета	Длина стилета, мкм
1	18,0	70,1	3,9	18	Округлая, головки стилета оттянуты назад	21,04
2	20,5	58,7	2,9	16	- -	20,91
3	22,8	60,4	2,6	15	- -	22,24
4	19,0	55,8	2,9	17	- -	21,12
5	24,1	60,8	2,5	14	- -	21,25
6	21,7	73,1	3,4	19	- -	22,16
7	23,4	70,0	2,9	16	- -	21,2
8	19,3	53,9	2,8	15	- -	21,16
9	18,9	65,9	3,5	20	- -	23,07
10	17,0	67,9	4,0	20	- -	21,12
11	18,8	64,0	3,4	19	- -	21,04
12	21,5	77,5	3,6	19	- -	21,16
13	19,2	70,0	3,6	17	- -	23,31
14	18,6	66,7	3,6	18	- -	21,8
15	22,0	64,9	2,9	14	- -	23,80
16	24,1	72,8	3,0	20	- -	23,05
17	18,5	55,5	3,0	19	- -	22,04
18	22,9	63,4	2,7	17	- -	21,70
19	17,0	54,8	3,2	18	- -	21,04
20	23,0	78,0	3,4	19	- -	22,90
Среднее значение	20,7±3,4	65,1±12,9	3,1±0,9	17±3	- -	21,9±1,9

Таблица 3. Концентрация ДНК, измеренная на спектрофотометре NanoDrop 2000 после выделения разными методами

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280
1	0,3	ng/μl	0,006	0,003	0,196
2	12,6	ng/μl	0,252	0,202	1,25
3	12,8	ng/μl	0,258	0,158	1,69
4	5,4	ng/μl	0,109	0,059	1,85
5	2,3	ng/μl	0,046	0,031	1,44
6	6,9	ng/μl	0,138	0,108	1,29
7	22,6	ng/μl	0,451	0,367	1,23
8	6,7	ng/μl	0,135	0,090	1,51
9	8,1	ng/μl	0,161	0,096	1,68
10	4,9	ng/μl	0,097	0,060	1,59
11	3,9	ng/μl	0,078	0,037	2,16
12	3,6	ng/μl	0,072	0,029	2,51
13	7,7	ng/μl	0,154	0,070	2,21
14	3,1	ng/μl	0,060	0,032	1,94
15	4,3	ng/μl	0,085	0,042	2,07
16	5,2	ng/μl	0,104	0,085	1,23
17	11,3	ng/μl	0,227	0,184	1,23
18	5,0	ng/μl	0,099	0,082	1,20
19	4,4	ng/μl	0,088	0,078	1,13
20	5,7	ng/μl	0,114	0,100	1,14

На основании проведенных исследований был сделан вывод, что морфологические и морфометрические характеристики большинства исследуемых цист полностью соответствовали виду *Globodera rostochiensis* (рис. 2, 3). Однако некоторые образцы (3, 5, 8) имели индекс Гранека и количество складок, близкие к *Globodera pallida* (рис. 5), строение и морфометрические характеристики стилета личинки соответствовали *Globodera rostochiensis*. На практике нередко встречаются цисты с подобными характеристиками, так как некоторые популяции золотистой картофельной нематоды имеют индекс Гранека 2,2-2,5, что может соответствовать обоим видам. В этих случаях подтверждение результатов молекулярным методом с применением специфичных праймеров для *Globodera rostochiensis* и *Globodera pallida* особенно актуально.

На этапе сравнительных испытаний гомогенизации цист с помощью MagNa Lyser в деионизированной воде или ТЕ-буфере было определено, что количество раствора (воды или ТЕ-буфера) должно быть 110 мкл. При меньшем объеме недостаточно супернатанта, так как имеет место адсорбция раствора на шариках, а при большем объеме раствора уменьшается концентрация ДНК в растворе. Оптимальное количество боросиликатных шариков определили в количестве 0,5 мл в пробирке емкостью 1,5 мл. Оптимальный режим встряхивания – 60 сек при скорости 3000 об/мин. При использовании этих параметров во всех случаях произошло выделение ДНК.

Измерение концентрации ДНК показало, что в образцах 1 и 5 была очень низкая концентрация ДНК, что могло быть обусловлено малым

количеством биомассы в цистах, поэтому амплификация не произошла (таблица 3).

Во всех остальных случаях были получены положительные результаты. При выделении ДНК способом, описанным в СТО ВНИИКР 6.001-2010 для классической ПЦР, отмечены наименее наглядные результаты электрофореза (образцы 16, 17, 18, 19, 20). Кроме того, анализ полученной концентрации выделенной ДНК показал, что в растворе присутствует большое количество примесей (коэффициент 260/280 около 1,1-1,2) (таблица 2). Наилучшие результаты показал способ выделения ДНК при помощи набора «ДНК-Экстрен-2» (ЗАО «Синтол») в образцах 11, 12, 13, 14, 15 (рис. 4).

Результаты электрофореза показали, что исследуемые объекты являются цистами *Globodera rostochiensis*, размер ампликона 434 бп. Продукт ПЦР, соответствующий *Globodera pallida*, выявлен не был. Образцы 3 и 8, имеющие индекс Гранека и количество складок между анусом и вульвой, близкое к обоим рассматриваемым видам, идентифицированы как *Globodera rostochiensis*. Результаты классической ПЦР были подтверждены валидированным методом FLASH-PCR, который показал идентичные результаты во всех образцах (рис. 6, 7). Дополнительно было проведено секвенирование, процент покрытия и идентичности составил 99-100%.

Исследование показало, что все апробированные способы подготовки проб пригодны также и для использования при тестировании образцов методом FLASH-PCR.

Выводы

1. Сравнение способов гомогенизации цист в деионизированной воде и ТЕ-буфере с помощью пестика и встряхивателя MagNa Lyser не показало существенной разницы между ними. При гомогенизации цист в деионизированной воде и ТЕ-буфере с помощью встряхивателя MagNa Lyser предлагаем использовать на один образец раствор в количестве 110 мкл, объем боросиликатных шариков 0,5 мл в пробирке емкостью 1,5 мл, режим встряхивания 60 сек при скорости 3000 об/мин. Способ гомогени-

зации с помощью встряхивателя MagNa Lyser не подходит для выделения ДНК с помощью набора «ДНК-Экстран-2».

2. Все способы пробоподготовки, описанные в работе, подходят как для классического метода ПЦР, так и для FLASH-PCR. Наиболее эффективным для выделения ДНК цистообразующей картофельной нематоды *Globodera rostochiensis* признан набор «ДНК-Экстран-2» (ЗАО «Синтол»). Использование ТЕ-буфера (элюирующего раствора из коммерческого набора) для постановки классической ПЦР более предпочтительно, чем деионизированной воды.

3. Исследования с набором праймеров для мультимплексной ПЦР, рекомендованные в диагностическом протоколе РМ 7/40 (4), показали достоверные результаты. Тесты могут быть использованы при проведении лабораторных исследований. Апробированный состав реакционной смеси для постановки амплификации пригоден для использования описанным методом в мультимплексной ПЦР. Состав реакционной смеси: Master mix («Evrogen») – 5 мкл, ITS₅ – 2 мкл, PITSp₄ – 2 мкл, PITSr₃ – 2 мкл, H₂O – 10 мкл, образец ДНК (исследуемый образец) – 4 мкл. Всего 25 мкл.

Заключение

Апробированы и оптимизированы тесты на основе классической ПЦР с олигонуклеотидами, рекомендованными РМ 7/40 (4) *Globodera rostochiensis* и *Globodera pallida* и разработанными Bulman & Marshall (1997), с отечественными коммерческими наборами «ДНК-Экстран-2» (ЗАО «Синтол») и «5xScreenMix» (ЗАО «Евроген»). Подтверждена пригодность этих коммерческих наборов для выделения ДНК и базовых комплектов для амплификации.

Литература

1. Буторина Н.Н., Зиновьева С.В., Кулинич О.А. и др. 2006. Прикладная нематология. М.: Наука. 350 с.
2. Ефременко Т.С., Боровикова А.Н., Дудик О.Р., Гуськова Л.А., Маковская С.А. 1988. Инструкция по выявлению золотистой и бледной картофельных нематод и мерам борьбы с ними. М.: Агропромиздат. 47 с.

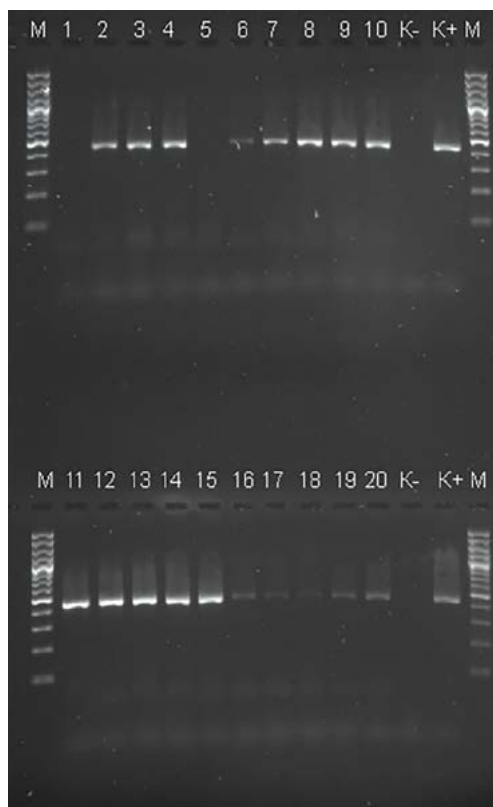


Fig. 4. Results of PCR with specific primers and different sample preparation techniques

Рис. 4. Результаты ПЦР со специфичными праймерами и разными способами пробоподготовки

3. Лиманцева Л.А. Золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis* в Северо-Западном регионе РФ: состав популяции, источники и доноры устойчивости. Автореф. диссерт... канд биол. наук, СПб., 2010.

4. Национальный доклад о карантинном фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации в 2017 году.

5. СТО ВНИИКР 6.001-2010 «Картофельные цистообразующие нематоды *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens и *Globodera pallida* (Stone) Behrens. Методы выявления и идентификации».

6. Фитопаразитические нематоды России. 2012. Под ред. С.В. Зиновьевой, В.Н. Чижова. М.: Товарищество научных изданий КМК.

7. Bulletin OEPP/EPPO, v. 47. 2017. Диагностический протокол ЕОКЗР для регулируемых вредных организмов; Золотистая и бледная картофельные цистообразующие нематоды *Globodera rostochiensis*

& *Globodera pallida* РМ 7/40 (4): 174-197.

8. Bulman S.R., Marshall J.W. 1997. Differentiation of Australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 25: 123-129.

9. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cabi.org/cpc/datasheet/27033>.

10. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cabi.org/cpc/datasheet/27034>.

11. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.q-bank.eu/Nematodes/> База данных по диагностике вредных организмов

12. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.syntol.ru>

13. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://evrogen.ru>.

14. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.agrodiagnostica.ru>.

15. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://dialat.ru>.

Способы пробоподготовки:

1-5 – в деионизированной воде;
6-10 – в ТЕ-буфере (для FLASH-PCR);
11-15 – при помощи набора «ДНК-ЭКСТРАН-2»;
16-20 – в ТЕ-буфере (для классической ПЦР);
М – маркер молекулярной размерности от 100 до 3000;
К – контроль
H. glycines;
К+ – контроль
G. rostochiensis

DNA sample preparation methods:

1-5 – in deionized water;
6-10 – in TE buffer (for FLASH-PCR);
11-15 – using kit DNK-Ekstran-2;
16-20 – in TE buffer (for conventional PCR);
M – marker from 100 up to 3000;
K – control *H. glycines*;
K+ – control *G. rostochiensis*

IMPROVEMENT OF PCR DIAGNOSTICS FOR DETECTION OF *GLOBODERA ROSTOCHIENSIS* (WOLLENWEBER) SKARBILOVICH

S.V. Sudarikova, Senior Researcher of the Helminthology Laboratory of the Testing Laboratory Center of FGBU "VNIKR"

A.V. Ivanov, Junior Researcher of the Helminthology Laboratory of the Testing Laboratory Center of FGBU "VNIKR"

E.A. Khudiakova, Head of the Helminthology Laboratory of the Testing Laboratory Center of FGBU "VNIKR"

Abstract. Test validation and optimization were performed based on polymerase chain reaction (PCR) using Russian commercial kits of reagents designed for DNA extraction and amplification of potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* in the format of conventional PCR containing primers recommended in the EPPO Standard PM 7/40 (4). Cyst homogenization method using a shaker for tubes MagNa Lyser (the ROCHE Company, Switzerland) was developed to perform mechanic lysing. Domestically produced commercial kits were found to be efficient for this assay.

Keywords. Plant quarantine, molecular-genetic methods, polymerase chain reaction, golden potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*, pale potato cyst nematode *Globodera pallida*, morphology characteristics, morphometrics, sequencing.

Introduction

The two closely related species golden potato nematode *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Skarbilovich, 1959 and pale potato nematode *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975 are considered to be of quarantine significance for the Russian Federation and cause major damage to potato crops. Tomato, aubergine and other *Solanum* spp. are also attacked.

The center of origin of the two species is in the Andes Mountains in South America from where they were

introduced to Europe with potatoes, probably in the mid-19th century. From there, they were spread with seed potatoes to other areas. The present distribution covers temperate zones down to sea level and in the tropics at higher altitudes. In these areas, distribution is linked with that of the potato crop.

In 1923, *Heterodera rostochiensis* sensu lato was described as a separate species. In 1973, A.R. Stone divided the species into two species: *Heterodera rostochiensis* and *Heterodera pallida* [9, 10]. After Skarbilovich erected the subgenus *Globodera*, both species were assigned to this subgenus and renamed [3]. Golden potato nematode *Globodera rostochiensis*, pathotype Ro1 is only limited in distribution in Russia. This nematode was first reported in the USSR in 1948 in Kaliningrad Region and until 1973 it was called potato nematode [2]. At present, as of January 1, 2019, golden potato nematode is spread in 59 constituent entities of the Russian Federation on a total area of 1.12 million ha [4].

Life cycle of golden and pale potato nematodes is similar and typical for the genus *Globodera*. Nematode remains in the stage of eggs and juveniles within cysts. In spring, the juveniles invade young roots, feed and develop into a male or a female. The females of this genus are spherical with projecting head tip. They produce eggs which remain in their bodies. After eggs mature inside the females their inner organs die, the

cuticle becomes thick, tough and turns brown (Fig. 1). Such dead females with eggs inside are called cysts. Towards the end of the growing season cysts fall off into the soil and overwinter there. Cysts can be a source of infection. The main routes of spread are movement of soil infected by potato cyst nematodes [1, 3, 6, 7] and infected seed potatoes.

For the past years, golden potato nematode *Globodera rostochiensis* has been repeatedly detected by the Helminthology Laboratory of the Laboratory Testing Center of the FGBU "VNIKR". *Globodera pallida* was only detected once in the imported material.

Diagnostics of *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* is based on the morphological and molecular methods. Continuous enhancement of molecular methods requires new approaches for the development of detection and identification techniques. Due to huge economic impact of these nematodes on potato production the EPPO Standard PM 7/40 (4) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* was adopted in 2003. The latest revision took place in 2017 [7]. In 2010, the FGBU "VNIKR" developed the Organization Standard on detection and identification of these nematode species (the Organization Standard of VNIKR 6.001-2010 "Potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*" which covered morphological and molecular

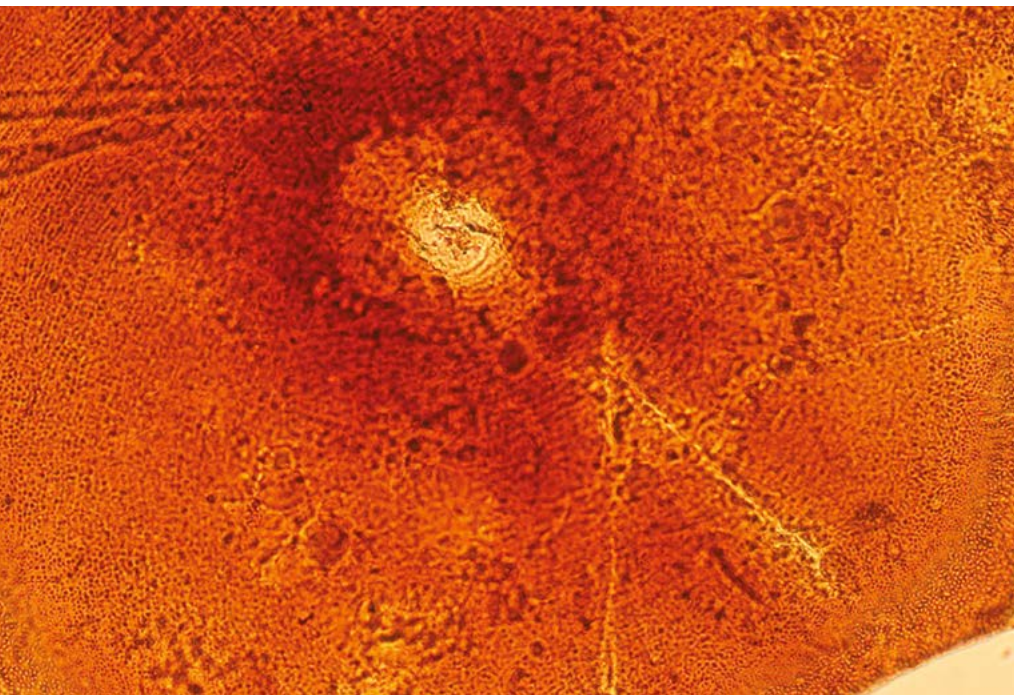


Рис. 5. Вариация анально-вульварной пластинки цисты (образец 8)
(фото С.В. Судариковой, А.В. Иванова)

Fig. 5. Perineal pattern (sample 8) (photo by S.V. Sudarikova, A.V. Ivanov)

methods, in particular, conventional PCR-based analysis recommended in the EPPO Standard PM 7/40 (4) and PCR-FLASH-analysis (FLASH – Fluorescent Amplification-based Specific Hybridization) developed by AgroDiagnostika, LLC (Russia) [5, 7, 14]. This PCR method with detection at the end-point provides the ability to view the results without the need to open the tube immediately after PCR is completed which prevents amplicon contamination in the PCR laboratory.

Occasionally, in this assay the morphological and morphometric identification methods of cyst nematodes may not be precise due to difference in morphological characteristics of different populations within the same species as they may vary or may not be clearly visible on old cysts. In such cases, molecular methods are more reliable. According to the scheme of diagnostic procedure of the EPPO Standard and the Organization Standard of VNIKR 6.001-2010 in case of detection of nematode cysts containing viable eggs and juveniles, PCR-based analysis is required. As regards to the PCR-FLASH-analysis, this method was developed and validated by the Helminthology Laboratory of the Laboratory Testing Center of the FGBU “VNIKR” as well as by its branches.

AgroDiagnostika, LLC (Russia) produces standard PCR-FLASH kits consisting of tubes with ready-to-use reaction mix containing master mix with internal control sealed with paraffin. 35 µm reaction mix is designed for amplification of 5 µm of DNA.

Conventional method requires optimization taking into consideration the reagents available in the laboratory and further validation.

The Organization Standard of VNIKR 6.001-2010 provide description of only one DNA extraction method – crushing with a pestle in a ready-to-use TE buffer. In practice, in some cases reliable results could not be obtained using this sample preparation method because of subjective factor (i.e. during crushing the pestle is not touching the microtube close enough and the sample is not sufficiently crushed). To avoid those impediments, homogenization of the sample material should be performed using a special instrument MagNa Lyser, a shaker for tubes designed for mechanical lysing.

In addition, at present Russian companies offer a wide variety of reagents for DNA extraction and amplification. In particular, ZAO Sintol (Russia) offers a kit DNK-Ekstran-2 [18] for extraction of nucleic acids from animal tissues. Standard amplification kits containing all necessary components

with the exception of species-specific oligonucleotides are offered by ZAO Sintol, Evrogen Joint Stock Company (Russia), AgroDiagnostika, LLC, Dialat Ltd. (Russia) [12, 13, 14, 15]. Biotech Industry Ltd. (Lumiprobe Corporation), Evrogen Joint Stock Company, ZAO Sintol manufacture species-specific oligonucleotides.

The objective of this assay was to test and optimize sample preparation methods and conventional PCR-based methods using available domestically produced commercial kits for effective identification of golden and pale potato nematodes.

Objectives

1. To identify the most effective DNA extraction method from *Globodera rostochiensis* cysts based on the comparative tests.

2. Optimize the test based on the conventional PCR primers, developed by Bulman & Marshal (1997) and recommended in the EPPO Standard PM 7/40 (4), the Organization Standards of VNIKR 6.001-2010, and standard amplification kits designed for detection of *Globodera rostochiensis*.

Materials and methods

For this assay 20 pcs *Globodera rostochiensis* cysts from the lysimeter of the FGBU “VNIKR” were used. Cysts were collected from the variety Lorkh, susceptible to the nematode. Prior to DNA extraction the identification of the nematode was performed using the morphological method according to the Organization Standard of VNIKR 6.001-2010.

In order to conduct a conventional PCR test a commercial kit 5xScreen-Mix produced by Evrogen Joint Stock Company (containing colored mix for amplification for further injection of products into gel) was used together with the following oligonucleotides produced per order of Evrogen Joint Stock Company.

Universal primer ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAA-GG-3'), and *G. pallida*-specific primer (PITSp4: 5'-ACAACAGCAATCGTCGAG-3') and *G. rostochiensis*-specific primer (PITSr3: 5'-AGCGCAGACATGCCGCAA-3'), to perform amplification of fragments 265 bp for *G. pallida* and 434 bp for *G. rostochiensis* [7, 8].

Molecular-genetic assay

Table 1. Types of DNA extraction methods used for cysts

Specimen key	Homogenization methods	DNA extraction method
1	Using pestle	In deionized water by denaturation and heating according to the Organization Standard of VNIKR 6.001-2010 (for FLASH-PCR)
2		
3		
4	Using MagNa Lyser shaker	Denaturation and heating in TE buffer according to the Organization Standard of VNIKR 6.001-2010 (for FLASH-PCR)
5		
6		
7	Using pestle	Using kit DNK-Ekstran-2 (produced by Sintol), applying lysing solution and Proteinase K according to instruction
8		
9		
10	Using MagNa Lyser shaker	Denaturation and heating in TE buffer according to the Organization Standard of VNIKR 6.001-2010 (for conventional PCR)
11		
12		
13	Using pestle	Using kit DNK-Ekstran-2 (produced by Sintol), applying lysing solution and Proteinase K according to instruction
14		
15		
16	Using pestle	Denaturation and heating in TE buffer according to the Organization Standard of VNIKR 6.001-2010 (for conventional PCR)
17		
18		
19	Using MagNa Lyser shaker	
20		

DNA of *Globodera rostochiensis* from the laboratory collection was used as a positive control. DNA of *Heterodera glycines* from the laboratory collection was used as a negative control.

Morphological assay prior to DNA extraction and assessment of viability

Identification of a single cyst and assessment of viability was performed in accordance with the Organization Standard of VNIKR 6.001-2010. Each cyst was individually dissected, the contents of the cyst were cleaned out in a drop of water, cyst viability was assessed under the microscope. Perineum was prepared, the remainder half of the cyst was placed in the tube for further molecular analysis.

G. rostochiensis and *G. pallida* are morphologically and morphometrically closely related. For cysts, the most important diagnostic differences are in the perineal area (the number of cuticular ridges between the vulva and anus and Granek's ratio) as well as stylet length and stylet knobs shape.

Granek's ratio is the distance from anus to the margin of vulval fenestra

divided by diameter of vulval fenestra.

Stylet length and stylet knobs shape of the second-stage juveniles are the most reliable identification characteristics.

In order to obtain valid results *G. rostochiensis* cysts containing viable eggs and juveniles were used for the molecular analysis (Fig. 1). Viable juveniles had typical worm-like shape and intact structure of internal organs. It is worth mentioning that the amount of viable juveniles in cysts was different. Samples 1 and 5 contained fewer viable juveniles and more empty eggs.

Homogenization using MagNa Lyser

A preliminary test was conducted to determine the optimal parameters. Cyst and 1 mm glass balls were placed in a tube containing 80 µm – 120 µm of deionized water or TE buffer (elution solution) to make it 0.2-0.6 ml. The volume of the solution was determined starting from 80 µm up to 120 µm as 80 µm recommended in the Organization Standard of VNIKR 6.001-2010, proved to be insuffi-

cient to extract 50 µm of supernatant prescribed by this Organization Standard. Homogenizer was used to shake the tube. Parameters and operational mode were experimentally determined. Suspension with volume more than 60 µm obtained after sample homogenization was transferred to a microtube.

Preliminary test results showed that the following optimal parameters were determined: volume of glass balls 0,5 µm, solution volume 110 µm, vortex time 60 sec, vortex speed 3000 rpm.

DNK-Ekstran-2 (produced by Sintol) was utilized to homogenize cysts using pestle for DNA extraction. During cyst homogenization in a lysing solution using kit DNK-Ekstran-2 the preliminary test revealed that shaking causes excessive foaming.

Sample preparation and DNA extraction (Table 1)

1. DNA extraction from cyst samples (sample ID: 1-5) using homogenization and heating until protein denaturation in deionized water occurs in accordance with the Organization Standard of VNIKR 6.001-2010 applicable for FLASH-PCR [5].

To perform DNA extraction a part of cyst was placed in 1.5 ml microtube containing 40 µm deionized water. Then samples 1, 2 were ground by hand with pestle according to the Organization Standard of VNIKR 6.001-2010. The samples 3, 4, 5 were simultaneously homogenized using MagNa Lyser. Cyst and 1 mm glass balls were placed in a tube containing 110 µm deionized water or TE buffer (elution solution) to make it 0.5 ml. After that the tubes were shaken using homogenizer for 60 sec at 3000 rpm. 60 µm suspension obtained after samples homogenization was transferred to a microtube. The tubes 1-5 were placed in a thermostat for 5 min at 85 °C, then each tube was vortex mixed for several seconds and centrifuged at 13000 rpm for 1 min to precipitate particles of ground cyst.

After that the tubes were again placed in a thermostat according to the same protocol. 40 µm deionized water was added to 1.2 tubes, tubes were shaken and centrifuged. 50 µm of suspension from the original tube was transferred to a new tube. The crude DNA extract was stored at –20 °C.

Table 2. Morphometrics of diagnostic characters of cysts

Sample ID	Cysts				Second-stage juveniles	
	Fenestra diameter, μm	Distance from anus to fenestra, μm	Granek's ratio	Number of cuticular ridges between anus and fenestra	Stylet knobs shape	Stylet length, μm
1	18.0	70.1	3.9	18	Rounded, backward slop of stylet head tips	21.04
2	20.5	58.7	2.9	16	- -	20.91
3	22.8	60.4	2.6	15	- -	22.24
4	19.0	55.8	2.9	17	- -	21.12
5	24.1	60.8	2.5	14	- -	21.25
6	21.7	73.1	3.4	19	- -	22.16
7	23.4	70.0	2.9	16	- -	21.2
8	19.3	53.9	2.8	15	- -	21.16
9	18.9	65.9	3.5	20	- -	23.07
10	17.0	67.9	4.0	20	- -	21.12
11	18.8	64.0	3.4	19	- -	21.04
12	21.5	77.5	3.6	19	- -	21.16
13	19.2	70.0	3.6	17	- -	23.31
14	18.6	66.7	3.6	18	- -	21.8
15	22.0	64.9	2.9	14	- -	23.80
16	24.1	72.8	3.0	20	- -	23.05
17	18.5	55.5	3.0	19	- -	22.04
18	22.9	63.4	2.7	17	- -	21.70
19	17.0	54.8	3.2	18	- -	21.04
20	23.0	78.0	3.4	19	- -	22.90
Mean	20.7 $\pm$ 3.4	65.1 $\pm$ 12.9	3.1 $\pm$ 0.9	17 $\pm$ 3	- -	21.9 $\pm$ 1.9

2. DNA extraction from cyst samples (sample ID: 6-10) using homogenization and heating until protein denaturation in TE buffer occurs in accordance with the Organization Standard of VNIKR 6.001-2010 applicable for FLASH-PCR. All protocols were identical to the protocols in the preceding clause, with only exception that the DNA was dissolved in TE buffer, not in deionized water. Samples 6, 7 were homogenized with pestle, samples 8, 9, 10 were homogenized using MagNa Lyser.

3. To extract DNA from cysts (sample ID: 11-15) using a commercial kit DNK-Ekstran-2 produced by ZAO Sintol, collected part of cyst was homogenized with pestle in a 1.5 ml microtube in 300 μm lysing solution [18].

According to the manufacturer's instruction for cell lysis 1 μM 2-Mercaptoethanol and 10 μM proteinase were added to the tube containing a part of cyst ground with pestle and lysing solu-

tion, and left overnight in thermostat at 56 °C. The proteins were precipitated in 100 μm precipitation solution and centrifuged at 13000 rpm for 5 min. Then supernatant containing DNA was transferred to the tubes containing 2 μM DNA coprecipitation agent, 300 μm precipitation solution was added, then tumbled 10-12 times until DNA precipitation is visible. The supernatant was carefully pored off, the precipitation was rinsed with 400 μm wash solution, centrifuged for 2 min at 13000 rpm, the supernatant was removed, the tubes were dried. Then the DNA was dissolved in 50 μl of elution solution by heating up to 65 °C for 5 min until complete dissolution. The crude DNA extract was stored at -20 °C.

4. DNA extraction from cyst samples (sample ID: 16-20) through homogenization and heating up to denaturation temperature of protein in TE buffer was performed according to the Organization Standard of VNIKR

6.001-2010 applicable for conventional PCR.

Part of cyst was placed in a 1.5 ml tube, 40 μM TE buffer was added, samples 16, 17 were homogenized with a pestle. Samples 18, 19, 20 were homogenized using MagNa Lyser, incubated at 60 °C for 2 hours, centrifuged at 7000 rpm for 10 min. The supernatant was transferred to a clean tube and TE buffer was added. Nothing was added in samples 18-20. The crude DNA extract was stored at -20 °C.

Calculation of DNA concentration

DNA purity and concentration was measured using spectrophotometer NanoDrop 2000 (Thermo Fisher, USA) for DNA quantification. Purity of extracted DNA was estimated by measuring the optical density of DNA solution at 280 and 260 and 230 nm. Good-quality DNA will have an A260/A280 ratio of 1.8-2.2.

Validation of conventional PCR method

(Bulman & Marshal, 1997) [7, 8]

For this assay a commercial kit for DNA amplification 5xScreenMix produced by Evrogen Joint Stock Company was used.

Reaction mix was optimized with higher primer concentration and genomic DNA.

Composition of reaction mix: 5xScreenMix – 5 µm, ITS₅ – 2 µm, PIT-Sp₄ – 2 µm, PIT-Sr₃ – 2 µm, H₂O – 10 µm, DNA sample (test sample) – 4 µm. Totally 25 µm.

Amplification cycle conditions: 2 min at 94 °C, cycled 35 times at 94 °C for 30 sec, 30 sec at 60 °C, 30 sec at 72 °C, final elongation 5 min at 72 °C.

DNA fragments analysis was performed using horizontal electrophoresis.

Sequencing and bioinformatic analysis of DNA fragments was conducted after completion of electrophoresis. BioEdit software (version 7.0.5.3) was used to check, sequence and edit alignments. The obtained sequences were compared with known sequences in Q-bank database [11].

Results and discussion

The following results were received during the assay of morphological features of collected cysts (Table 2).

Based on the assay, it was concluded that the morphological and morphometric characters of the majority of examined cysts agreed with species *Globodera rostochiensis* (Fig. 2, 3). However, some samples (3, 5, 8) showed that their Granek's ratio and number of cuticular ridges are similar to those of *Globodera pallida* (Fig. 5), morphological and morphometric characters of stylet of the juvenile agreed with *Globodera rostochiensis*. In practice, cysts with similar characteristics are common because some populations of potato cyst nematode have Granek's ratio of 2.2-2.5 that fit well within ranges of both species. In this case, it is very useful to verify results through molecular identification of *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* using specific primers.

During comparative tests when cysts were homogenized using MagNa Lyser in deionized water or TE buffer, it was determined that the volume of solution (water or TE buffer) should

Table 3. DNA concentration calculated by spectrophotometer NanoDrop 2000 after extraction using different methods

Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280
1	0.3	ng/µl	0.006	0.003	0.196
2	12.6	ng/µl	0.252	0.202	1.25
3	12.8	ng/µl	0.258	0.158	1.69
4	5.4	ng/µl	0.109	0.059	1.85
5	2.3	ng/µl	0.046	0.031	1.44
6	6.9	ng/µl	0.138	0.108	1.29
7	22.6	ng/µl	0.451	0.367	1.23
8	6.7	ng/µl	0.135	0.090	1.51
9	8.1	ng/µl	0.161	0.096	1.68
10	4.9	ng/µl	0.097	0.060	1.59
11	3.9	ng/µl	0.078	0.037	2.16
12	3.6	ng/µl	0.072	0.029	2.51
13	7.7	ng/µl	0.154	0.070	2.21
14	3.1	ng/µl	0.060	0.032	1.94
15	4.3	ng/µl	0.085	0.042	2.07
16	5.2	ng/µl	0.104	0.085	1.23
17	11.3	ng/µl	0.227	0.184	1.23
18	5.0	ng/µl	0.099	0.082	1.20
19	4.4	ng/µl	0.088	0.078	1.13
20	5.7	ng/µl	0.114	0.100	1.14

be 110 µm. Smaller volume of solution requires more supernatant due to adsorption of solution onto glass balls. Adding more solution leads to decrease of DNA concentration in the solution. It was determined that optimal amount of glass balls should be 0.5 ml in a 1.5 ml tube. Optimal vortex is 60 sec at 3000 rpm. DNA extraction occurred in all cases if the above parameters had been met.

Measuring DNA concentration demonstrated low DNA concentration in samples 1 and 5 that is likely due to low biomass in cysts, therefore amplification did not occur (Table 3).

In all other cases positive results were received. During DNA extraction according to the method described in the Organization Standard of VNIIR 6.001-2010 applicable for conventional PCR, unclear results were obtained after the electrophoresis had been completed (samples 16, 17, 18, 19, 20). In addition, a large amount of impurities (A260/A280 ratio of ~1,1-1,2) were found in the solution after assessment of concentration of the extracted DNA. The best results were obtained after DNA extraction using kit DNK-Ekstran-2

(produced by ZAO Sintol) in samples 11, 12, 13, 14, 15 (Fig. 4).

Results of electrophoresis demonstrated that examined objects were *Globodera rostochiensis* cysts, amplicon size is 434 bp. PCR product similar to *Globodera pallida* was not identified. Samples 3 and 8 with Granek's ratio and a number of cuticular ridges between anus and vulva closely related to examined species were identified as *Globodera rostochiensis*. The results of conventional PCR were validated by FLASH-PCR method which revealed identical results for all samples (Fig. 6, 7). Additionally, sequencing was performed which showed 99-100% cover ratio and similarity.

The assay demonstrated that all validated sample preparation methods are also effective for testing using FLASH-PCR method.

Conclusions

1. When comparing cyst homogenization using either pestle or MagNa Lyser shaker in deionized water and TE buffer, cysts did not show considerable difference. For cyst homogenization using MagNa Lyser shaker



Рис. 6. Результаты исследования образцов 1-15 методом FLASH-PCR

Fig. 6. Results of 1-15 samples assay based on FLASH-PCR method

in deionized water and TE buffer, per one sample we recommend to use solution – 110 μ m, glass balls – 0,5 ml in a 1,5 ml tube, shake for 60 seconds at 3000 rpm. Homogenization method using MagNa Lyser shaker does not work for DNA extraction using kit DNK-Extran-2.

2. All sample preparation methods described in this work are applicable for both conventional PCR and FLASH-PCR. Kit DNK-Extran-2 (produced by ZAO Sintol) proved to be most effective for DNA extraction

of potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. Use of TE buffer (elution solution from a commercial kit) is the better option for conventional PCR compared to deionized water.

3. Multiplex PCR tests consisting of primer sets, recommended in diagnostic protocol PM 7/40 (4), demonstrated reliable results. These tests can be used in diagnostic laboratories. Validated composition of the reaction mix designed for amplification is suitable for use in multiplex PCR tests described above. Composition

of the reaction mix: Master mix (Evrogen Joint Stock Company) – 5 μ m, ITS₅ – 2 μ m, PITSp₄ – 2 μ m, PITSr₃ – 2 μ m, H₂O – 10 μ m, DNA sample (test sample) – 4 μ m. Total 25 μ m.

Conclusion

Conventional PCR-based tests using oligonucleotides, recommended in PM 7/40 (4) *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*, were validated and optimized. These tests, developed by Bulman & Marshal (1997), were performed using

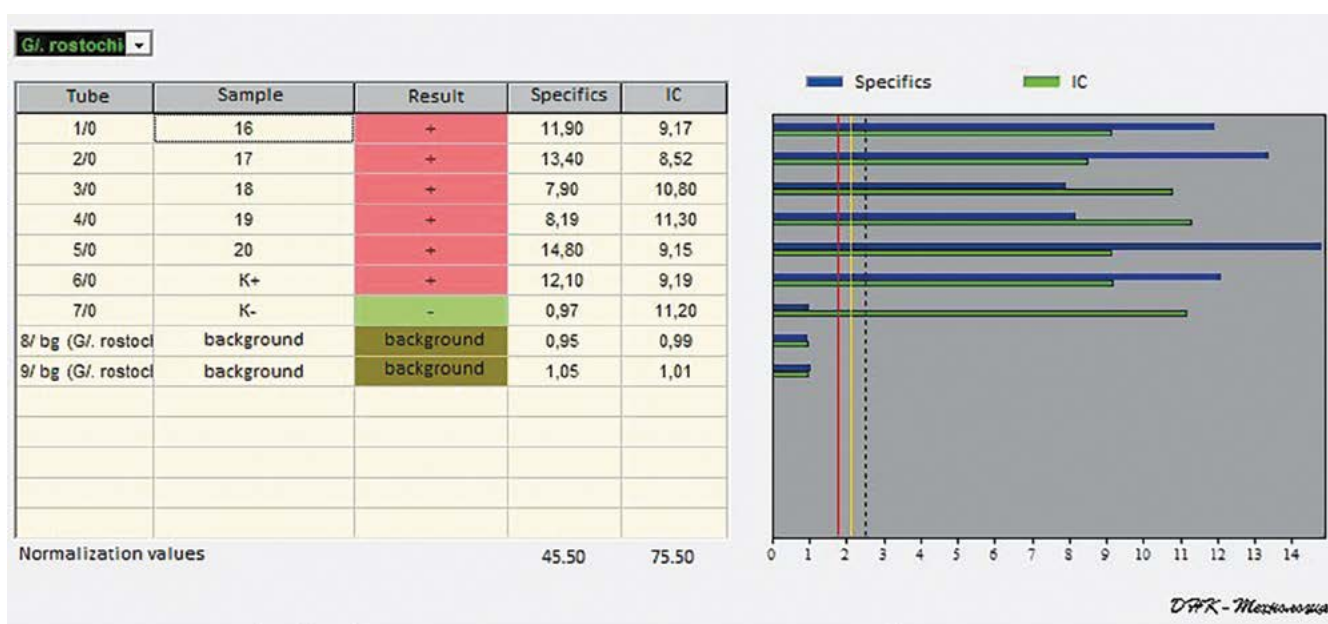


Рис. 7. Результаты исследования образцов 16-20 методом FLASH-PCR

Fig. 7. Results of 16-20 samples assay based on FLASH-PCR method

DNA kits DNK-Extran-2 (produced by ZAO Sintol) and 5xScreenMix (produced by Evrogen Joint Stock Company). These commercial kits were proved to be adequate for DNA extraction and for use as standard amplification sets.

References

1. Butorina N.N., Zinoveva S.V., Kulinich O.A. i dr. [Applied nematology]. 2006. Prikladnaia nematologiya. M.: Nauka. 350 s.
2. Efremenko T.S., Borovikova A.N., Dudik O.R., Guskova L.A., Makovskaia S.A. 1988. Instruksiia po vyivleniiu zolotistoi i blednoi kartofelnykh nematod i mery borby s nimi [Instruction on detection of golden and pale potato nematodes and control measures]. M.: Agropromizdat. 47 s.
3. Limantseva L.A. Zolotistaia kartofelnaia nematoda *Globodera rostochiensis* v Severo-zapadnom regione RF: sostav populiatsii, istochniki i donory ustoichivosti [Golden potato nematode *Globodera rostochiensis* in the North-Western Region of

the Russian Federation]. Avtoref. dissert. kand biol. nauk, SPb., 2010.

4. Natsionalnyi doklad o karantinom fitosanitarnom sostoianii territorii Rossiiskoi Federatsii v 2017 godu [National report on quarantine phytosanitary status of the territory of the Russian Federation].

5. STO VNIKR 6.001-2010 Kartofelye tsistobrazuiuschie nematody *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens and *Globodera pallida* (Stone) Behrens [Organization Standard VNIKR 6.001-2010 Potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* (Woll.) Behrens and *Globodera pallida* (Stone) Behrens. Detection and identification methods].

6. Fitoparaziticheskie nematody Rossii [Phytoparasitic nematodes of Russia. 2012]. 2012. Pod redaktsiei S.V. Zinovevoi, V.N. Chizhova. M.: Tovarischestvo nauchnykh izdaniy KMK.

7. Bulletin OEPP/EPPO, v. 47. 2017. EPPO Diagnostic protocol for regulated pests; *Globodera rostochiensis* & *Globodera pallida* PM 7/40 (4): 174-197.

8. Bulman S.R., Marshall J.W. 1997. Differentiation of Australasian potato cyst nematode (PCN) populations using the polymerase chain reaction (PCR). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 25: 123-129.

9. [Electronic resource]. – Access mode: <https://www.cabi.org/cpc/datasheet/27033>.

10. [Electronic resource]. – Access mode: <https://www.cabi.org/cpc/datasheet/27034>.

11. [Electronic resource]. – Access mode: <http://www.q-bank.eu/Nematodes/> База данных по диагностике вредных организмов.

12. [Electronic resource]. – Access mode: <http://www.syntol.ru>.

13. [Electronic resource]. – Access mode: <http://evrogen.ru>.

14. [Electronic resource]. – Access mode: <https://www.agrodiagnostica.ru/>

15. [Electronic resource]. – Access mode: <http://dialat.ru>.

УДК 632.5.01/.08

О ТРАКТОВКЕ ОБЪЕМА ТАКСОНА БОДЯК ПОЛЕВОЙ *CIRSIIUM ARVENSE* для решения фитосанитарных задач

Ю.Ю. Кулакова, к.б.н., ведущий научный сотрудник научно-методического отдела инвазивных видов растений ФГБУ «ВНИИКР»

Ю.В. Орлова, к.б.н., старший научный сотрудник отдела инвазивных видов растений ФГБУ «ВНИИКР»

Аннотация. В статье представлен анализ различных точек зрения отечественных и зарубежных исследователей на объем таксона *Cirsium arvense* (L.) Scop. Приведены сведения по морфологии, распространению, вредоносности близкородственных видов *Cirsium setosum* (Willd.) Besser ex M. Bieb., *Cirsium incanum* (S.G. Gmel.) Fisch. Отмечена широкая вариабельность морфологических

признаков вегетативных органов и схожесть в строении плодов-семян всех трех видов бодяков, что затрудняет окончательную видовую идентификацию *Cirsium arvense* (L.) Scop., проводимую специалистами испытательных лабораторий. Делается предварительный вывод, что для решения фитосанитарных задач следует рассматривать бодяк полевой в широчайшем понимании таксона *sensu latissima* – как единый сборный вид.

Ключевые слова. *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Cirsium setosum* (Willd.) Besser ex M. Bieb., *Cirsium incanum* (S.G. Gmel.) Fisch., внутривидовая изменчивость, морфологический полиморфизм, идентификация, сорное растение, фитосанитарные требования.

Значительные объемы экспорта российской пшеницы и других зерновых культур в более чем

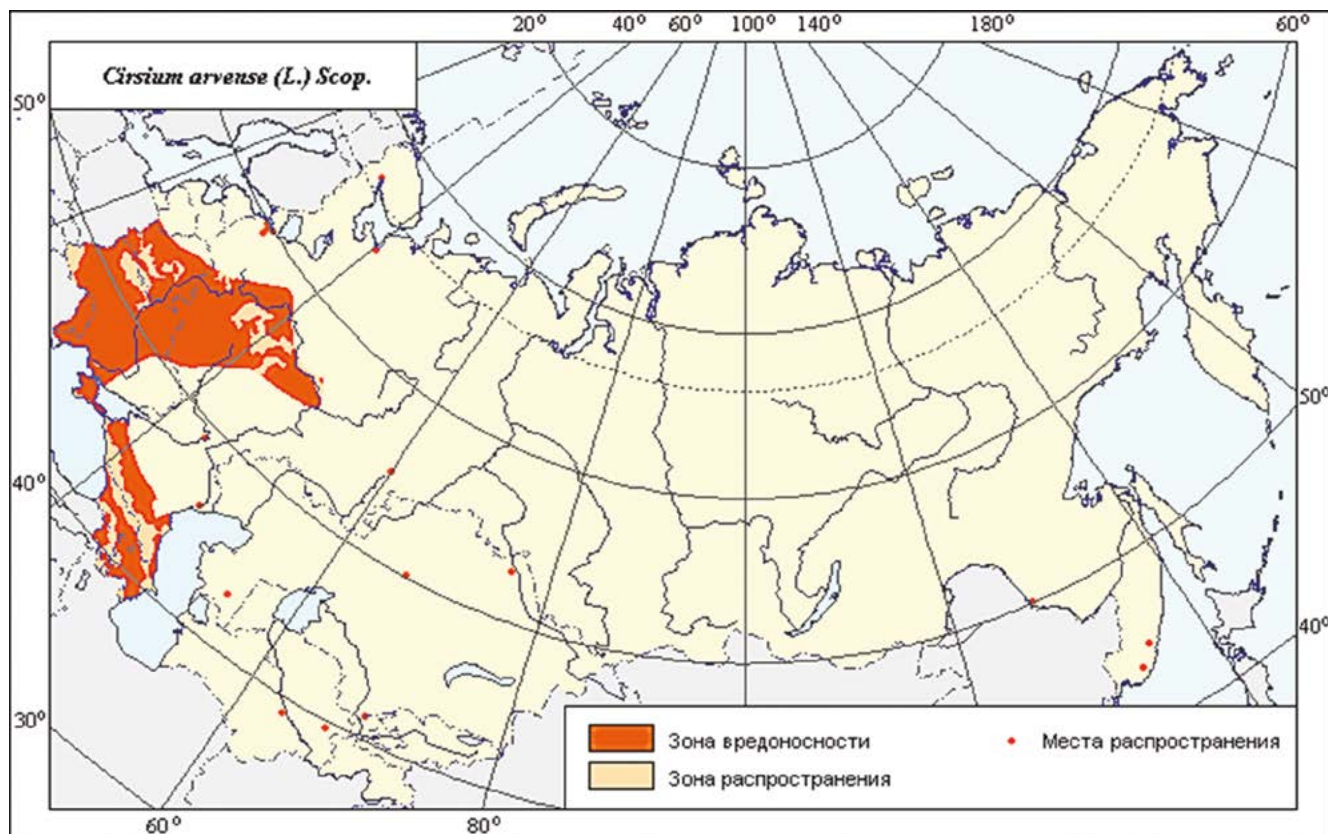


Fig. 1. Distribution of *Cirsium arvense* according to Russian botanists (<http://www.agroatlas.ru>)

Рис. 1. Распространение бодяка полевого согласно данным отечественных ботаников (<http://www.agroatlas.ru>)

30 стран мира вызывают необходимость выполнения фитосанитарных требований стран-импортеров. Часто встречаются требования, регламентирующие отсутствие в зерновой продукции представителей рода *Cirsium*. Виды этого рода широко распространены на территории РФ и являются трудноискоренимыми сорняками в посевах и на огородах: бодяк полевой *Cirsium arvense*, бодяк щетинистый *Cirsium setosum*, бодяк седой *Cirsium incanum* и др. (Лунева, Закота, 2018; Маковеев и др., 2016).

Другие виды являются рудеральными, встречаются на пастбищах, по нарушенным местам – *Cirsium esculentum*, *Cirsium serrulatum*, *Cirsium vulgare* и др. (Сорные растения СССР, 1934; Никитин, 1983; Ульянова, 1998).

Одним из злостных сеgetальных сорняков является бодяк полевой *Cirsium arvense* (L.) Scop. Вид включен в карантинные перечни Вьетнама, Израиля, Индонезии, Иордании, Мексики, США и регулируется фитосанитарными требованиями Китая и других государств

при ввозе зерновой продукции в эти страны (<https://www.fsvps.ru>, <https://www.ippc.int>, eppo).

Бодяк полевой характеризуется высокой внутривидовой изменчивостью морфологических признаков, что отчетливо проявляется в различных экологических условиях его местообитаний. Это приводит к неоднозначному пониманию объема таксона, выделению множества отдельных видов, подвидов и разновидностей. Все это, безусловно, затрудняет идентификацию данного вида в природе и на полях при проведении обследовательских мероприятий. Таким образом, для решения прикладных фитосанитарных задач необходимо определить трактовку объема таксона *Cirsium arvense* и оценить его распространение на территории нашей страны.

Высокий внутривидовой полиморфизм бодяка полевого способствовал появлению разночтений в понимании объема таксона между зарубежными и отечественными исследователями. В зарубежной литературе и в нашей старой отечественной литературе бодяк полевой рассматривается в широком смысле со всем присущим ему разнообразием форм (Шмальгаузен, 1897; Федченко, Флеров, 1910;

Рис. 2. Морфологические особенности *Cirsium arvense*:

а – растение в фазе плодоношения, б – низбегающий на стебель лист с шипами, в – перистораздельные листья

Fig. 2. Morphological features of *Cirsium arvense*:

а – fruiting plant, б – spiny decurrent leaf, в – pinnatifid leaves

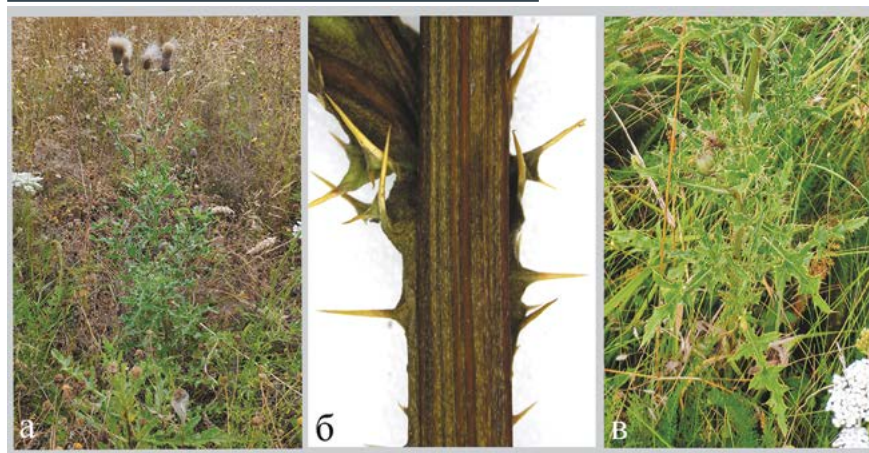




Fig. 3. Morphological features of *Cirsium incanum*:
a – fruiting plant, б – hairy abaxial side of leaf, в – dense white-tomentose trichome

Рис. 3. Морфологические особенности *Cirsium incanum*:
а – растение в фазе плодоношения, б – нижняя поверхность листьев с опушением, в – плотное беловойлочное опушение

Маевский, издания 1-8 и др.). Отечественные ботаники начиная с обработки А.Л. Харадзе во «Флоре СССР» (т. 28, 1963) рассматривают его более узко. В большинстве российских флористических сводок признается существование трех самостоятельных таксонов, которые морфологически схожи: бодяка полевого *Cirsium arvense* s. str., который распространен в зоне смешанных и широколиственных лесов в северо-западных, реже центральных регионах европейской части России (например, Калининградская, Ленинградская, Псковская, Новгородская области), на Кавказе (Краснодарский край, Ставропольский край, республики Кабардино-Балкария, Дагестан, а также встречается как заносное растение на Дальнем Востоке (рис. 1); бодяка щетинистого *Cirsium setosum* (Willd.) Besser ex M. Bieb., широко распространенного в европейской и азиатской России (рис. 5) и бодяка седого *Cirsium incanum* (Willd.) Bess., который встречается в южных районах европейской части России вблизи пойм рек и водоемов (рис. 6) (Маевский, 2014; Лунева, 2003; Лунева, Мысник, 2018; Зернов, 2006; Скворцов, 1998; Цвелев, 1994; Флора Сибири, 1997; Харадзе, 1963; Сосудистые растения..., 1992; Определитель..., 1974; <http://www.agroatlas.ru>). Исследования сорной флоры на территории нашей страны показав-

ли, что в посевах преимущественно встречается *Cirsium setosum*, а *Cirsium arvense* является в большей степени рудеральным сорняком. Также опасным сорняком в южных и юго-восточных районах может быть *Cirsium incanum* (Лунева, 2003).

Рассмотрим морфологические признаки, характерные для этих растений.

Cirsium arvense L. s. str. – растение 30-90 см высотой, слабо опушенное или голое, с перистораздельными листьями, которые на концах лопастей и по краю несут многочисленные колючие шипы. Край листа слегка волнистый. Междоузлия стебля с низбегающими от основания листьев двумя колюче-зубчатыми крыльями (рис. 2).

Cirsium setosum (Willd.) Bess. – растение среднего роста, 40-150 см высотой, умеренно колючее, с цельными или перистолопастными в разной степени опушенными листьями (обычно с паутинистым типом опушения на нижней стороне листа, с мягкими шипиками по краю) (рис. 7).

Cirsium incanum (S.G. Gmel.) Fisch. – высокорослый (до 2 м и более), нижняя сторона листа покрыта густым беловойлочным опушением, край листа мелкозеснитчато-шиповатый (рис. 3).

А.К. Скворцов в своей работе (1998) отмечает, что *C. setosum* и *C. incanum* часто связаны постепе-

нными переходами (например, у одного растения могут быть листья и голые, и беловойлочные), в этих случаях оказывается очень трудно провести видовую границу. Скорее всего они являются экотипами одного вида, причем *C. incanum* – вероятно, первичный, а *C. setosum* – от него производный. *C. arvense* L. s. str. по мнению Скворцова, действительно заслуживает признания в видовом ранге, он также считает, что вопрос названий еще нуждается в переисследовании. Мы разделяем эту точку зрения.

В европейской части России есть регионы, где могут произрастать все три вида бодяков (бодяк полевой, бодяк щетинистый, бодяк седой). Наши собственные наблюдения в экспедициях по территории Калининградской, Ленинградской, Московской, Ростовской, Волгоградской областей, Краснодарского и Ставропольского краев, Республики Крым выявили широкую вариабельность морфологических признаков у трех видов бодяков. При этом данные виды не всегда легко различимы между собой, часто встречаются растения с промежуточными признаками и иногда гибридные формы. Можно рассматривать такое фенотипическое разнообразие либо как результат интрогрессивной гибридизации, происходящей в природных популяциях бодяков в зоне их совместного распространения, либо как широкую экологическую пластичность одного и того же вида, связанную с приспособлением к конкретным условиям среды.

Все это, безусловно, затрудняет идентификацию данного вида в природе при организации обследовательских мероприятий, что приведет к путанице при установлении видовой принадлежности сотрудниками испытательных лабораторий.

Следует отметить, что подкарантинную продукцию растительного происхождения (зерно пшеницы, ячменя, ржи, рыжика, ячменя, горчицы, сафлора, сорго) могут засорять как семена бодяков, так и их соцветия-корзинки. При этом достоверно отличить корзинки и семена этих трех видов бодяков между собой очень



Fig. 4. Capitulum with seeds. Involucre: а – *C. arvense*, б – *C. setosum*, в – *C. incanum*

Рис. 4. Соцветие корзинка с семенами. Обертка: а – *C. arvense*, б – *C. setosum*, в – *C. incanum*

затруднительно. Корзинки имеют одинаковое строение и морфологически сходны (рис. 4). Обертка корзинки бокальчатая или продолговатая, 10-20 мм длиной, урнообразная, голая или чаще несколько паутинисто-волосистая. Листочки ее многорядные, черепитчатые, снаружи опушенные мельчайшими жестковатыми волосками, а по краю слабо и коротко паутинисто реснитчатые. Наружные листочки пурпурно-фиолетово окрашенные (со временем пигмент разрушается и цвет становится желто-коричневым), на верхушке с коротким шиповидным остроконечием, а внутренние листочки – удлинённые, на верхушке пленчатые.

Плоды бодяка полевого, бодяка щетинистого и бодяка седого также имеют сходную форму, размеры, окраску и внешнюю структуру поверхности, их идентификация также крайне сложна (рис. 8). Продукцию засоряют плоды-семянки. Это сухой невскрывающийся односемянный плод 2-2,5 мм длиной. Форма семянки клиновидная, удлинённо-яйцевидная или обратнойцевидная, сжатая с боков; на поперечном разрезе почти округлая. Вершина семянок косо усеченная, заканчивается остатком столбика, несет опадающую перистую летучку. Летучка состоит из щетинок, соединенных в кольцо. Основание семянки чаще суживающееся, клиновидное; на конце семянки имеется малозаметный плодовой рубчик. Поверхность семянок гладкая, с неясными продольными бороздками, матовая или тускло блестящая. Окраска от желто-оливковой до коричневой (Артюшенко, Федоров, 1986; Доброхотов, 1961; Броувер, Штелин, 2010; Левина, 1987; Atlas of Seeds and Fruits, 2007; <https://www.inspection.gc.ca>; <http://botany-collection.bio.msu.ru>).

В связи с вышеизложенным считаем, что для обеспечения экспортного потенциала зерновой продукции российского происхождения, а также для гармонизации отношений между РФ и странами-импортерами в области фитосанитарных требований следует рассматривать **бодяк полевой в широком понимании sensu latissima** (в широчайшем понимании объема таксона), как единый сборный вид.

Литература

1. Артюшенко З.Т., Федоров А.А. Атлас по описательной морфологии высших растений. Плод. Л.: Наука, 1986. 392 с.
2. Броувер В., Штелин А. Справочник по семеноведению сельскохозяйственных, лесных и декоративных культур с ключом для определения важнейших семян. Пер. с нем. М.: Т-во научн. изд. КМК, 2010. 694 с.
3. Доброхотов В.Н. Семена сорных растений. М.: Изд-во сельскохозяйственной литературы журналов и плакатов, 1961. С. 383-384.
4. Зернов А.С. Флора Северо-Западного Кавказа. М.: Т-во научн. изд. КМК, 2006. С. 136.
5. Левина Р.Е. Морфология и экология плодов. Л.: Наука, 1987. 160 с.
6. Лунева Н.Н. О ботанических наименованиях сорных растений // Защита и карантин растений, 2003. № 11. С. 17-20.
7. Лунева Н.Н. Мыслик Е.Н. Современная ботаническая номенклатура видов сорных растений Российской Федерации // Вестник защиты растений. Приложение. Выпуск 26. Электронная версия. СПб., 2018. 80 с.
8. Лунева Н.Н., Закота Т.Ю. Видовой состав сорных растений и количественные показатели засоренности посевов пшеницы озимой степной зоны Краснодарского

края // Вестник защиты растений. 2018. № 1 (95). С. 45-52.

9. Маевский П.Ф. Флора средней полосы Европейской части России. 11-е изд. М.: Т-во научн. изданий КМК, 2014. С. 312, 321-323.

10. Маковеев А.В., Макаренко С.А., Лучинский С.И., Дерка Ф.И., Лященко И.Л. Вредоносность осота розового в посевах подсолнечника // Научный журнал КубГАУ, 2016. № 117 (03).

11. Никитин В.В. Сорные растения флоры СССР. Л.: Наука, 1983. С. 320-322.

12. Определитель высших растений Сахалина и Курильских островов. Ред. А.И. Толмачев. Л.: Наука, 1974. 372 с.

13. Скворцов А.К. Материалы к Флоре Смоленской области // Бюллетень МОИП, отд. Биология, 1998. Т. 103. Вып. 2. С. 44-52.

14. Сорные растения СССР (в 4 томах) / под редакцией акад. Б.А. Келлера. – М.-Л., Академия наук СССР, 1934-1935. Т. 4 (Asteraceae). С. 283-289.

15. Сосудистые растения советского Дальнего Востока. Т. 6. Ред. С.С. Харкевич. СПб.: Наука, 1992. 428 с.

16. Ульянова Т.Н. Сорные растения во флоре России и сопредельных государств / Т.Н. Ульянова. Барнаул: Изд-во Азбука, 1998. – 297 с.

17. Федченко Б.А., Флеров А.Ф. Флора европейской России. В 3 частях. Изд. А.Ф. Девриена. СПб., 1910.

18. Флора Сибири, Т. 13. Ред. И.М. Красноборова. Новосибирск: Наука, 1997. С. 254-255.

19. Харадзе А.Л. Род *Cirsium* // Флора СССР. Т. 28. Л., 1963. С. 51-215.

20. Цвелев Н.Н. Род *Cirsium* // Флора Европейской части СССР. Т. 7. Л., 1994. С. 235-247.

21. Шмальгаузен Н.Ф. Флора Средней и Южной России. Т. 2. Киев, 1897.

22. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: Atlas of Seeds and Fruits of Central and East-European Flora: The Carpathian (Vít Bojnanský, Agáta Fargašová) – <https://books.google.ru> свободный.

23. [Электронный ресурс]. Inspection of export soybean and wheat lots for Canada thistle. Directive 9180.86. (February 27, 2019) / USDA –

Режим доступа: https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/FGIS9180_86.pdf.

24. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://botany-collection.bio.msu.ru/plant/view?id=1877>.

25. Flora carniolica exhibens plantas Carnioliae indigenas et distributas in classes, genera, species, varietates, ordine

linnaeano. – Tom II. Editio secunda aucta et reformata. 1771. P. 126-131.

26. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.agroatlas.ru/ru/content/weeds/Cirsium_setosum/index.html.

27. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.fsvps.ru>.

28. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.ippc.int>, eppo.

UDC 632.5.01/.08

INTERPRETATION OF THE TAXONOMIC SCOPE OF *CIRSIUM ARVENSE*

for solving phytosanitary issues

Y.Y. Kulakova, PhD in Biology, Leading Researcher of the Invasive Plant Species Department of FGBU “VNIIKR”

Y.V. Orlova, PhD in Biology, Senior Researcher of the Invasive Plant Species Department of FGBU “VNIIKR”

Abstract. The article presents an analysis of various points of view of Russian and foreign researchers on the taxonomic scope of *Cirsium arvense* (L.) Scop. Information on the morphology, distribution, and harmfulness of closely related species *Cirsium setosum* (Willd.) Besser ex M. Bieb., *Cirsium incanum* (S.G. Gmel.) Fisch. is given. It was noted, that wide variability of the morphological features of vegetative organs and the similarity in the structure of fruits of those three species complicate the identification of *Cirsium arvense* (L.) Scop., by specialists of testing laboratories. A preliminary conclusion is made that in order to solve phytosanitary issues, creeping thistle should be considered in the broadest sense of the taxon sensu latissima – as a single complex species.

Keywords. *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Cirsium setosum* (Willd.) Besser ex M. Bieb., *Cirsium incanum* (S.G. Gmel.) Fisch., Intraspecific variability, morphological polymorphism, identification, weed plant, phytosanitary requirements.

As Russia exports significant amount of wheat and other grain crops to more

than 30 countries of the world it is necessary to meet the phytosanitary requirements of importing countries. Often the absence of representatives of genus *Cirsium* in grain products is required. Species of this genus are widespread on the territory of the Russian Federation and these weeds are difficult to eradicate in crops and gardens: *Cirsium arvense*, *Cirsium setosum*, *Cirsium incanum*, etc. (Luneva, Zakota, 2018; Makeev and others, 2016). Others are ruderal species and occur on pastures, disturbed lands – *Cirsium esculentum*, *Cirsium serrulatum*, *Cirsium vulgare*, etc. (Weed plants of the USSR, 1934; Nikitin, 1983; Ulianova, 1998).

One of the most harmful weeds growing in grain fields is *Cirsium arvense* (L.) Scop. The species is included in the quarantine lists of Vietnam, Israel, Indonesia, Jordan, Mexico, the USA and is regulated by the phytosanitary requirements of China and other countries when importing grain products (<https://www.fsvps.ru>, <https://www.ippc.int>, eppo).

Creeping thistle is characterized by high intraspecific variability of morphological characters, which is clearly

manifested in various environmental conditions of its habitat. This leads to an ambiguous understanding of the taxonomic scope, to the allocation of many individual species, subspecies and varieties. All this, makes it difficult to identify this species in nature and in the fields when conducting surveys. Thus, to solve applied phytosanitary problems, it is necessary to determine the taxonomic scope of *Cirsium arvense* and evaluate its distribution in our country.

The high intraspecific polymorphism of creeping thistle contributed to the variation in understanding of the taxonomic scope between foreign and Russian/Soviet researchers. In foreign literature and in older Russian/Soviet literature, creeping thistle is considered in the broad sense with all its inherent variety of forms (Schmalgauzen, 1897; Fedchenko, Flerov, 1910; Maevskii, publications 1-8, etc.). Russian/Soviet botanists starting with A.L. Kharadze in “Flora of the USSR” (Vol. 28, 1963) consider it more narrowly. Most Russian floristic reports acknowledge the existence of three independent morphologically similar taxa: the *Cirsium arvense* s. str., which is common in the

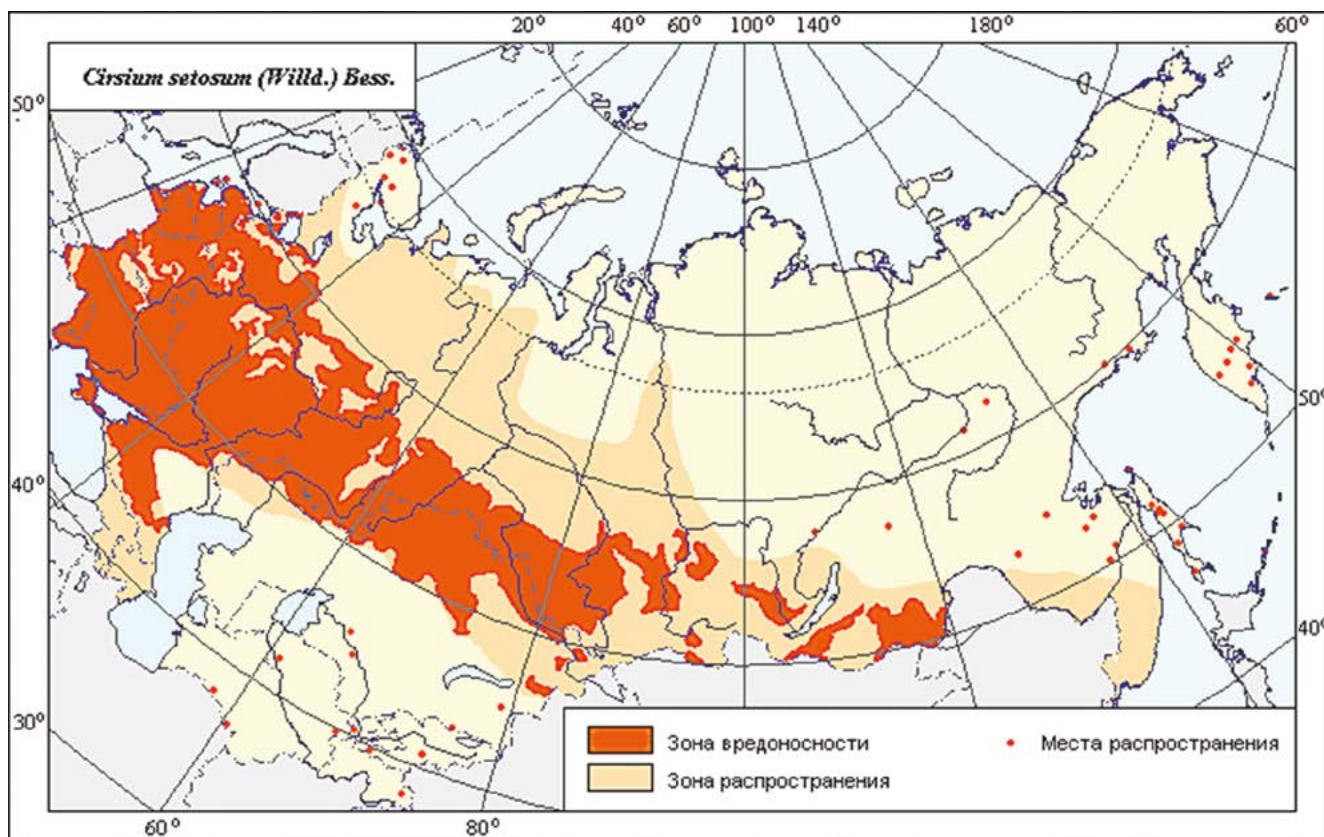


Рис. 5. Распространение бодяка щетинистого согласно данным отечественных ботаников (<http://www.agroatlas.ru>)

Fig. 5. Distribution of *Cirsium setosum* according to Russian botanists (<http://www.agroatlas.ru>)

area of temperate and broad-leaved forests in the northwestern, less often central regions of the European part of Russia (for example, Kaliningrad, Leningrad, Pskov, Novgorod regions), in the Caucasus (Krasnodar Krai, Stavropol Krai, the Republic of Kabardino-Balkaria, Dagestan), it also occurs as an invasive plant in the Far East (Fig. 1); *Cirsium setosum* (Willd.) Besser ex M. Bieb. common in European and Asian Russia (Fig. 2); and *Cirsium incanum* (Willd.) Bess., which occurs in southern regions of the European part of Russia near floodplains of rivers and basins (Fig. 3) (Maevskii, 2014; Luneva, 2003; Luneva, Mysnik, 2018; Zernov, 2006; Skvortsov, 1998; Tsvelev, 1994; Flora of Siberia, 1997; Kharadze, 1963; Vascular plants., 1992; Key to., 1974; <http://www.agroatlas.ru>). Studies of Russian weed flora have shown that *Cirsium setosum* is predominantly found in crops, while *Cirsium arvense* is mostly ruderal weed. *Cirsium incanum* can also be a harmful weed in the southern and southeastern regions (Luneva, 2003).

Consider the morphological features distinctive for these plants.

Cirsium arvense L. s. str. – a plant is 30 to 90 cm in height, slightly hairy or glabrous, with pinnatifid leaves, having numerous spikes at the edges and ends of the leaf blades. The edge of the leaf is slightly wavy. The internodes of the

stem have two spiny wings running down from the leaf bases (Fig. 4).

Cirsium setosum (Willd.) Bess. – plant can grow to a height of 40-150 cm, moderately prickly, with whole or pinnatifid leaves tomentose to different extents (usually arachnoid on the abaxial side of leaves, with soft spines along the edge) (Fig. 5).

Cirsium incanum (S.G. Gmel.) Fisch. – plant can grow to a height of 2 m or more, the abaxial side of leaves is white-tomentose, the leaf edge is fringed and prickly (Fig. 6).

A.K. Skvortsov mentions in his work (1998) that *C. setosum* and *C. incanum* are often related to gradual transition (for example, one plant may have both glabrous and white-tomentose leaves) which makes it difficult to distinguish species. They are most likely ecotypes of the same species, where *C. incanum* is probably initial species, and *C. setosum* derived from it. *C. arvense* L. s. str. according to Skvortsov should be recognized as a separate species, he also believes that the names still need to be reviewed. We share this opinion.

There are regions in the European part of Russia, where all three types of thistle can grow (*Cirsium arvense*, *Cirsium setosum*, *Cirsium incanum*). Our expeditions through the territory of the Kaliningrad, Leningrad, Moscow, Rostov, Volgograd regions, Kras-

nodar Krai, Stavropol Krai, and the Republic of Crimea revealed a wide variability of morphological characters in three species. At the same time, these species are not always easy to distinguish among themselves, plants with intermediate characters and hybrid forms are often found. Such phenotypic diversity can be considered either as a result of introgression in natural populations of thistles in the area of their joint distribution, or as wide phenotypic plasticity of a species associated with adaptation to specific environmental conditions.

All this complicates the identification of this species in nature when conducting surveys, which will lead to confusion when identifying species in the testing laboratories.

It should be noted that regulated plant products (grain of wheat, barley, rye, false flax, mustard, safflower, sorghum) can be contaminated with both achenes and capitula of thistles. At the same time, it is very difficult to reliably distinguish achenes and capitula of these three species. Capitula have the same structure and are morphologically similar (Fig. 7). Capitulum is cup-shaped or oblong, 10-20 mm long, urn-shaped, glabrous or slightly arachnoid. Involucral bracts based in several rows, are imbricate, having small harsh hairs on the surface, and

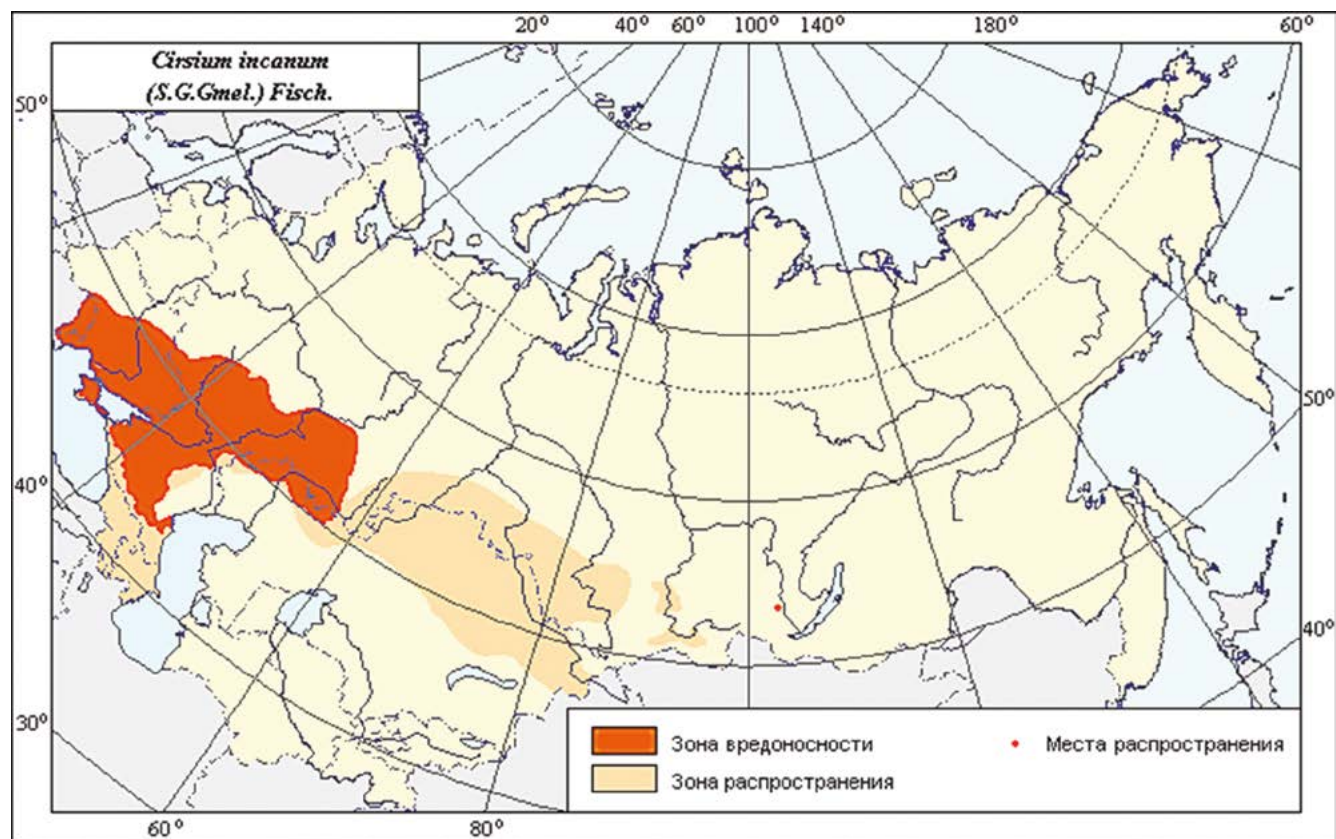


Рис. 6. Распространение бодяка седого согласно данным отечественных ботаников (<http://www.agroatlas.ru>)

Fig. 6. Distribution of *Cirsium incanum* according to Russian botanists (<http://www.agroatlas.ru>)

slightly fringed on the edges. The outer petals are purple-violet (over time, the pigment fails and the color changes to yellow-brown) with a short spinelet, and the inner leaves are elongated, glumal at the top.

The fruits of *Cirsium arvense*, *Cirsium setosum*, *Cirsium incanum* are also similar in shape, size, color and external surface structure, their iden-

tification is extremely difficult (Fig. 8). Achenes contaminate plant commodities. This is a dry single-seeded indehiscent fruit 2-2.5 mm long. The achene is wedge-shaped, elongated-ovate or obovate, laterally compressed; almost round in transverse section. The top of the achene is obliquely truncated, with the rest beak, carries loosely attached pappus. Pappus consists of bristles con-

nected in a ring. The achene base is often tapering, wedge-shaped; at the end of the achene there is a barely noticeable hilum. The surface of the achenes is smooth, with lateral grooves, matte or dull shiny. Color is from yellow-olive to brown (Artiusenko, Fedorov, 1986; Dobrokhoto, 1961; Brouver, Shtelin, 2010; Levina, 1987; Atlas of Seeds and Fruits, 2007; <https://www.inspection>.

Fig. 7. Morphological features of *Cirsium setosum*:

a – flowering plant, б – part of stem with node, в – pinnatifid leaves

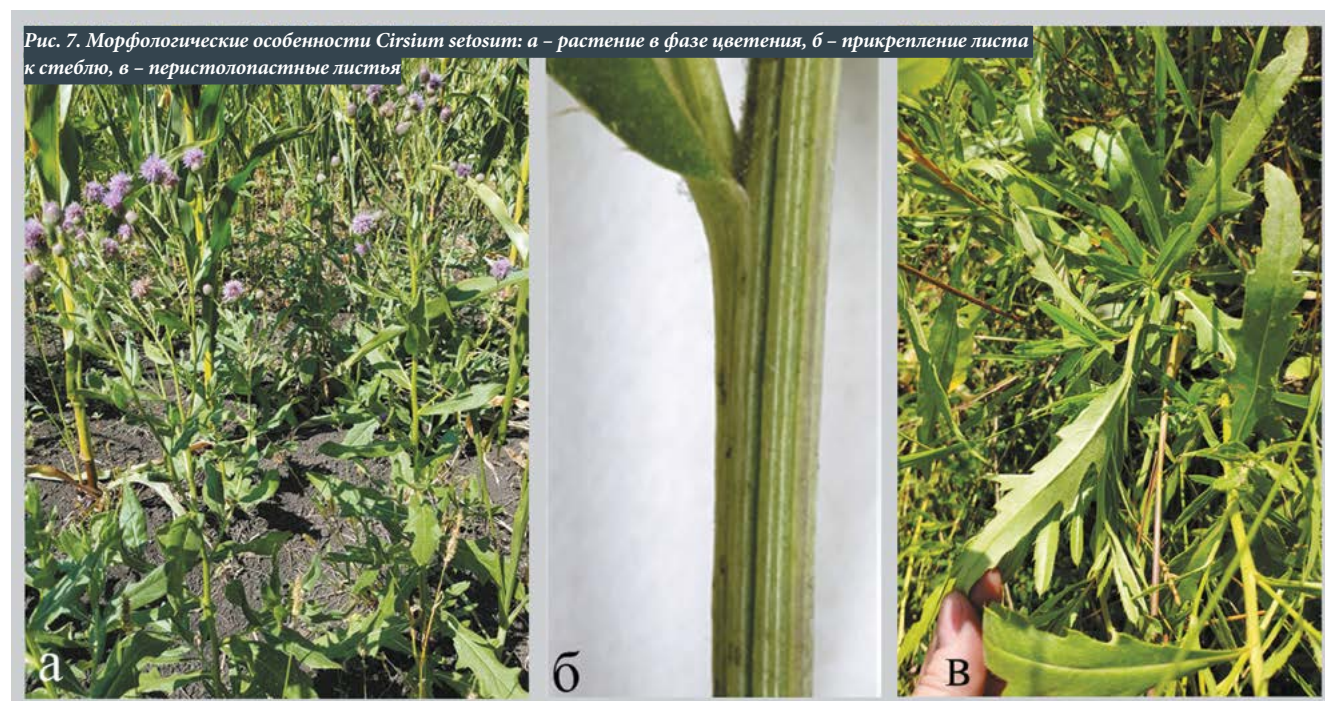




Рис. 8. Плоды семян: а – *Cirsium arvense*, б – *Cirsium setosum*, в – *Cirsium incanum*. Масштабный отрезок 1 мм

Fig. 8. Achenes: а – *Cirsium arvense*, б – *Cirsium setosum*, в – *Cirsium incanum*. Scale bar 1 mm

gc.ca; <http://botany-collection.bio.msu.ru>).

In accordance with the abovementioned, we believe that in order to ensure the export potential of Russian grain products, as well as to harmonize interaction between the Russian Federation and importing countries in the field of phytosanitary requirements, we should consider creeping thistle in the broad sense of sensu latissima (in the broadest sense of the taxonomic scope) as one complex species.

References

- Artiushenko Z.T., Fedorov A.A. Atlas po opisatel'noj morfologii vysshih rastenij [Atlas on Descriptive Morphology of Higher Plants]. Plod. L.: Nauka, 1986. 392 s.
- Brouver V., Shtelin A. Spravochnik po semenovedeniyu sel'skokozyajstvennyh, lesnyh i dekorativnyh kul'tur s klyuchom dlya opredeleniya vazhnejshih semyan [Handbook of seed science of agricultural, forest and ornamental crops with a key to identify the most important seeds]. Translated from German. M.: T-vo nauchn. izd. KMK, 2010. 694 s.
- Dobrokhotov V.N. Semena sornyh rastenij [Weed seeds]. M.: Izd-vo sel'skokozyajstvennoj literatury zhurnalov i plakatov, 1961. S. 383-384.
- Zernov A.S. Flora Severo-Zapadnogo Kavkaza [Flora of the Northwest Caucasus]. M.: T-vo nauchn. izd. KMK, 2006. S. 136.
- Levina R.E. Morfologiya i ekologiya plodov [Morphology and ecology of fruits]. L.: Nauka, 1987. 160 s.
- Luneva N.N. O botanicheskikh naimenovaniyah sornyh rastenij [About scientific names of weeds]. // Zashchita i karantin rastenij, 2003. № 11. S. 17-20.
- Luneva N.N. Mysnik E.N. Sovremennaya botanicheskaya nomenklatura vidov sornyh rastenij Rossijskoj Federacii [Modern botanical classification of weed species of the Russian Federation]. // Vestnik zashchity rastenij. Prilozheniya. Vypusk 26. Electronic version. SPb., 2018. 80 s.
- Luneva N.N., Zakota T.Iu. Vidovoj sostav sornyh rastenij i kolichestvennye pokazateli zasorennosti posevov pshenicy ozimoj stepnoj zony Krasnodarskogo kraja [Species of weeds and quantitative indicators of weediness of wheat crops in the winter steppe zone of the Krasnodar Territory]. // Vestnik zashchity rastenij. 2018. № 1 (95). S. 45-52.
- Maevskii P.F. Flora srednej polosity Evropejskoj chasti Rossii [Flora of the temperate zone of the European part of Russia]. / 11-e izd. M.: T-vo nauchn. izdanij KMK, 2014. S. 312, 321-323.
- Makoveev A.V., Makarenko S.A., Luchinskii S.I., Dereka F.I., Liashchenko I.L. Vredonosnost' osota rozovogo v posevah podsolnechnika [Harmful pink thistle in sunflower crops]. // Nauchnyj zhurnal KubGAU, 2016. № 117 (03).
- Nikitin V.V. Sornye rasteniya flory SSSR [Weed plants of the USSR flora]. L.: Nauka, 1983. S. 320-322.
- Opredeletel' vysshih rastenij Sahalina i Kuril'skih ostrovov [Key to higher plants of Sakhalin and the Kuril Islands]. eds. A.I. Tolmachev. L.: Nauka, 1974. 372 s.
- Skvortsov A.K. Materialy k flore Smolenskoj oblasti [Materials for the flora of Smolensk region]. // Byulleten' MOIP, otd. Biologiya, 1998. T. 103. Vyp. 2. S. 44-52.
- Sornye rasteniya SSSR (v 4 tomah) [Weed plants of the USSR]. / eds. B.A. Keller. – M.-L., Akademiya nauk SSSR, 1934-1935. T. 4 (Asteraceae). S. 283-289.
- Sosudistye rasteniya sovetskogo Dal'nego Vostoka [Vascular plants of the Soviet Far East]. T. 6. eds S.S. Kharkevich. SPb.: Nauka, 1992. 428 s.
- Ulianova T.N. Sornye rasteniya vo flore Rossii i sopredel'nyh gosudarstv [Weed plants in the flora of Russia and neighboring states]. / T.N. Ulianova. Barnaul: Izd-vo Azbuka, 1998. – 297 s.
- Fedchenko B.A., Flerov A.F. Flora evropejskoj Rossii [Flora of European Russia]. V 3 chastyah. Izd. A.F. Devriena. SPb., 1910.
- Flora Sibiri [Flora of Siberia]. T. 13. eds. I.M. Krasnoborova. Novosibirsk: Nauka, 1997. C. 254-255.
- Kharadze A.L. Rod *Cirsium* [*Cirsium* genus]. // Flora SSSR. T. 28. L., 1963. S. 51-215.
- Tsvelev N.N. Rod *Cirsium* [*Cirsium* genus]. // Flora Evropejskoj chasti SSSR. T. 7. L., 1994. S. 235-247.
- Shmalgauzen N.F. Flora Srednej i Yuzhnoj Rossii [Flora of Central and Southern Russia]. T. 2. Kiev, 1897.
- [Electronic source]. – Access mode: Atlas of Seeds and Fruits of Central and East-European Flora: The Carpathian (Vít Bojnanský, Agáta Fargašová) – <https://books.google.ru> свободный.
- [Electronic source]. – Access mode: Inspection of export soybean and wheat lots for Canada thistle. Directive 9180.86. (February 27, 2019) / USDA – Access mode: https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/FGIS9180_86.pdf.
- [Electronic source]. – Access mode: <http://botany-collection.bio.msu.ru/plant/view?id=1877>.
- Flora carniolica exhibens plantas Carnioliae indigenas et distributas in classes, genera, species, varietates, ordine linnaeano. – Tom II. Editio secunda aucta et reformata. 1771. P. 126-131.
- [Electronic source]. – Access mode: http://www.agroatlas.ru/ru/content/weeds/Cirsium_setosum/index.html.
- [Electronic source]. – Access mode: <https://www.fsvps.ru>.
- [Electronic source]. – Access mode: <https://www.ippc.int>, eppo.

ПОИСК ОПТИМАЛЬНОГО МЕТОДА ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ИЗ ОБРАЗЦОВ РАСТЕНИЙ ОЛИВЫ ЕВРОПЕЙСКОЙ (*OLEA EUROPAEA* L.), инфицированных *Xylella fastidiosa* Wells et al.

И.Н. Писарева, научный сотрудник лаборатории бактериологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР»

С.И. Приходько, заведующая лабораторией бактериологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР»

Г.Н. Бондаренко, к.б.н., начальник ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», старший преподаватель
Агротехнического института ФГАОУ ВО «РУДН»

К.П. Корнев, к.б.н., заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР»

Аннотация. В статье представлен обзор информации о вредоносности возбудителя бактериоза *Xylella fastidiosa* Wells et al., растениях-хозяевах, подготовке аналитических проб образцов для анализа, а также результаты тестирования и апробации нескольких методов выделения ДНК бактерии из образцов оливы (*Olea europaea* L.) с симптомами заболевания.

Ключевые слова. Карантин растений, карантинный вредный организм, полимеразная цепная реакция, бактерия, *Xylella fastidiosa*, методы выделения ДНК.

Введение

В настоящее время *Xylella fastidiosa* Wells et al. является одной из наиболее опасных фитопатогенных бактерий в мире. Экономический ущерб, связанный с заболеваниями, вызванными *X. fastidiosa*, ежегодно оценивается в миллионы долларов (Maddox et al., 2010). В сентябре 2018 года Европейское агентство по безопасности продуктов питания обновило перечень растений, которые являются хозяевами для *Xylella fastidiosa*. Обновленный список включает 563 вида растений. Представленные виды охватывают сотни родов растений в 82 ботанических семействах (EFSA, 2018). Многие из наиболее восприимчивых растений-хозяев – экономически важные культуры, такие как: виноград, цитрусовые, персик, слива, миндаль, кофе, олива, люцерна, черника, ряд декоративных растений и многие другие (Saronari et al., 2013; Стандарт ЕОКЗР, 2016).

Впервые болезнь, вызываемая *Xylella fastidiosa*, обнаружена и идентифицирована в 1884 году в Калифорнии. Сейчас ее регистрируют по всему североамериканскому континенту. В 2013 году бактериоз обнаружен на оливковых деревьях на юге Италии, в Апулии; в 2015 году – во Франции, на острове Корсика, на декоративных растениях *Polygala myrtifolia*; в 2016 году – на испанском острове Майорка на растениях черешни *Prunus avium* и в Германии на горшечном растении олеандра *Nerium oleander* (www.eppo.int...). В январе 2019 года появилась информация о первой идентификации *Xylella fastidiosa* в Португалии. Бактерия обнаружена в декоративной живой изгороди лаванды *Lavanda dentata* (www.xfactorsproject.eu...).

Считается, что в основном температурный фактор сдерживает распространение патогена в зонах умеренного климата. При этом многие регионы, в которых присутствуют один или несколько видов насекомых-переносчиков, находятся под угрозой инва-

зии холодоустойчивых штаммов бактерии, таких как, например, ожог миндаля (Purcell, Hopkins, 1996). Главным источником распространения патогена на большие расстояния является посадочный материал (Шнейдер, Каримова, 2018). В связи с чем основной стратегией предупреждения ввоза зараженного растительного материала на территорию РФ, где фитопатоген является отсутствующим карантинным вредным организмом, является точная и качественная диагностика патогена.

Прямая изоляция патогена из растительных тканей довольно трудоемка и может занимать до трех недель. Несмотря на то, что *X. fastidiosa* активно размножается в сосудах растений,



Fig. 1. The plant sample of *Olea europaea* L. (photo by O.I. Slovareva)

Рис. 1. Образец растения оливы европейской (*Olea europaea* L.) (фото О.Ю. Словаревой)

культивирование патогена *in vitro* представляет большую сложность в связи с его высокой чувствительностью и требовательностью к компонентам питательных сред.

Изоляция бактерии из растительной ткани – важный шаг для подтверждения содержания патогена в растительном образце. При этом на сегодняшний день наиболее эффективными и удобными в рутинной работе с большим количеством образцов считаются методы иммунной флуоресценции и ПЦР-анализ (Rodrigues et al., 2003). На пути к изоляции молекулярно-генетические и серологические методы используют в качестве скрининговых.

Цель исследования

Целью исследования являлся поиск наиболее чувствительного метода выделения ДНК *X. fastidiosa* из растительного материала путем апробации различных подходов для изоляции и очистки нуклеиновых кислот.

Задачи исследования

Перед авторами были поставлены следующие задачи: оптимизация процесса подготовки аналитических проб из симптомного материала; выделение ДНК *X. fastidiosa* выбранными для данного исследования коммерческими наборами; проведение полимеразной цепной реакции (далее – ПЦР) в «реальном времени» для анализа результатов выделения нуклеиновых кислот и подбора оптимального метода выделения ДНК.

Материалы и методы

Подготовка проб из образцов оливы с проявлением симптомов бактериоза

Для подготовки проб использовали образцы с симптомами заболевания (олива *Olea europaea* L., Италия) (рис. 1).

После анализа процедур подготовки проб растительного материала, предложенных в диагностическом протоколе ЕОКЗР РМ 7/024 (3) и в инструкции национального института биологии NIB (Dreo, Pirc, 2018), была оптимизирована подготовка растительного материала к тестированию на базе ФГБУ «ВНИИКР».

Процедура формирования аналитической пробы заключалась в следующем: центральные жилки и черешки

листьев оливы вырезали (рис. 2) и измельчали скальпелем (брали не менее 25 листьев). Навеску 0,5-2 г помещали в пакет, заливали стерильным PBS-буфером в соотношении 1:8 и гомогенизировали. Далее пакеты переносили на ротационный шейкер на 1 час при 100 об/мин для мацерации. Мацерат переноси-

ли в две пробирки объемом 1,5 мл (рис. 3) и центрифугировали при 1500 g 10 мин (таким образом удаляли крупные растительные частицы). Супернатант в количестве 1 мл переносили в новую пробирку. До начала опыта пробирку хранили при –20 °С.

Растительный экстракт готовили в количестве, необходимом для оценки пяти методов выделения ДНК. Повторность использовалась четырехкратная. Однородность исследуемого материала достигалась путем тщательного перемешивания в одной емкости хранившихся при –20 °С экстрактов.

Пробирку с 1 мл экстракта центрифугировали 10 мин при 10000 g и удалили супернатант. К осадку добавили 200 мкл лизирующего буфера. Осадок с лизирующим раствором тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали 30 мин при температуре 65 °С. Далее выделение производили в соответствии с инструкцией производителя наборов.

Выделение ДНК

В результате исследований методов выявления и идентификации возбудителя в симптоматическом растительном материале в лаборатории бактериологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР» были протестированы различные коммерческие наборы по выделению ДНК (рис. 5):

- «Проба-ГС» (ООО «АгроДиагностика», Россия) – это основной комплект реагентов, применяемый в лаборатории бактериологии, подходящий для выделения ДНК бактериальных патогенов из растений и



Fig. 2. Preparing an analytical sample (photo by I.N. Pisareva)

Рис. 2. Подготовка аналитической пробы (фото И.Н. Писаревой)

семян. Метод основан на принципе лизиса тканей в растворе гуанидин тиоцианата (GuSCN) с адсорбцией total ДНК на поверхности сорбента (диоксид кремния) и дальнейших трехкратных промывок соответствующими растворами;

- «Проба-НК» (ООО «АгроДиагностика», Россия) – жидкофазный метод выделения, рекомендуемый для выделения нуклеиновых кислот из тканей листа. При использовании данного набора ткани растения растираются стерильным пестиком в микропробирке с лизирующим раствором. Полученный гомогенизат используется для выделения нуклеиновых кислот согласно инструкции производителя;

- «ФитоСорб» (ЗАО «Синтол», Россия). Набор для выделения ДНК из тканей растений. Методика выделения ДНК основана на сорбции ДНК на покрытых силикагелем магнитных частицах с последующим осаждением преципитирующим реагентом;

- «ФитоСорб-Автомат-48» (ЗАО «Синтол», Россия). Методика выделения ДНК основана на сорбции ДНК на покрытых силикагелем магнитных частицах с последующим осаждением преципитирующим реагентом. Комплект реагентов разработан для автоматической станции выделения ДНК;

- «Сорб ГМО-Б» (ЗАО «Синтол», Россия). Метод является многошаговым и сочетает освобождение ДНК из клеток с помощью ионного детергента цетилтриметиламмония бромида (ЦТАБ), экстракцию хлороформом, сорбцию ДНК на силиконизированных частицах и осаждение ДНК в

Состав реакционной смеси и условия амплификации ПЦР-РВ по Harper et al., 2010 (erratum 2013)

присутствии осаждающего реагента. Комбинирование метода ЦТАБ и сорбентно-осаждающего метода выделения ДНК обеспечивает высокую эффективность выделения ДНК.

Для оценки качества выделения ДНК использовали ПЦР в режиме «реального времени» (далее ПЦР-РВ) в соответствии с Harper et al., 2010 (erratum 2013). Целевая нуклеотидная последовательность расположена на участке 16S гена рРНК, кодирующего белок rimM. Для постановки данной ПЦР были использованы следующие праймеры и зонд: XF-F: 5'-CACGGCTGGTAACGGAAGA-3'; XF-R: 5'-GGGTTGCGTGGTGAAATCAAG-3'; XF-P: 5'-/6-FAM/-TCG CAT CCC GTG GCT CAG TCC-/BHQ-1/-3'.

В таблице приведен состав реакционной смеси и условия амплификации для данной ПЦР-РВ.

Амплификацию проводили на приборе «CFX96 Touch» («BioRad», США).

При постановке ПЦР-РВ использовали внутренний контроль амплификации (далее ВК) производства ЗАО «Синтол».

Детекция продуктов амплификации специфичной реакции проводилась по каналу FAM, а ВК – по каналу HEX.

Результаты и обсуждение

В результате сравнительных испытаний пяти коммерческих наборов для выделения ДНК наиболее

Компоненты	Объем (V), мкл	Конечная концентрация
Ультраточистая вода	16,15	-
5x ПЦР-буфер	5,0	1x
XF-F (10 pM/μl)	0,75	300 нМ
XF-R (10 pM/μl)	0,75	300 нМ
XF-P (10 pM/μl) (FAM)	0,25	100 нМ
ВК (HEX)	0,1	-
ДНК образца	2,0	-
Объем реакции	25,0	-
Условия амплификации		
Температура, °C	Время	Количество циклов
50	2 мин	1
95	10 мин	1
94	10 сек	40
62	40 сек	

эффективными для выделения ДНК *X. fastidiosa* оказался набор «ФитоСорб-Автомат-48» (ЗАО «Синтол», Россия). При его использовании прибор «CFX96 Touch» («BioRad», США) зарегистрировал самый ранний цикл детекции специфичных продуктов амплификации (28,9). «ФитоСорб» (ЗАО «Синтол», Россия) и «Проба-НК» (ООО «АгроДиагностика», Россия) оказались менее эффективными, но приемлемыми для использования (образцы сработали на 29,7 цикла). Если сравнивать эти два метода, то наиболее подходящим можно считать набор «ФитоСорб» (ЗАО «Синтол», Россия) из-за стабильного значения цикла детекции продуктов амплификации в четырехкратной повторности. Нестабильные результаты с использованием комплекта реагентов «Проба-НК» (ООО «АгроДиагностика», Россия) объясняется тем, что метод жидкофазный. Набор «Проба-ГС» (ООО «АгроДиагностика», Россия) сработал значительно хуже (детекция продуктов амплификации произошла на 32,4 цикла). Комплект реагентов «Сорб ГМО-Б» (ЗАО «Синтол», Россия) оказался непригодным для выделения ДНК *X. fastidiosa* (значение

цикла – 36,2). Также следует отметить, что ВК сработал во всех вариантах, что говорит об удалении ингибиторов реакции ПЦР при выделении ДНК (рис. 4).

Заключение

Результаты испытаний пяти наборов для выделения ДНК показали, что процедура подготовки проб перед выделением ДНК оптимальна и подходит для использования в рутинной диагностике.

Также при сравнении тестируемых методов выделения ДНК установлено, что наборы ЗАО «Синтол» «ФитоСорб-Автомат-48» и «ФитоСорб» наиболее подходят для выделения ДНК *Xylella fastidiosa*.

Литература

1. Стандарт ЕОКЗР РМ 7/24 (3) *Xylella fastidiosa*. ОЕПР/ЕРРО, 2016. С. 1-39.
2. Шнейдер Е.Ю., Каримова Е.В. Возбудитель заболевания *Xylella fastidiosa* – потенциально опасный для Российской Федерации и стран ЕАЭС бактериоз // Карантин растений. Наука и практика, 2018. № 1 (23). С. 14-23.
3. Dreo T., Pirc M. Krovno navodilo za dolocanje bakterije *Xylella fastidiosa* v vzorcih rastlin. NIB, 2018. V. 29. P. 4-8.
4. Maddox C.E., Laur L.M., Tian L. 2010. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. Current microbiology, V. 60. P. 53-58.
5. Purcell A.H., Hopkins D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. Annual Review Phytopathology, 1996. V. 34. P. 131-151.



Fig. 3. Transferring macerate to test tubes (photo by I.N. Pisareva)

Рис. 3. Перенос мацерата в пробирки
(фото И.Н. Писаревой)

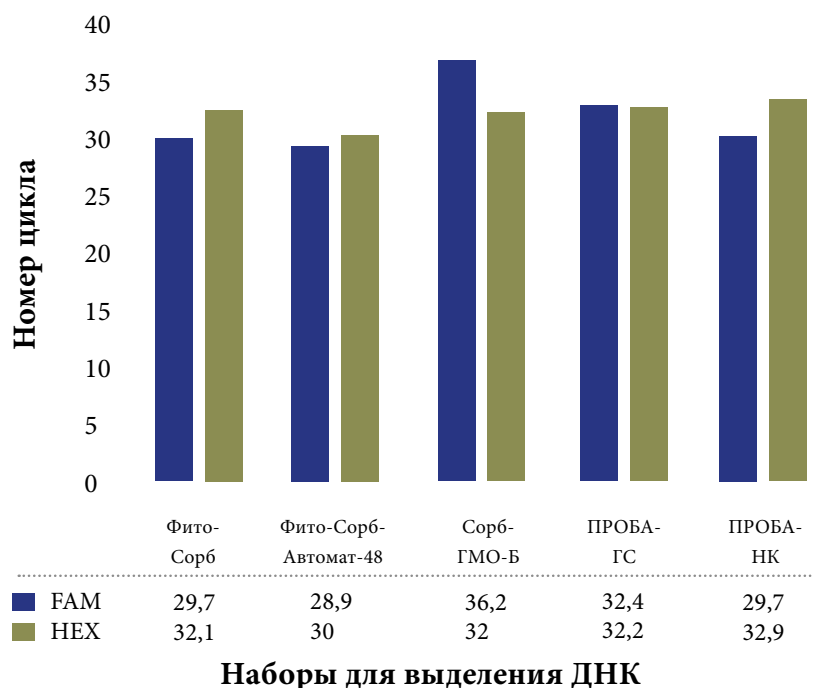


Fig. 4. Comparison of optimal DNA extraction variants for all tested reagent kits

Рис. 4. Сравнение оптимальных вариантов выделения ДНК по всем протестированным наборам реагентов

6. Rodrigues J.L.M., Silva-Stenico M.E., Gomes J.E., Lopes J.R.S., Tsai S.M. 2003. Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and gyrB sequences. Appl. Environ. Microbiol., V. 69 (7). P. 4249-4255.

7. Saponari M., Boscia D., Nigro F., Martelli G.P. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). Journal of Plant Pathology, 2013. V. 95 (3). P. 668.

8. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.xfactorsproject.eu/press_review/first-identification-of-xylella-fastidiosa-in-portugal.

9. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/shortnotes_qps/shortnotes_xylella.

10. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/xylella-fastidiosa>.

UDC 632.911.2:632.913.1

SEARCHING FOR THE OPTIMAL METHOD OF DNA EXTRACTION FROM SAMPLES OF *OLEA EUROPEA* L. PLANTS INFECTED with *Xylella fastidiosa* Wells et al.

I.N. Pisareva, Researcher of Bacteriology Laboratory of the LTC of FGBU “VNIKR”

S.I. Prikhodko, Head of the Bacteriology Laboratory of the LTC of FGBU “VNIKR”

G.N. Bondarenko, PhD in Biology, Head of the Laboratory Testing Center of FGBU “VNIKR”, Senior Lecturer, Agrotechnical Institute of Russian Peoples’ Friendship University

K.P. Kornev, PhD in Biology, Deputy Director of FGBU “VNIKR”

Abstract. The article provides an overview of information on the harmfulness of the bacteriosis pathogen *Xylella fastidiosa* Wells et al., host plants, preparation of analytical samples for analysis, as well as the results of testing and approbation of several extraction methods of bacteria DNA from olive samples (*Olea europaea* L.) with symptoms of the disease.

Keywords. Plant quarantine, quarantine pest, polymerase chain reaction,

bacteriology, *Xylella fastidiosa*, DNA extraction methods.

Introduction

Currently, *Xylella fastidiosa* Wells et al. is one of the most dangerous phytopathogenic bacteria in the world. The economic damage from diseases caused by *X. fastidiosa* is estimated at millions of dollars annually (Maddox et al., 2010). In September 2018, the European Food Safety Authority updated the list of host plants of

Xylella fastidiosa. The updated list includes 563 plant species. These species cover hundreds of plant genera in 82 botanical families (EFSA, 2018). Many of the most susceptible hosts are economically important crops such as grapes, citrus fruits, peach, plums, almonds, coffee, olive, alfalfa, blueberries, a number of ornamental plants, and many others (Saponari et al., 2013; EPPO Standard, 2016).

The disease caused by *Xylella fastidiosa* was first recorded and iden-

tified in 1884 in California. It is now recorded throughout the North American continent. In 2013, the bacteria was found on olive trees in south of Italy, in Apulia; in 2015, in France, on the island of Corsica, on ornamental plants *Polygala myrtifolia*; in 2016, on the Spanish island of Mallorca, on cherry plants *Prunus avium* and in Germany, on the pot plant *Nerium oleander* (www.eppo.int...). In January 2019, the first identification of *Xylella fastidiosa* in Portugal was reported. The bacterium was found in the decorative hedge of *Lavanda dentata* (www.xfactorsproject.eu...).

Temperature factor is believed to be a major constraint on the spread of the pathogen in temperate zones. However, there are many regions where one or more species of insect vectors are present they are at risk of invasion by cold resistant bacterial strains, such as leaf blotch of almond (Purcell, Hopkins, 1996). The main source of the pathogen's spread over great distances is planting material (Schneider, Karimova, 2018). Therefore, the main strategy for preventing infested plant material from import into the territory of the Russian Federation, where the phytopathogen is an absent quarantine pest, is the accurate and qualitative diagnosis of the pathogen.

Direct isolation of the pathogen from plant tissues is quite time consuming and can take up to three weeks. Despite the fact that *X. fastidiosa* actively reproduces in plant vessels, cultivation of the pathogen in vitro is very difficult due to its high sensitivity and high requirements to the components of nutrient media.

Isolation of bacteria from plant tissue is an important step to confirm the pathogen content in a plant sample. At the same time, immunofluorescence assay

and PCR analysis are considered to be the most effective and convenient methods for routine work with a large number of samples (Rodrigues et al., 2003). Molecular genetic and serological methods are used as screening methods on the way to isolation.

Research goal

The goal of research was to find the most sensitive method of DNA extraction of *X. fastidiosa* from plant material by testing various approaches for isolation and purification of nucleic acids.

Research objectives

The authors had the following tasks: optimization of the process of analytical sample preparation from symptomatic material; DNA extraction of *X. fastidiosa* by commercial kits selected for this study; conducting a real-time polymerase chain reaction (hereinafter referred to as PCR) to analyze the results of nucleic acid extraction and select the optimal method of DNA extraction.

Materials and research methods

Sample preparation from olive plants with symptoms of bacteria

Samples with symptoms of the disease were used for sample preparation (*Olea europaea* L., Italy) (Fig. 1).

After analysis of the procedures for preparation of plant material samples proposed in the diagnostic protocol EPPO PM 7/024 (3) and in the instruction of the National Institute of Biology NIB (Dreo, Pirc, 2018), the plant material preparation procedure was optimized for testing on the auspices of FGBU "VNIIRK".

The procedure for the formation of the analytical sample was as follows: the central veins and petioles of olive leaves

were cut out (Fig. 2) and crushed with a scalpel (at least 25 leaves were taken). A 0.5-2 g weighted amount was placed in a bag, filled with a sterile PBS buffer in a ratio of 1:8 and homogenized. Then the bags were transferred to the rotary shaker for 1 hour at 100 rpm for maceration. The macerate was transferred to two 1.5 ml tubes (Fig. 3) and centrifuged at 1500g for 10 min (thus removing large plant particles). The 1 ml supernatant ml was transferred to a new tube. Prior to the experiment, the tubes were stored at -20 °C.

Plant extract was prepared in the amount necessary to evaluate five methods of DNA extraction. A four-stage replication was used. The homogeneity of the material under study was achieved by careful mixing of the extracts stored at -20 °C in one container.

A tube with 1 ml of the extract was centrifuged for 10 min at 10000g and the supernatant was removed. A 200 µl lysing buffer was added to the sludge. The sludge with a lysing buffer was thoroughly mixed on a vortex and incubated for 30 min at 65 °C. The extraction was then performed in accordance with the instructions of the manufacturer of the kits.

DNA extraction

As a result of research on methods of detection and identification of the pathogen in the symptomatic plant material in the bacteriology laboratory of the Laboratory Testing Center of FGBU "VNIIRK" various commercial kits for DNA extraction (Fig. 5) were tested:

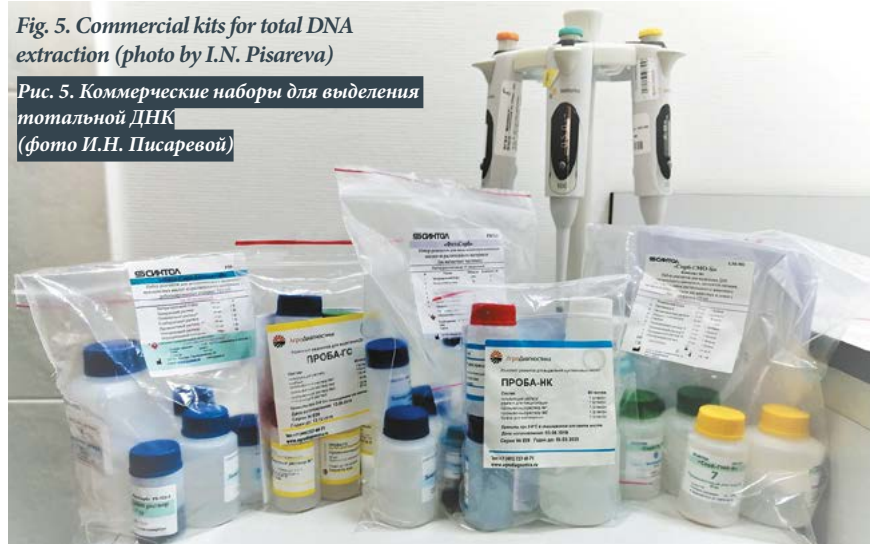
- **Proba-GS** (AgroDiagnostika, Russia) is a basic set of reagents used in the bacteriology laboratory, suitable for DNA extraction of bacterial pathogens from plants and seeds. The method is based on the principle of tissue lysis in guanidine thiocyanate (GuSCN) solution with total DNA adsorption on the surface of the sorbent (silicon dioxide) and subsequent triple rinsing with appropriate solutions;

- **Proba-NK** (AgroDiagnostika, Russia) – liquid-phase extraction method recommended for the extraction of nucleic acids from leave tissue. When using this set of tissues, plants are mashed with a sterile pestle in a microtube with a lysing solution. The resulting homogenisate is used to extract nucleic acids according to the manufacturer's instructions;

- **Phyto-Sorb** (Syntol, Russia). DNA extraction kit from plant tissue. The method of DNA extraction is based on

Fig. 5. Commercial kits for total DNA extraction (photo by I.N. Pisareva)

Рис. 5. Коммерческие наборы для выделения тотальной ДНК (фото И.Н. Писаревой)



DNA sorption on silica gel-coated magnetic particles with subsequent precipitation by the precipitating reagent;

- **Phyto-Sorb-Avtomat-48** (Syntol, Russia). The method of DNA isolation is based on DNA sorption on silica gel-coated magnetic particles with subsequent precipitation by the precipitating reagent. A set of reagents was developed for an automatic DNA extraction station;

- **Sorb GMO-B** (Syntol, Russia). The method is a multistep one that combines the release of DNA from cells with the use of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ion detergent, chloroform extraction, DNA sorption on siliconized particles, and DNA deposition in the presence of a precipitant. The combination of the CTAB method and the sorbent and precipitating DNA extraction method ensures high efficiency of DNA extraction.

To assess the quality of DNA extraction, we used real-time PCR (hereinafter referred to as RT-PCR) in accordance with Harper et al., 2010 (erratum 2013). The target nucleotide sequence is located in the 16S region of rRNA encoding the rimM protein. The following primers and a probe were used to set up this PCR:

XF-F: 5'-CACGGCTGGTAACG-GAAGA-3'; XF-R: 5'-GGGTTG-CGTGGTGAAATCAAG-3'; XF-P: 5'-/6-FAM/-TCG CAT CCC GTG GCT CAG TCC-/BHQ-1/-3'.

The table shows the composition of the reaction mixture and the amplification conditions for this RT-PCR.

Amplification was carried out on the CFX96 Touch device (BioRad, USA).

When setting up RT-PCR, internal control of amplification (hereinafter referred to as IC) produced by Syntol was used.

Detection of amplification products of the specific reaction was conducted via FAM channel, and IC – via HEX channel.

Results and discussion

During comparative testing of five commercial DNA extraction kits for DNA extraction **Phyto Sorb-Avtomat-48** kit (Syntol, Russia) proved to be the most effective for DNA extraction of *X. fastidiosa*. The CFX96 Touch device (BioRad, USA) registered the earliest detection cycle of specific amplification products (28.9). **PhytoSorb** (Syntol, Russia) and **Proba-NK** (AgroDiagnostika, Russia) proved to be less effective but acceptable for use (a positive detection was recorded at 29.7 cycle). Comparing these two methods, the most suitable one is **PhytoSorb** kit (Syntol,

Components	Volume (V), µl	Final concentration
Ultrapure water	16.15	-
5x PCR- buffer	5.0	1x
XF-F (10 pM/µl)	0.75	300 nM
XF-R (10 pM/µl)	0.75	300 nM
XF-P (10 pM/µl) (FAM)	0.25	100 nM
BK (HEX)	0.1	-
DNA sample	2.0	-
Reaction volume	25.0	-
Conditions for amplification		
Temperature, °C	Time	Number of cycles
50	2 min	1
95	10 min	1
94	10 seconds	40
62	40 seconds	

Russia) because of the stable value of the of detection cycle of amplification products in a four-stage replication. Unstable results using a **Proba-NK** set of reagents (AgroDiagnostika, Russia) can be explained by the fact that the method is liquid-phase. **Proba-GS** kit (AgroDiagnostika, Russia) showed an inferior detection capability (detection of amplification products occurred at 32.4 cycle). **Sorb-GMO-B** reagent kit (Syntol, Russia) turned out to be unsuitable for DNA extraction of *X. fastidiosa* (the cycle value was 36.2). It should also be noted that IC had a positive detection in all variants, which indicates the removal of PCR inhibitors during DNA extraction (Fig. 4).

Conclusion

Testing results from five DNA extraction kits have shown that the sample preparation procedure prior to DNA extraction is optimal and suitable for use in routine diagnosis.

Also, when comparing the methods of DNA extraction under test, it was found that **Phyto Sorb-Avtomat-48** and **Phyto Sorb** kits of Syntol are most suitable for DNA extraction of *Xylella fastidiosa*.

References

1. EPPO Standard PM 7/24 (3) *Xylella fastidiosa*. OEPP/EPPO, 2016. P. 1-39.
2. Schneider E.I., Karimova E.V. *Vozbuditel' zabolevaniya Xylella fastidiosa – potencial'no opasnyj dlya Rossijskoj Federacii i stran EAES bakterioz* [The causative agent of *Xylella fastidiosa* is a potentially dangerous bacteriosis for the

Russian Federation and EEU countries] // Plant quarantine. Research and Practice, 2018. No. 1 (23). P. 14-23.

3. Dreo T., Pirc M. Krovno navodilo za dolocanje bakterije *Xylella fastidiosa* v vzorcih rastlin. NIB, 2018. V. 29. P. 4-8.

4. Maddox C.E., Laur L.M., Tian L. 2010. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. Current microbiology, V. 60. P. 53-58.

5. Purcell A.H., Hopkins D.L. Fastidious xylem-limited bacterial plant pathogens. Annual Review Phytopathology, 1996. V. 34. P. 131-151.

6. Rodrigues J.L.M., Silva-Stenico M.E., Gomes J.E., Lopes J.R.S., Tsai S.M. 2003. Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and gyrB sequences. Appl. Environ. Microbiol., V. 69 (7). P. 4249-4255.

7. Saponari M., Boscia D., Nigro F., Martelli G.P. Identification of DNA sequences related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive trees exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (Southern Italy). Journal of Plant Pathology, 2013. V. 95 (3). P. 668.

8. [Electronic source]. – Access mode: https://www.xfactorsproject.eu/press_review/first-identification-of-xylella-fastidiosa-in-portugal.

9. [Electronic source]. – Access mode: https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plant_quarantine/shortnotes_qps/shortnotes_xylella.

10. [Electronic source]. – Access mode: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/xylella-fastidiosa>.

УСАЧ РАДДЕ *NEOCERAMBYX RADDEI* BLESSIG – угроза дубравам европейской России

А.В. Шамаев, старший научный сотрудник отдела лесного карантина ФГБУ «ВНИИКР»

Аннотация. Работа посвящена описанию морфологии и биологических особенностей усача Радде *Neocerambyx raddei* (Coleoptera, Cerambycidae) – дальневосточного вредителя дубовых древостоев. Дан анализ его вредоносности и прогноз последствий в случае проникновения этогоксилофага на территорию европейской части РФ.

Ключевые слова. Усачи, повреждения, вероятность проникновения, акклиматизация, потенциальная оценка вредоносности, Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза.

Введение

Усач Радде *Neocerambyx raddei* Blessig – дальневосточный вредитель. Жук – олигофаг, он является одним из важнейших вредителей дуба и каштана съедобного. *N. raddei* выбирает ослабленные в результате действия тех или иных неблагоприятных факторов дерева.

Этот вид происходит из Китая, в настоящее время распространен также в большей части Кореи и Японии, и его ареал расширяется.

Кроме огромного физиологического вреда, усач Радде наносит большой технический вред. Из деревьев, заселенных усачом, выходит не более 10% деловой древесины. В результате поражения дерева усачом *Neocerambyx raddei* происходит заселение растения вторичными вредителями – короедами, златками, другими видами усачей. Таким образом происходит расширение очага заражения.

Его основное влияние на окружающую среду проявляется в городах, расположенных в условиях теплого климата, где крупные листопадные деревья имеют особую эстетическую ценность (Tang, Yang et al., 2011).

Вся зона потенциальной акклиматизации подвержена риску эко-

номического ущерба. *Neocerambyx raddei* скорее всего будет повреждать лесонасаждения, имеющие в своем составе виды дуба или каштана съедобного, особенно в странах вокруг Средиземноморья и Черного моря.

Имаго. Хорошо отличается от других видов подсемейства Cerambycinae крупными размерами тела, вытянутыми гладкими надкрыльями и поперечно-морщинистой переднеспинкой. Голова уже переднеспинки, чуть вытянутая, в плотно прилегающих волосках, направленных вперед, щеки в длину меньше, чем в ширину, лоб у основания усиков бугровидно-выпуклый, посередине с узкой бороздкой, переходящей в область темени, затылок в мелких густых точках. Глаза крупные, широко и очень глубоко выемчатые, верхние доли маленькие, более чем в 2 раза уже нижних долей. Усики значительно длиннее (♂) или чуть короче (♀) тела, их 3-й членик в 2 раза длиннее 1-го, едва короче 4-го и 5-го члеников вместе взятых.

Переднеспинка в передней половине сильно, а в задней слабо сужена, около переднего края с явственным перехватом, у основания с поперечной бороздкой, в поперечных глубоких морщинах, в плотно прилегающем серовато-желтом волосном покрове, направленном в задней половине спереди, в передней – назад, на боках в стоячих редких щетинках. Щиток плоский, на вершине узкозакругленный, в мелких прилегающих волосках.

Надкрылья длинные гладкие, параллельносторонние (♀) или к вершине чуть суженные, на вершине узкозакругленные, на внутреннем шовном крае с оттянутым острым шипиком, в мелких густых прилегающих серовато-желтых волосках. V стернит брюшка на вершине узковыемчатый (♂) или широкозакругленный (♀). Ноги срав-

нительно длинные, бедра параллельносторонние, плоские. Задние лапки короче голеней. Тело, усики, надкрылья и ноги буроватые, с рыжеватым оттенком. Длина тела 35-52 мм (рис. 1) (Черепанов, 1981).

Личинка. В старшем возрасте характеризуется крупным телом, наличием двигательных мозолей на I – VII сегментах брюшка, слабым развитием грудных ног. Тело белое. Длина тела личинок старшего возраста до 65 мм. Голова на переднем крае темно-бурая, почти черная, с рыжеватым оттенком. Верхние челюсти черные. Голова втянута значительно в переднегрудь, почти наполовину уже переднегрудь, ширина головы до 8 мм. Переднегрудь заметно шире среднегрудь. Переднеспинка к голове покатая, в передней половине и на боках в коротких щетинковидных волосках. Щит переднеспинки выпуклый, на боках ограничен продольной прямой бороздкой, в тонких продольных морщинках, на боках около задних углов иногда в мелких редких волосках. Переднегрудь у личинок младшего возраста в густоватых тонких, у личинок старшего возраста в редких толстых щетинковидных волосках, окантованных на основании склеротизированным рыжеватым колечком. Переднегрудь незначительно выпуклая, кожистая, на вершине широкозакругленная, по бокам в редких щетинковидных волосках. Основание простернума (basisternum) кожистое, тонкоморщинистое. Грудные ноги короткие, слабо развитые, с коротким приростенным коготком.

Брюшко толстое, к вершине незначительно суженное, на боках в коротких тонких, негустых волосках. Дорсальные двигательные мозоли слабо выпуклые, кожистые, в более или менее выраженных морщинках (образующих иногда, особенно у личинок старшего возраста, сетчатую гранулированность), разделены



Fig. 1. Chestnut trunk borer (male to the left, female to the right) (no <https://www.zin.ru/ANIMALIA/COLEOPTERA/rus/neoradzi.htm>)

Рис. 1. Усач Радде (слева самец, справа – самка) (<https://www.zin.ru/ANIMALIA/COLEOPTERA/rus/neoradzi.htm>)

продольной общей бороздкой и двумя поперечными бороздками, соединяющимися на боках с латеральными продольными расходящимися назад бороздками. Вентральные двигательные мозоли у личинок младшего возраста слабморщинистые, у личинок старшего возраста явно гранулированные, разделены поперечной бороздкой, соединенной с латеральной продольной бороздкой, имеющей у личинок старшего возраста вид глубокой вмятины, с отходящими от нее морщинами (рис. 4) (Черепанов, 1981).

Географическое распространение. Усач Радде *Neocerambyx raddei* Blessig широко распространен в лиственных лесах Азии (рис. 2).

Азия: Китай (Аньхой, Фуцзянь, Гуйчжоу, Хэбэй, Хэйлунцзян, Хубэй, Хунань, Цзянсу, Цзянси, Гирин, Ляонин, Шэньси, Шаньдун, Шаньси, Сычуань, Юньнань, Гуанси, Чжэцзян).

Япония (Хонсю, Шикоку), Корея (Народно-Демократическая Республика, Республика Корея, Тайвань, Вьетнам (ЕПРО, 2015, 2016).

Российская Федерация (Дальний Восток: Приморский край, Хабаровский край, Амурская обл., Еврейская АО).

Биологические особенности. Развивается преимущественно на дубе (*Quercus* spp.) и каштане (*Castanea* spp.). Из литературных данных известен следующий перечень растений-хозяев: *Castanea crenata*, *C. mollissima*, *Castanea sativa*, *Quercus acuta*, *Q. acutissima*, *Q. aliena*, *Q. dentata*, *Q. liaotungensis*, *Q. mongolica*,

Q. serrata, *Q. variabilis*. Как растения-хозяева также упоминаются *Castanopsis cuspidata*, *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii*, *Morus* sp. и *Paulownia* sp. (развитие на последних двух древесных породах отмечено, но однозначно не подтверждено последними наблюдениями) (Черепанов, 1981, Pest Risk Analysis., 2018, Tang, Yang at al., 2011).

Усач в Приморском крае обитает в широколиственных лесах. Лет жуков в Приморском крае происходит в конце июля и в августе. В южных частях ареала: пров. Гуанси, Китай, по наблюдениям автора, лет начинается во второй половине июня. Жуки летят ночью на свет. Заселяют преимущественно стволы угнетенных растущих деревьев дуба диаметром до 52 см (Черепанов, 1981; Tang, Yang at al., 2012a). Ветви и стволы диаметром менее 9 см (и с толщиной коры < 0,5 см) не заселяются усачом, поэтому молодые деревья не привлекательны для жука (Черепанов, 1981, Pest Risk Analysis., 2018, Tang, Yang at al., 2011). Личинки живут сначала под корой, затем в древесине, прокладывают продольные ходы (рис. 3). Личинка при развитии проходит шесть личиночных возрастов. Стадия личинки длится более чем 1020 дней. В первый год личинки зимуют на 2-й и 3-й личиночной возрастной стадии, во второй год – личинки 4-го и 5-го возрастов, и в третью зиму все личинки в 6 возрасте (взрослые личинки). Трехлетняя генерация приводит к массовому появлению имаго каждые 3 года. Личинки живут и повреждают дубовые стволы, как правило, на высоте ниже 4 м, а окукливание происходит в нижней части (1-4 м) ствола. Количество личинок прямо зависит от толщины коры и диаметра ствола (Fu, 2010; Tang, Wang at al., 2012a).

Личинки последнего возраста делают куколочную колыбельку продольно стволу (Черепанов, 1981; Tang, Yang at al., 2011). Куколки появляются в конце июня и июле (в Приморском крае РФ). Молодые жуки отрождаются преимущественно в июле – августе. Поселение усача обуславливает гибель ослабленных деревьев (Sun at al., 2010; Sun, 2001; Tang, Yang at al., 2012b). Исследования, проведенные в Китае, показали, что имаго усача Радде могут питаться соком, сочащимся из ран, которые они сами наносят на стволы дуба.

Цикл развития усача Радде длится 3 года. В китайских провинциях Ляонин, Гирин и Внутренняя Монголия пик появления имаго приходится на даты с 20 июля по 10 августа. Выход имаго показал положительную корреляцию с температурой, но отрицательную корреляцию с относительной влажностью в дубовых древостоях (Fu, 2010; Pest Risk Analysis., 2018; Sun, 2001; Sun at al., 2010).

Способы распространения и переноса

Пути естественного распространения *Neocerambyx raddei* в мире. Имаго *Neocerambyx raddei* хоть и способны к полету, но характеризуются относительно низкой миграционной активностью – согласно литературным данным, летают жуки мало и неохотно, большую часть времени проводя на том дереве, где проходило их развитие. Имаго в среднем способны разлетаться на 160 м, но максимальная дистанция полета может достигать 950 м (Pest Risk Analysis., 2018; Sun, 2001). Следовательно, распространение данного вредителя за счет естественной миграции нецелесообразно рассматривать как значимый для расширения его ареала фактор. Значительно более вероятным представляется завоз *Neocerambyx raddei* с фрагментами крупных деревьев в новые регионы, где вредитель ранее отсутствовал: способствовать этому может транспортировка древесины различного качества и назначения: круглой неокоренной и окоренной древесины, пиломатериалов, щепы и т.д. (МСФМ 9, 2004; МСФМ 15, 2004; Стандарт ЕОКЗР РМ 8/3, 2010; Pest Risk Analysis., 2018; Sun, 2001; VKM, 2013).

Распространение *Neocerambyx raddei* с растительной продук-

цией при международной торговле. Наиболее вероятный и быстрый путь распространения усача Радде – перевоз личинок, куколок и имаго в различных лесоматериалах при торговле, в частности с:

- а) лесоматериалами,
- б) древесной тарой, упаковкой,
- в) древесными отходами,
- г) необработанными деревянными изделиями,
- д) крупномерным посадочным материалом (диаметром более 9 см), являющимся растением-хозяином для усача;
- е) другими грузами (не с кормовыми растениями).

Особое внимание следует обратить на возможность заноса вредителя с деревянной тарой, поддонами (EPPO, 2015; Massaro & Passari, 2012; Pest Risk Analysis..., 2018).

Лесоматериалы, тара и древесные отходы. Основным способом распространения вредителя является перемещение лесоматериалов, зараженной тары или иных упаковочных древесных материалов из одной страны в другую. Это могут быть бревна, дрова, различные пиломатериалы, поддоны, деревянная тара.

Древесные упаковочные материалы, не обработанные термически или химически (в соответствии с МСФМ 15), являются наиболее вероятным путем заноса карантинных насекомых-ксилофагов. В процессе международной торговли перемещаются огромные количества товаров в деревянной упаковке. Так, например, по оценкам, основанным на анализе количества грузовых контейнеров, перевозящих товары из Китая в ЕС, ежегодно из Китая прибывает около 4 млн грузовых контейнеров, содержащих упаковочный материал из твердой древесины (Pest Risk Analysis..., 2014; Pest Risk Analysis..., 2018).

Древесные отходы и дрова могут с большей вероятностью содержать вредные организмы, чем круглая древесина или пиломатериалы, поскольку, как правило, они более низкого качества. Однако выживание личинок в древесных отходах зависит от размера кусков дерева, и от того, подвергались ли они обработке (например, древесные отходы могут агломерироваться в брикеты или аналогичные формы, а агломерация повреждает вредный организм) (Alakangas, 2010; CEN, 2011; EPPO,

2015; Pest Risk Analysis..., 2018; Sun et al., 2010).

Опилки не являются путем распространения для *Neocerambyx raddei*, поскольку вредный организм не может выжить в этом товаре (Pest Risk Analysis..., 2014; Pest Risk Analysis..., 2018).

Предполагаемое использование импортируемых древесных отходов неизвестно. Если они используются для производства энергии (сжигания), то вероятность переноса очень низка. Она может быть выше, если древесные отходы хранятся на открытом воздухе минимум несколько недель, в подходящих условиях для появления вредных организмов и в непосредственной близости от растений-хозяев (VKM, 2013).

Древесная щепка (чипсы) и древесная масса. Партии древесной щепы часто представляют собой смесь древесины различных пород. Они могут содержать ограниченное количество видов древесины кормовых растений, что снижает вероятность заноса этим путем распространения (Alakangas, 2010).

Процесс производства древесных чипсов (щепы), т.е. измельчение и откалывание, обычно исключает возможность развития насекомых-ксилофагов (например, *A. glabripennis* (Alakangas, 2010)). Однако в результате экспериментов, проведенных на другом ксилофаге, *Agrilus planipennis*, McCullough et al., 2007, отмечено, что небольшой процент личинок может выжить в процессе откалывания, когда на измельчающих или шлифовальных машинах имеется сито размером более 2,5 см. Размер личинок поздних возрастов развития *Neocerambyx raddei* достигает 38-65 мм в длину, куколок – 26-52 мм, взрослых особей – 25-52 мм (Черепанов, 1981; Tang, Yang et al., 2011). Только поздние фазы развития личинок, куколки и взрослые особи, возможно, завершат свое развитие, если они выживут в процессе измельчения. На ранних этапах личинки вряд ли продолжат свое развитие. Яйца *Neocerambyx raddei* откладываются на живых деревьях и не будут отложены на древесных чипсах после переработки.

Европейский стандарт по твердому топливу идентифицирует четыре класса древесной щепы (чипсов) в

соответствии с размером частиц (т.е. проходящих через сито с круглыми отверстиями указанного размера); в самом большом классе по меньшей мере 75% древесных чипсов должны составлять 8-45 мм, максимум на 6% больше 63 мм (но меньше, чем 120 мм).

Во время хранения и транспортировки внутри сердцевины ствола могут достигаться смертельные для организмов температуры (в результате процесса компостирования), и многие особи не выживут. Однако часть организмов может выжить, особенно в периферийных частях, где температура ниже (ЕОКЗР РМ 5/3, 2007; Van der Gaag et al., 2008; Yang et al., 2011). Занос будет наиболее вероятным, если древесные чипсы будут отгружены вскоре после производства и будут храниться на открытом воздухе (т.е. давая время вредителю для завершения развития) или использоваться для мульчирования.

Чипсы (щепка) размером менее 2,5 см в каждом измерении не могут служить путем распространения усача Радде. Щепка большего размера, термически либо химически обработанная не может содержать усача ни на одной стадии развития.

Отходы деревообработки в виде стружки не могут быть путем распространения как усача Радде, так и других стволовых вредителей.

Растения для посадки растений-хозяев (кроме сеянцев и семян) из мест, где обитает *Neocerambyx raddei*. Яйца могут присутствовать в коре, личинки и куколки в стволах или ветвях (Gressitt, 1942). Данный путь распространения включает также корни.

Риск заноса этим путем может быть только через крупномерные саженцы растений-хозяев диаметром 9 см и более (Massaro & Passari, 2012; Pest Risk Analysis..., 2014; Pest Risk Analysis..., 2018; Tang, Yang et al., 2011).

Срезанные ветви. Срезанные ветви могут импортироваться с декоративными целями. На срезанных ветвях могут присутствовать яйца и личинки. Однако срезанные ветви, как правило, слишком малы для того, чтобы личинки завершили свое развитие (толщина ветви должна быть не менее 9 см). Поэтому риск передачи растению-хозяину, где вредный организм смог бы завершить свой жизненный цикл, очень маловероятен (EPPO, 2015). Нет никаких дан-



Fig. 2. Geographical distribution of *Neocerambyx raddei* in the world (EPPO Global Database, 2015)

Рис. 2. Географическое распространение усача Радде *Neocerambyx raddei* в мире (EPPO Global Database, 2015)

ных, что *Quercus* или другие виды растений-хозяев используются для этой цели.

Информация по распространению *Neocerambyx raddei* другими путями (не с кормовыми растениями).

С другой продукцией («автостопом»). Вредные организмы потенциально могут присутствовать при любом импорте или при перемещении импортируемых товаров, однако риск будет ограничен количеством взрослых особей, а наличие более одной взрослой особи в партии маловероятно. Существует большой риск интродукции в портах и других пунктах въезда из-за возможного хранения большого количества импортируемых товаров, что увеличивает вероятность одновременного присутствия нескольких взрослых особей и их спаривание. Также риск увеличивает факт привлечения имаго источниками света.

Взрослые особи могут присутствовать на хранящихся товарах до вывоза. Наличие зараженных деревьев в окрестностях складов и терминалов будет способствовать дальнейшему заражению. Вредные организмы встречаются во время лета взрослых особей. Данный период очень длинный и различается в странах в зависимости от их географического положения.

Имаго *Neocerambyx raddei* могут контактировать с товарами для экспорта с мая по сентябрь с максимальным риском с середины мая до сентября.

Кора растений-хозяев. Только яйца могут быть связаны с корой, поскольку они откладываются в трещинах на коре (Pest Risk Analysis..., 2018;

Tang, Yang et al., 2011). Однако вредный организм не сможет завершить свое развитие в изолированной коре и, следовательно, не сможет перейти на подходящего хозяина.

Фрукты, семена растений-хозяев, почва. Неимагинальные стадии *Neocerambyx raddei* не встречаются на (в) этих частях растения-хозяина или в почве и поэтому их вряд ли можно будет занести с данной продукцией.

Мебель и предметы, сделанные из древесины кормовых растений (растений-хозяев). Личинки и куколки могут присутствовать в мебели и других предметах, в частности в деревянных деталях, которые не видны снаружи (например, рамы кровати). Обработка (например, распил) может уничтожить некоторые из них, но не все, а личинки и куколки с большей вероятностью завершат свое развитие и появятся на поздних этапах жизни. Сообщается о появлении из мебели подобных вредных организмов, таких как *Monochamus* spp. (Pest Risk Analysis..., 2014), *Semanotus* spp., *Chlorophorus* spp., *Batocera* spp. (ЕОКЗР РМ 8/3, 2010; FAO, 2013a; Löbl & Smetana, 2010).

На складах, где продолжительное время хранится большое количество мебели, вероятность появления нескольких взрослых особей, которые могли бы спариться, выше, чем в случаях, когда деревянный материал в сжатые сроки отправляется конечному потребителю.

Перенос более вероятен с предметами и мебелью для уличного использования, чем с предметами и мебелью для использования в помещении (SEAP, 2009; Sun, 2001). Однако древесина *Quercus* непригодна для исполь-

зования на открытом воздухе, если не высушена и (или) не обработана против возможных древесных гнилевых болезней и вредных организмов соответствующими фунгицидами/инсектицидами.

Движение одиночных особей, доставка живых жуков, например, продаваемых и обмениваемых коллекционерами. Усачи популярны среди коллекционеров жуков; имаго *Neocerambyx raddei* могут обмениваться энтомологами-энтузиастами, но скорее всего они будут реализовываться в виде высушенных образцов.

Вредоносность

По данным литературы, на зараженных деревьях наблюдается усыхание кроны. Отмечено, что в течение последних двух десятилетий вспышки *Neocerambyx raddei* наблюдались в Северо-Восточном Китае (в частности в провинциях Цзилинь, Внутренняя Монголия (Neimenggu, Ляонин) на монгольском дубе и *Q. liaotungensis*, вызвавшие экологический и экономический ущерб. В этих зараженных дубовых лесах 45% деревьев были заселены усачом (Fu, 2010, FAO; 2013a; Smith et al., 2004; Wang, Yang et al., 2010b).

Более жизнеспособные деревья дуба в лучших условиях местопроизрастания, как правило, сопротивляются жизнедеятельности личинок, заливая их соком, а места повреждений заращивают каллюсным валиком с образованием утолщений ствола. Этот вид предпочитает нападать на спелые и перестойные деревья, и даже в случаях их выживания заражение усачом приводит к значительным задержкам роста, опаданию

листвы, снижению энергии роста и товарности древесины (из-за плотно расположенных протяженных галерей, сделанных личинками глубоко в древесине).

Ущерб, наносимый деревьям каштана съедобного, может быть особенно значительным, так как усач предпочитает нападать на ослабленные деревья, а на Северо-Западном Кавказе РФ деревья каштана в настоящее время уже сильно ослаблены энтодиевым раком, вызываемым грибным патогеном *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr (EPPO, 2016). К тому же потенциальные конкуренты усача Радде – усачи рода *Cerambyx* не повреждают деревья каштана, их излюбленным кормовым растением является дуб. При акклиматизации усача Радде в районах произрастания каштана съедобного, усач может вызвать 100% гибель каштановых древостоев.

Усач повреждает стволы дубов, в особенности таких видов: *Quercus liaotungensis* и *Q. mongolicus*, и наносит значительные повреждения в естественных дубовых лесах. Этим вредителем в китайской провинции Ляонин было заражено около 264 000 га, или 40% от дубового древостоя. Плотность популяции обычно высокая, в среднем 6,5 индивидуальных яйцекладок, максимум 156 яиц на 1 дереве (Fu, 2010; Pest Risk Analysis., 2018; Tang, Yang et al., 2011).

Вредитель атакует в основном дубы на грядах, на верхних склонах и солнечных склонах гор (Tang, Yang et al., 2011).

Методы выявления

Мониторинг. Растения могут быть осмотрены визуально на признаки наличия вредного организма: выходные отверстия или присутствие личинок *Neocerambyx raddei* (Pest Risk Analysis., 2018; Tang, Yang et al., 2011) (рис. 4). Пораженные стволы деревьев обычно выделяют сок, которым питаются взрослые жуки. Регулярные наблюдения необходимы, чтобы обнаруживать заражение на раннем этапе. Взрослые особи являются большими жуками (2,5-5,2 см), что позволяет легко их обнаружить. Хорошо известно, что усачей легко можно привлечь с помощью питательных жидкостей, однако эти методы эффективны против ксилофагов, которые питаются мертвой или гнилой древесиной, и менее или совсем

не эффективны для других видов, особенно для таких, которые поражают живые деревья, в частности *Neocerambyx raddei*. В действительности, подобная ловушка эффективней всего, когда относительная влажность воздуха низка, потому что взрослые особи ищут воду. Этот метод пока не является надежным или эффективным для подтверждения обнаружения.

Применение световых ловушек. В Китае ловушки по принципу «привлечь и уничтожить» (оснащенные УФ-лампами) продаются растениеводам (торговая марка “Bodisun”), но их эффективность еще не подтверждена документально для *Neocerambyx raddei*.

На основе изучения фототаксиса имаго усача Радде было обнаружено, что специальный черный свет привлекает взрослых жуков (Yang, Tang, 2011). Были испытаны десять разных источников ультрафиолетового света с длиной волны около 300 нм как в помещении, так и в лесу. Результаты оказались фантастическими: один источник света привлекал в период активности имаго максимум 20 кг жуков усачей (430 особей взрослых жуков весом 1 кг в среднем) за одну ночь. В 2008 году в провинции Гиринь специальная световая ловушка черного света привлекла и уничтожила 24,16 т имаго усача Радде и 14,95 т было уничтожено в 2011 году. Самки жуков из ловушек в период пика раннего появления были вскрыты, и они содержали около 30 яиц, почти столько же, сколько у девственных самок. Эти результаты свидетельствуют о том, что отловленные самки перед привлечением на свет даже не успели еще отложить яйца. Таким образом, большая часть популяции вредителя была ликвидирована до размножения. В провинции Гиринь плотность вредителей в лесной зоне была снижена примерно на 90%, при применении ловушек черного света (Yang, Tang, 2011).

Вероятность проникновения и акклиматизации *Neocerambyx raddei* в европейской части России

Северная граница активного распространения усача *Neocerambyx raddei* проходит приблизительно по широте 52° с.ш. На территории России данная широта соответствует южной части Хабаровского края и Амурской области. Для европейской части Российской Федерации это: Курская, Во-

ронезская, Саратовская и Оренбургская области, а на юге – Крым, Кавказ, а также Черноморское побережье.

Относительно благоприятными зонами для распространения и проявления вредоносности вредителя является территория, расположенная южнее широты Ростовской области. Это следующие регионы: Краснодарский край, Ставропольский край, Республика Крым, Ростовская область, Астраханская область, Республика Калмыкия, Республика Дагестан, Республика Карачаево-Черкесия, Республика Кабардино-Балкария, Северная Осетия – Алания, Чеченская Республика, Республика Ингушетия.

Наиболее близкий тип климата из перечисленных выше – в Краснодарском крае, Республике Крым.

Меры борьбы

с *Neocerambyx raddei* Blessig

Используемые методы контроля включают фитосанитарные меры, такие как проведение карантинного мониторинга в питомниках, сожжение зараженного растительного материала, а также обрезка и сожжение зараженных деревьев. Деревья также можно обрабатывать при помощи химических и биологических инсектицидов.

Методы возможного контроля усача *Neocerambyx raddei* на территории России. К числу основных методов контроля в районах, где усач *Neocerambyx raddei* отсутствует, относятся карантинные мероприятия.

Целью данных мер является предотвращение завоза извне на другую территорию усача *Neocerambyx raddei*. Карантинные мероприятия предполагают ограничение ввоза древесины из районов распространения усача *Neocerambyx raddei*. Это страны: Китай, Корея, Япония, Вьетнам. Также необходим тщательный досмотр грузов, прибывающих из Дальневосточного региона РФ, в особенности всех видов древесины дуба, включая тару из дуба. Древесина, ввозимая из этих регионов, должна быть обработана методами, которые обеспечивают полную гибель вредителя. Фитосанитарные меры достаточно подробно изложены в стандартах ЕОКЗР РМ 8/3 и др. (МСФМ 9, 2004; МСФМ 11, 2004; МСФМ 15, 2004; Стандарт ЕОКЗР РМ 8/3, 2010; Alakangas, 2010; CEN, 2011; FAO, 2013a).



Fig. 3. Larvae galleries of the chestnut trunk borer on the cut trunk of Mongolian oak (photo by the author)

Рис. 3. Личиночные ходы усача Радде на стипе ствола монгольского дуба (фото автора)

Химическое регулирование. Известны следующие способы: нанесение пестицидов на стволы деревьев (как краску) для регулирования личинок, инъекции пестицидов в выходные отверстия или блокирование выходных отверстий тканью (пропитанной пестицидами) для уничтожения личинок и взрослых особей, и фумигация зараженных деревьев конкретными пестицидами. Некоторые инсектициды применяются в Китае (SEAP, 2009; Sun, 2001).

Рекомендованные химические вещества (из списка пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, 2019 год):

- для регулирования личинок, которые уже в древесине: диметоат, малатион, дельтаметрин, фенитротрион и имидаклоприд;
- для регулирования яиц: фенитротрион, дельтаметрин, фипронил и циперметрин.

Многие из перечисленных выше активных веществ имеют ограничения в использовании (например, они не могут применяться в период цветения или применяются за относительно большой период времени до сбора урожая). Распыление инсектицидов применяется только против взрослых особей, но оно эффективно лишь в случаях контакта или попадания внутрь. Используемые в настоящее время инсектициды, такие как пире-

троиды (например, дельтаметрин, циперметрин) против листогрызущих (листовертки, тля и др.) вредителей могут быть в некоторой степени эффективны, но они не обеспечат защиту на весь период лета *Neocerambyx raddei*.

Системные инсектициды, такие как имидаклоприд, могут применяться на декоративных деревьях методом инъекций или обработкой почвы, но данная обработка из-за высокой себестоимости не может применяться в лесных биоценозах. Данный вид обработки нерентабелен, особенно для применения на больших площадях. Был изучен опыт инъекции стволов системными инсектицидами для регулирования вида *Anoplophora*, однако инъекция не позволяет полностью регулировать вредный организм (Van der Gaag et al., 2008) и может привести к некоторым нежелательным побочным эффектам (Yu, Sun, & Mei, 2005). Хотя, возможно, целесообразно применять этот метод к некоторым ценным одиночным деревьям.

Некоторые инсектициды, которые в настоящее время применяются в садах, могут быть эффективны против *Neocerambyx raddei*, но они не предоставляют защиту в течение всего периода лета имаго вредителя (SEAP, 2009).

Чтобы замедлить процесс развития резистентности к инсектицидам, последующие поколения вредных организмов не должны обрабатываться действующими веществами из той же группы по принципу действия.

Биологический метод контроля. Для контроля молодых личинок жука был выпущен паразитоид, *Sclerodermus pupariae* Yang et Yao (Hymenoptera: Bethyridae) (Tang et al., 2012a; Wang et al., 2010b; Zhong-Qi Yang, 2014). Паразитизм изучался на личинках 1-го и 2-го возрастов *Neocerambyx raddei* в лабораторных условиях. Результаты показали, что большое количество молодых личинок жука погибают в результате питания паразитоида, обеспеченность дополнительного питания паразитоида значительно увеличивается с увеличением плотности личинок хозяина. В результате полевых испытаний выяснилось, что паразитоид предпочитал питаться на личинках вредителя с 1-го до 3-го возраста; хозяева более старших возрастов не поражались. Степень паразитизма достигала 65,6% (Wang, Yang et al., 2010b).

С целью поддержки численности паразита в биоценозах были проведены исследования по поиску альтернативных хозяев паразита. На деревьях дуба в качестве возможных альтернативных хозяев были выявлены жуки-ксилофаги: *Moechotypa diphysis*, *Mesosa myops* (Coleoptera: Cerambycidae), *Lamprodila virgata* (Coleoptera: Buprestidae). Наблюдения в лесах показали, что эти виды могут поддерживать развитие паразитов в период, когда личинки основного хозяина (*N. raddei*) становятся старше 3-го возраста и из-за этого не пригодны для развития паразита. Вышеуказанные жуки-ксилофаги вполне способны поддерживать эффективную численность паразита (Tang, Wang et al., 2012a; Wang, Yang et al., 2010b; Zhong-Qi Yang et al., 2014).

Паразит *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothrideridae) (организм, специализирующийся на *N. raddei*) может контролировать численность популяций усача на стадиях личинок и куколок. Этот паразит был обнаружен в личиночных ходах усача Радде в лесу Мэйхэкоу, горы Чанбайшань, китайская провинция Гирин. Изучена его биология, поведение, поиск хозяев, зависимость от температуры, разработана методика массового разведения и выпуска паразита в целях биологического контроля (Tang, Yang et al., 2012b; Wang et al., 2004; Wang et al., 2012a; Wei et al., 2008a; Wei et al., 2008b; Wei et al., 2009a; Wei et al., 2009b; Yang, Tang et al., 2012b; Yang, Li et al., 2012a). Выяснилось, что *Dastarcus helophoroides* паразитирует на личинках старших возрастов (выше 3-го) и куколках, не повреждая личинок 1-3 возраста. Испытания в лесах показали, что заражение паразитом достигло 88,8% через 40 дней после выпуска взрослых паразитов и 93,1% через 30 дней после высвобождения их из яйца. Среднее количество паразитов, вышедших из зараженного хозяина, было 30 в лабораторных испытаниях и от 28 до 68 в поле. Даже если только одна особь личинки паразита была найдена на личинке хозяина, она может убить вредителя (Yang, Tang et al., 2012b). Обнаружено, что существует восемь видов жуков-усачей, обитающих в дубравах, с четырьмя преобладающими видами: *N. raddei*, *Moechotypa diphysis*, *Mesosa myops* и *Stenygrinum quadrinotatum*. *Moechotypa diphysis* и *Mesosa myops* в дубовых лесах всегда присутствуют в стадиях личинок старших

возрастов, в то время как личинки *N. raddei* находятся на стадии младших (1-3-го возрастов) и не пригодны для развития *Dastarcus helophoroides*. Эти два вида Cerambycidae являются основными альтернативными хозяевами *D. helophoroides* в дубовых лесах Северо-Восточного Китая, позволяя паразиту поддерживать высокую плотность популяции.

Относительно недавно обнаружен еще один вид паразита усача Радде – *Cerchysiella raddei* Yang (Hymenoptera: Chalcidoidea, Encyrtidae), развивающийся на взрослых личинках усача. Это общественный койнобионтный (обладающий стратегией выживания на подвижном хозяине) эндопаразит с большим количеством особей, выходящих из одной личинки *N. raddei* (в среднем 1083,8). У этого вида существенное преобладание самок над самцами (соотношение 9,67:1). Этот вид обладает хорошим потенциалом как биологический агент контроля численности популяций *N. raddei* (Zhang et al., 2005).

Опыт применения комбинированной технологии контроля в Китае. Был разработан и применен комплексный метод управления для контроля усача Радде: применение светоловушек черного света для отлова имаго; паразит *Sclerodermus pupariae* сдерживает численность личинок младших возрастов, а раскладка яиц и выпуск имаго паразита *Dastarcus helophoroides* регулирует численность личинок старших возрастов и куколок. В результате применения этих методов в течение 5 лет в дубовых лесах Северо-Восточного Китая вредитель успешно контролировался (Yang, Tang et al., 2012b).

Сравнительная оценка и выбор эффективных и безопасных фитосанитарных мер для снижения фитосанитарного риска. Наиболее эффективные меры:

Возможные меры: конкретные условия выращивания культуры.

Растения для посадки могут выращиваться в условиях полной изоляции от контакта с вредными организмами. Однако это не является распространенной практикой в питомниках лесных деревьев. Это возможно только для небольшого производства.

В теории может быть определена территория, свободная от вредных организмов, однако нет уверенности, существуют ли территории,

свободные от вредных организмов в странах естественного распространения *Neocerambyx raddei*. Для более четкого определения требований необходимы дополнительные данные о темпах распространения и о потенциальном диапазоне кормовых растений (растений-хозяев).

Для твердой уверенности в том, что места свободны от вредного организма в странах, где вредный организм уже акклиматизировался, рекомендуется выполнение следующих требований для создания и поддержания зоны, свободной от *Neocerambyx raddei*:

- минимальное расстояние как минимум 2,0 км между территорией, свободной от вредного организма, и ближайшей территорией, на которой известно о присутствии вредного организма. Это расстояние может зависеть от интенсивности мониторинга и уровня неопределенности распространения вредного организма, присутствия естественных барьеров и т.д. (Pest Risk Analysis., 2018).

- Детальные осмотры и наблюдения должны проводиться на территории в течение двух лет до установления территории, свободной от вредного организма, и продолжаться каждый год. Специальные исследования должны проводиться на территории, расположенной между свободной от усача зоной и известным местом (очагом) заражения для определения зоны, свободной от вредного организма. Исследования также должны быть нацелены на визуальное обнаружение деревьев *Quercus*, *Castanea* и *Morus* и включать использование ловушек (interception trap).

- Повышение осведомленности общественности о вредном организме является важным элементом для уточнения информации о вредном организме.

- Должны быть применены ограничения для перемещения материалов из *Quercus*, *Castanea* и *Morus* (из территорий, где известно о присутствии вредных организмов) в территории, свободные от вредных организмов и на окружающие их территории, особенно зоны между свободными территориями и ближайшими очагами заражения.

- Непосредственно перед экспортом груз растений должен проходить официальную проверку на наличие *Neocerambyx raddei*.

Данные рекомендации, возможно, нуждаются в адаптации для стран, с ограниченными очагами поражения, которые находятся под официальным регулированием на территориях, ранее свободных от вредного организма.

- Растения должны выращиваться в течение всего жизненного цикла или как минимум три года на месте производства, которое свободно от *Neocerambyx raddei*, в соответствии с международными стандартами по фитосанитарным мерам:

(I) которые регистрируются и контролируются НОКЗР в стране происхождения;

(II) которые ежегодно подвергаются, по крайней мере двум официальным тщательным проверкам на наличие любых признаков *Neocerambyx raddei*, проведенным в соответствующее время и не обнаружившим признаков присутствия организма;

(III) в тех случаях, когда растения выращиваются на объекте с полной физической защитой от интродукции *Neocerambyx raddei* и,

(IV) где непосредственно перед экспортом груз растений был подвергнут официальной тщательной проверке на наличие указанного организма, а также на деструктивную выборку образцов (Pest Risk Analysis., 2018).

Усач *Neocerambyx raddei* Blessig может относительно широко распространиться на территории России. Он представляет существенную угрозу дубовым и каштановым лесонасаждениям России. В связи с этим целесообразно включить усача Радде *Neocerambyx raddei* Blessig как в «Перечень карантинных объектов, ограниченно распространенных на территории Российской Федерации», так и в «Перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза».

Литература

1. Воронцов А.И. Лесная энтомология. М.: Высшая школа, 1982. 384 с.
2. Данилевский М.Л., Мирошников А.И. Жуки-дровосеки Кавказа (Coleoptera, Cerambycidae). Определитель. Краснодар, 1985. 417 с.
3. Лямцева И.Н. Материалы к изучению личинок усачей подсем. Cerambycinae (Coleoptera, Cerambycidae). Энтомологическое обозрение, 1978. Т. 57, вып. 2. С. 354-360.

4. МСФМ 2. Структура анализа фитосанитарного риска, 2007.
5. МСФМ 9. Руководство по программам ликвидации вредных организмов, 2004.
6. МСФМ № 11. Анализ фитосанитарного риска для карантинных вредных организмов, включая анализ риска для окружающей среды и риска, представляемого живыми модифицированными организмами, 2004.
7. МСФМ 15. Руководство по регулированию древесных упаковочных материалов в международной торговле, 2004.
8. Плавильщиков Н.Н. Жуки-дровосеки. Фауна СССР. Насекомые жесткокрылые. М.-Л., 1940. Т. XXII. Ч. 2. 785 с.
9. Региональные стандарты по фитосанитарным мерам. Стандарт ЕОКЗР РМ 5/3 (2). Руководство по анализу фитосанитарного риска: схема принятия решения для карантинных вредных организмов. ОЕПП/ЕРРО, 2007-09.
10. Стандарт ЕОКЗР РМ 8/3 Commodity-specific phytosanitary measures: *Quercus* and *Castanea*, 2010.
11. Смит И.М., Орлинский А.Д. Схема ЕОЗР для оценки фитосанитарного риска. Карантин и защита растений // 1999, № 8.
12. Черепанов А.И. Усачи Северной Азии (Cerambycinae: Hesperophanini: Callidiini). Новосибирск: Наука, 1981. 216 с.
13. Черепанов А.И. Семейство Cerambycidae – Усачи, или Дровосеки. В сб.: Определитель насекомых Дальнего Востока России (в шести томах, под общ. ред. П.А. Лера). Т. 3. Ч. 3. Владивосток: Дальнаука, 1996. 555 с.
14. Alakangas E. 2010. European standard (EN 14961) for wood chips and hog fuel, Forest Bioenergy, 2010, 31st August – 3rd September 2010, Book of proceedings. FINBIO Publication 47, 329-340. Available at www.woodheatsolutions.eu/documents/eng51.pdf.
15. CEN. 2011. Standard EN 14961-4. Solid biofuels – Fuel specifications and classes. Part 4: Wood chips for non-industrial use.
16. Chou W.I. 2008. The Atlas of Taiwanese Cerambycidae (Second Edition). Owl Publishing House, Taipei. 408 pp.
17. Danilevsky M. 2004. Annotated list of longhorn beetles (Cerambycidae) of Mongolia. <http://www.zin.ru/Animalia/coleoptera/eng/moncertx.htm>.
18. Danilevsky M.L. 2007. A check list of the longicorn beetles (Cerambycidae) of Russia, Ukraine, Moldova, Transcaucasia, Central Asia, Kazakhstan and Mongolia. 35 pp.
19. Danilevsky M.L. 2013. Additions and corrections to the new catalogue of Palearctic Cerambycidae (Coleoptera), edited by I. Löbl and A. Smetana, 2010. Part VII. International Almanac, 2 (1): 170-210.
20. EEA. 2006. European forest types. Categories and types for sustainable forest management reporting and policy. Technical report No 9/2006. European Environment Agency.
21. EPPO. 2009a. Heat treatment of wood to control insects and wood-borne nematodes. PM 10/6 (1). EPPO Bulletin, 39 (1): 31.
22. EPPO. 2009b. Disinfestation of wood with ionizing radiation. PM 10/8 (1). EPPO Bulletin, 39 (1): 34-35.
23. EPPO. 2009c. Methyl bromide fumigation of wood to control insects PM 10/7 (1) EPPO Bulletin, 39 (1): 32-33.
24. EPPO. 2012c. EPPO Technical Document No. 1061, EPPO Study on the Risk of Imports of Plants for Planting EPPO Paris. www.eppo.int/QUARANTINE/EPPO_Study_on_Plants_for_planting.pdf.
25. EPPO. 2015. *Massicus raddei* (Coleoptera: Cerambycidae – oak longhorn beetle): addition to the EPPO Alert List.
26. EPPO, 2016. PQR database. Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization. <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>.
27. FAO, 2013a. ISPM 15. Regulation of wood packaging material in international trade. International Standards for Phytosanitary Measures. International Plant Protection Convention. https://www.ippc.int/index.php?id=ispms&no_cache=1&L=0.
28. FAO. 2008. IPPC Recommendation Replacement or reduction of the use of methyl bromide as a phytosanitary measure. <https://www.ippc.int/core-activities/governance/cpm-recommendations/replacement-or-reduction-of-the-use-of-methyl-bromide-as-a-phytosanitary-measure>.
29. FAO. 2013b. Draft ISPM Minimizing Pest Movement by Sea Containers. <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/member-consultation-draft-ispms>.
30. FAO. 2008. IPPC Recommendation Replacement or reduction of the use of methyl bromide as a phytosanitary measure. <https://www.ippc.int/core-activities/governance/cpm-recommendations/replacement-or-reduction-of-the-use-of-methyl-bromide-as-a-phytosanitary-measure>.
31. Fleming M.R., Hoover K., Janowiak J.J., Fang Y., Wang X. et al. 2003. Microwave irradiation of wood packing material to destroy the Asian longhorned beetle. For. Prod. J., 53 (1): 46-52.
32. Fleming M.R., Janowiak J.J., Kimmel J.D., Halbrendt J.M., Bauer L.S., Miller D.L., Hoover K. 2005. Efficacy of commercial microwave equipment for eradication of pine wood nematodes and cerambycid larvae infesting red pine. Forest Products Journal, 55 (12): 226-232.
33. Fu C. 2010. Raspberry Pest Identification and The Disease Control in Liaoning Province. Master thesis. <http://www.dissertationtopic.net/doc/116163>.
34. Gressitt J.L. 1942. Destructive Long-Horned Beetle borers at Canton, China. Special Publication 1. Lingnan Natural History Survey and Museum, Lingnan University, Canton, China. 1-60.
35. Gressitt J.L. 1951. Longicorn Beetles of China. Longicornia, 2: 1-667.
36. Hua L.Z. 2002. List of Chinese Insects. Vol. II. Zhongshan (Sun Yat-sen) University Press, Guangzhou. 612 pp.
37. Hua L.Z., Nara H., Samuelson G.A., Lingafelter S.W. 2009. Iconography of Chinese Longicorn Beetles (1406 Species) in Color. Sun Yat-sen University Press, Guangzhou. 474 pp.
38. Hua L.Z., Nara H., Yu C. 1993. Longicorn-Beetles of Hainan & Guangdong. Muh-Sheng Museum of Entomology Publisher, Nantou Hsien, Taiwan: 319 pp.
39. Lee S.M. 1982. Longicorn Beetles of Korea (Coleoptera: Cerambycidae). Insecta Koreana, 1: 1-85.
40. Lei C. & Zhou Z. 1998. Insects records of Hubei, China-Hubei Science and Technology Publishing House, Wuhan, China. 650 pp.
41. Li L. 2009. Longhorn beetles of Yunnan. 223 pp.
42. Liu Q., Wang Y., & Zhou J. 1999. Biology of RNL's boring trunk and expelling frass. Journal of China agricultural University, 4 (5): 87-91 (abstract).
43. Löbl I. & Smetana A. 2010. Catalogue of Palearctic Coleoptera, 6 Chrysomeloidea. Appolo Books, Stenstrup. 924 pp.

44. Massaro F. & Passari M. 2012. Misure fitosanitarie regionali per la lotta al Cerambycide *Neocerambyx raddei* in Campania ai sensi del decreto legislativo 19 agosto 2005, n. 214 e sue modifiche. Giunta Regionale della Campania: Decreto Dirigenziale. http://www.agricoltura.regione.campania.it/difesa/files/DRD_426-14-11-12.pdf.
45. Matsushita M. 1933. Beitrag zur Kenntnis der Cerambyciden des Japanischen Reich. Journal of the Faculty of Agriculture. Hokkaido imperial University, 34 (2): 157-445.
46. McCullough D.G., Poland T.M., Cappaert D., Clark E.L., Fraser I., Mastro V., Smith S. & Pell C. 2007. Effects of chipping, grinding, and heat on survival of emerald ash borer, *Agilus planipennis* (Coleoptera, Buprestidae), in chips. Journal of Economic Entomology, 100 (4): 1304-1315.
47. New M., Lister D., Hulme M., Makin I. 2002. A high-resolution data set of surface climate over global land areas. Climate Research, 21.
48. Okamoto H. 1927. The Longicorn Beetles from Corea. Insecta Matsumurana, 2 (2): 62-86.
49. Pest Risk Analysis for *Aromia bungii* EPPO. 2014. Paris. Available at http://www.eppo.int/QUARANTINE/Pest_Risk_Analysis/PRA_intro.htm.
50. Pest Risk Analysis for *Massicus raddei* (Coleoptera: Cerambycidae), oak longhorn beetle. EPPO, September 2018. Available at <https://gd.eppo.int/taxon/MALLRA/documents>.
51. Plavilstshikov N.N. 1934. Bestimmungs-Tabellen der europäischen Coleopteren. 112. Cerambycidae 3. Cerambycinae: Cerambycini 3 (Callichromina, Rosaliina, Callidiina). Verlag: Edmund Reitter, Troppau: 230 pp.
52. Qi C. 1999. Longicorn Beetles fauna of Shandong province, China. 112 pp.
53. SEAP (Shandong Ecological Afforestation Project), 2009. Integrated pest management plan. Shandong Academy of Environmental Science, E2221, Vol. 2: 40 pp.
54. Smith M.T., Tobin P.C., Bancroft J., Li G. & Gao R. 2004. Dispersal and spatiotemporal dynamics of Asian Longhorned Beetle (Coleoptera: Cerambycidae) in China. Environmental Entomology, 33 (2): 435-442.
55. Sun J.L., Sun G.J., Dong X.N., Gao Z.Q., Tang Y.L., Jiang J., Yang Z.Q. 2010. Studies on biological characteristics and biocontrol techniques for *Massicus raddei*. Liaoning Forestry Science and Technology, 2010 (4), 5-7.
56. Sun Y.P. (ed.), 2001. Control techniques of the oak longhorn beetle. Liaoning Sci. & Tech. Press, Shengyang. P. 1-84.
57. Tang Y.L., Wang X.Y., Yang Z.Q., Jiang J., Wang X.H., Lü J. 2012a. Alternative hosts of *Sclerodermus pupariae* (Hymenoptera: Bethyilidae), a larval parasitoid of the longhorn beetle *Massicus raddei* (Coleoptera: Cerambycidae). Acta Entomologica Sinica, 55 (1), 55-62.
58. Tang Y.L., Yang Z.Q., Jiang J., Wang X.Y., Gao C. 2011. Distribution pattern of larvae and pupae of *Massicus raddei* in the trunk of *Quercus liaotungensis*. Scientia Silvae Sinicae, 47 (3), 117-123 (abst.).
59. Tang Y.L., Yang Z.Q., Wang X.Y., Tang H., Jiang J., Wei K., Lü J. 2012b. Biocontrol of oak longhorn beetle, *Massicus raddei* by releasing parasitoid *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothrididae) adults and eggs. Scientia Silvae Sinicae, 48 (7), 186-191.
60. Tian J., Wang X.Y., Yang Z.Q., Ma L., Lang J., Zeng F.X., He G.P. 2009. Effects of temperature on development and reproduction of parasitic wasp *Spathius agrili* Yang (Hymenoptera: Braconidae), an effective parasitoid of emerald ash borer. Acta Entomologica Sinica, 52 (11), 1223-1228.
61. Van der Gaag D.J., Ciampitti M., Cavagna B., Maspero M., Hérard F. 2008. Pest Risk Analysis for *Anoplophora chinensis*. Plant Protection Service, Wageningen (NL).
62. VKM, 2013. Import of deciduous wood chips from eastern North America – pathway-initiated risk characterizations of relevant plant pests. <http://www.english.vkm.no/dav/68ef0595b3.pdf>.
63. Wang X.D., Huang H.H., Xu Z.F., Yang Z.Q., Fan J.X., Chen J.J., Qian M.H. 2004. Primary study on the bionomics of *Dastarcus helophoroides* (Fairmaire). Natural Enemies of Insects, 26 (2), 60-65.
64. Wang X.Y., Yang Z.Q., Tang Y.L., Jiang J., Gao C., Liu Y.C. 2010b. Parasitism of *Sclerodermus pupariae* (Hymenoptera: Bethyilidae) on the young larvae of *Massicus raddei* (Coleoptera: Cerambycidae). Acta Entomologica Sinica, 53 (6), 675-682.
65. Wang X.Y., Yang Z.Q., Tang Y.L., Jiang J., Yang Y.L., Gao C. 2012. Determination of larval instar number and duration in the oak longhorn beetle, *Massicus raddei* (Coleoptera: Cerambycidae). Acta Entomologica Sinica, 55 (5), 575-584.
66. Wang Y.H., Lai Y.X., Cen D.H., Wang J.Y., Yang Z.Q. 2012a. Behavior and numbers of *Dastarcus helophoroides* beetle's laying egg and its first-instar larvae parasitism on larvae of *Monochamus alternatus*. Journal of Environmental Entomology, 33 (4), 517-522.
67. Wei J.R., Yang Z.Q., Du J.W. 2008a. R-(+)-limonene, kairomone for *Dastarcus helophoroides*, a natural enemy of longhorned beetles. Agricultural and Forest Entomology, 10, 323-330.
68. Wei J.R., Yang Z.Q., Tang H., Ma J.H., Du J.W. 2008b. Behavior of a cerambycid parasitoid beetle (*Dastarcus helophoroides*). Scientia Silvae Sinicae, 44 (7), 50-55.
69. Wei J.R., Yang Z.Q., Poland T.M., Du J.W. 2009a. Parasitism and olfactory responses of *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothrididae) to different Cerambycid hosts. Biological Control, 51, 733-742.
70. Wei J.R., Yang Z.Q., Wang P.Y., Sun X.G., Sun L.G. 2009b. Control of *Massicus raddei* (Blessig) (Coleoptera: Cerambycidae) by parasitic beetle *Dastarcus helophoroides* Sharp (Coleoptera: Bothrididae). Chinese Journal of Biological Control, 26 (3), 285-287.
71. Yang Z.Q. 2004. Advance in biocontrol of researches of the important forest insect pests with natural enemies in China. Chinese Journal of Biological Control, 20 (4), 221-228.
72. Yang Z.Q. 2007. Recent advance in the biological control of forest invasive pests in China. In: Proceedings of the International Symposium on Plant Quarantine and Exotic Pest Management. P. 109-134.
73. Yang Z.Q., Wei J.R., You L.S. 2002. Two new braconid species parasitizing larva of all webworm from China (Hymenoptera, Braconidae). Acta Zootaxonomica Sinica, 27 (3), 608-615.
74. Yang Z.Q., Wei J.R., 2003a. Two new species of howardi-species group in the genus *Tetrastichus* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing fall webworm from China. Scientia Silvae Sinicae, 39 (5), 67-73.
75. Yang Z.Q., Wang C.Z., Liu Y.M. 2003b. A new species in the genus *Aprostocetus* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing pupa of fall webworm from Yantai, Shandong Province, China. Scientia Silvae Sinicae, 39 (6), 87-90.
76. Yang Z.Q., Tang H., 2011. Blacklight lamp filtration in attracting long horned beetles and its application in forest. In: Lei Chao-Liang, Wu Kong-Ming, Zhao Shu-Ying (Eds.), Pests Physical Monitoring and Control Technology

Research in China. Hubei Science and Technology Press, Wuhan. P. 15-17.

77. Yang Z.Q., Wang X.Y., Wang B., Yu Y.P., Dong Z.M., Mou Z.H., Wang H.S. 2011. Relationship between adult emergence of *Massicus raddei* (Coleoptera: Cerambycidae) and temperature and relative humidity. *Acta Ecologia Sinica*, 31 (24), 7486-7491.

78. Yang Z.Q., Li M.L., Lei Q., Wang X.Y. 2012a. Effects of temperature on development and reproduction of *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothrididae). *Chinese Journal of Biological Control*, 28 (1), 9-14.

79. Yang Z.Q., Tang Y.L., Jiang J., Wang X.Y., Tang H., Lü J., Gao Y. 2012b. Study on alternative hosts of *Dastarcus helophoroides*, a parasitoid of *Massicus*

raddei / *Biological Control*, 68 (2014) 117-128.

80. Yang Z.Q. et al. 2012. Population-keeping mechanism of the parasitoid *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothrididae) of *Massicus raddei* (Coleoptera: Cerambycidae) in oak forest. *Acta Ecologia Sinica*, 32 (24), 7764-7773.

81. Yang Z.Q., Tang H., Wang X.Y., Wei J.R., Zhao H.B. 2013a. A new species of *Cerchysiella* (Hymenoptera: Encyrtidae) parasitic in larva of chestnut trunk borer (Coleoptera: Cerambycidae) from China with notes on its biology. *Journal of Natural History*, 47 (3-4), 129-138.

82. Yang Z.Q., Wang X.Y., Cao L.M., Tang Y.L., Tang H. 2013b. *Cerchysiella mesosae*, a new species of Encyrtidae (Hymenoptera) parasitizing in

larva of *Mesosa myops* (Coleoptera: Cerambycidae) from China. *Zootaxa*, 3619 (2), 154-160.

83. Yu J., Sun J. & Mei Z. 2005. Diseases and pests of the main economic plants in sample area of Huajiang valley and their control. *Guizhou Forestry Science and Technology*, 33 (1): 34-36.

84. Zhang Y.Z., Huang D.W., Zhao T.H., Liu H.P., Bauer L.S. 2005. Two new species of egg parasitoids (Hymenoptera: Encyrtidae) of wood-boring beetle pests from China. *Phytoparasitica*, 33 (3), 253-260.

85. Zhong-Qi Yang, Xiao-Yi Wang, Yi-Nan Zhang, 2014. Recent advances in biological control of important native and invasive forest pests in China *Biological Control* 68, 117-128.

UDC 595.768.11

CHESTNUT TRUNK BORER *NEOCERAMBYX RADDEI* BLESSIG – a Threat to the Oak Forests of the European Part of Russia

A. V. Shamaev, Senior Researcher of Forest Quarantine Department of FGBU “VNIKR”

Abstract. The article is focused on the morphology and biological characteristics of the chestnut trunk borer *Neocerambyx raddei* (Coleoptera, Cerambycidae), a Far Eastern oak pest. The analysis of its harmfulness and forecast of consequences in case of penetration of this xylophage into the territory of the European part of the Russian Federation are described.

Keywords. Sawyers, damage, probability of penetration, establishment, potential assessment of harmfulness, Unified List of Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union.

Introduction

Neocerambyx raddei Blessig is a Far Eastern pest. The beetle is oligophagus and is one of the most important pests of oak and sweet chestnut. *N. raddei* chooses trees that are weakened as a result of some unfavourable factors.

This species originates from China. It is now also found in most parts of Korea and Japan, and its habitat is expanding.

In addition to the enormous physiological damage, the chestnut trunk borer causes great technical damage. Trees infested by this beetle do not produce more than 10% of industrial wood. As a result of *Neocerambyx raddei* infestation, the plant is invaded with secondary pests – bark borers and other species of sawyers. Thus, the outbreak of the infection spreads.

Its main impact on the environment can be seen in cities with warm climates, where large deciduous trees have a special aesthetic value (Tang, Yang et al., 2011).

The entire potential establishment area is subject to the risk of economic damage. *Neocerambyx raddei* is likely to damage forest plantations that contain oak or sweet chestnut species, especially in countries around the Mediterranean and Black Sea.

Morphological description. Imago. It differs well from other species of the Cerambycinae subfamily by its large body size, elongated smooth elytra and transversally-wrinkled pronotum. Head

is narrower than pronotum, slightly elongated, with hairs that are tight against it and face forward. The genae are smaller in length than in width, the frons at the base of the antennae is convex, with a narrow stria in the middle extending to the vertex, the occiput in small dense spots. Eyes large, broadly and very deeply emarginate, upper lobes small, more than 2 times smaller than lower lobes. Antennae are considerably longer (♂) or slightly shorter (♀) than the body, and their 3rd segment is twice as long as the 1st segment, barely shorter than the 4th and 5th segments combined.

Pronotum is strongly narrowed in the anterior half, slightly narrowed in the posterior half, with a clear constriction near the anterior margin, with a transverse stria at the base, in transverse deep wrinkles, in a densely adjoining grayish-yellow hair, directed forwards in the posterior half, and backwards in the anterior half, in standing sparse setae on the sides. The scutellum is flat, narrowly rounded at the top, with small adjoining hairs.

Elytra long and smooth, parallel sided (♀) or slightly narrowed to the apex, narrowly rounded at the apex, on the inner stria margin with a pulled sharp spine, in small dense adjoining grayish-yellow hairs. The fifth sternite of abdomen on top is narrowly emarginate (♂) or broadly rounded (♀). Legs are relatively long, hips parallel sided, flat. The tarsi are shorter than the tibiae. Body, antennae, elytrae and legs are brownish with a reddish hue. Body length 35-52 mm (Fig. 1) (Cherepanov, 1981).

Larvae. The older instar is characterized by a large body, presence of ambulatory ampullae on I-VII segments of the abdomen, weak development of thoracic legs. The body is white. Body length of larvae of older instar is up to 65 mm. Head on the front edge of dark brown, almost black, with a reddish hue. The mandibles are black. The head is considerably retracted into the pronotum, almost half as big as the prothorax, with a head width of up to 8 mm. The prothorax is noticeably wider than the mesothorax. The pronotum is sloping to the head, with short setae-like hairs in the anterior half and on the sides. The pronotum shield is convex, with a longitudinal straight stria on the sides, with thin longitudinal wrinkles, sometimes with thin, sparse hairs on the sides near the rear corners. Pronotum of larvae of younger instar has densely thin setae-like hairs and the larvae of older instar has sparsely thick setae-like hair emarginated with a sclerotized reddish ring at the base. The pronotum is slightly convex, leather-like, broadly rounded at the top, with sparse setae-like hairs on the sides. The base of prosternum (basisternum) is leather-like, stretched and with thin wrinkles. Thoracic legs are short, underdeveloped, with a short spiky claw.

Abdomen is thick, slightly narrowed to the apex, with, short, thin, sparse hairs on the sides. Dorsal ambulatory ampullae are weakly convex, leather-like, with more or less pronounced wrinkles (sometimes forming a reticulate granularity, especially in older larvae), separated by a longitudinal general stria and two transversal striae, which merge on the sides with lateral longitudinal striae going backwards. Ventral ambulatory ampullae of young larvae are weakly wrinkled, while those of older larvae are clearly granular, separated by a transverse stria connected to the lateral longitudinal stria, which has a form of deep dent in older larvae and wrinkles emanating from it (Fig. 4) (Cherepanov, 1981).

Geographical distribution. *Neocerambyx raddei* Blessig is widespread in deciduous forests of Asia (Fig. 2).

Asia: China (Anhui, Fujian, Guizhou, Hebei, Heilongjiang, Hubei, Hunan, Jiangsu, Jiangxi, Jilin, Liaoning, Jiangxi, Shandong, Shanxi, Sichuan, Yunnan, Guangxi, Zhejiang), Japan (Honshu, Shikoku), Democratic People's Republic of Korea, Republic of Korea, Taiwan, Vietnam (EPPO, 2015, 2016).

Russian Federation (Far East: Primorsky Krai, Khabarovsk Krai, Amur Oblast, Jewish Autonomous Oblast).

Biological characteristics. It develops mainly on oak (*Quercus* spp.) and chestnut (*Castanea* spp.). The following list of host plants is known from the literature: *Castanea crenata*, *C. mollissima*, *Castanea sativa*, *Quercus acuta*, *Q. acutissima*, *Q. aliena*, *Q. dentata*, *Q. liaotungensis*, *Q. mongolica*, *Q. serrata*, *Q. variabilis*. *Castanopsis cuspidata*, *Castanopsis cuspidata* var. *sieboldii*, *Morus* sp. and *Paulownia* sp. are also mentioned as hosts (development on the last two tree species is noted but not explicitly confirmed by recent observations) (Cherepanov, 1981; Pest Risk Analysis..., 2018; Tang, Yang at al., 2011).

The longhorn beetle in Primorsky Krai is common in broad-leaved forests. Beetles start to fly in the Primorsky Krai in late July and August. In the southern parts of the habitat, Guangxi province, China, according to the author's observations, the flight starts in the second half of June. Beetles fly to light sources at night. They inhabit the trunks of depressed oak trees up to 52 cm in diameter mainly (Cherepanov, 1981; Tang, Yang at al., 2012a). Branches and trunks less than 9 cm in diameter (and with a bark thickness of < 0.5 cm) are not inhabited by the beetle, thus young trees are not attractive for beetles (Cherepanov, 1981; Pest Risk Analysis..., 2018; Tang, Yang at al., 2011). Larvae live first under the bark, then in the wood, making longitudinal galleries (Fig. 3). The larvae develop through six larval instars. The larval stage lasts more than 1020 days. In the first year, larvae overwinter at the 2nd and 3rd larval instars, in the second-year larvae of the 4th and 5th instar, and in the third winter – all larvae at the 6th instar (adult larvae). 3-year generation leads to mass emergence of adults every 3 years. Larvae live and damage oak trunks, usually at a height below 4 m, and pupation occurs in the lower part (1-4 m) of the trunk. The number of larvae directly depends on the

bark thickness and trunk diameter (Fu, 2010; Tang, Wang at al., 2012a). Larvae of the latter instar make a pupal chamber longitudinal to the trunk (Cherepanov, 1981; Tang, Yang at al., 2011). Pupae emerge at the end of June and July (in the Primorsky Krai of the Russian Federation). Young beetles emerge mainly in July and August. The borer inhabitation causes death of weakened trees (Sun at al., 2010; Sun, 2001; Tang, Yang at al., 2012b). Studies in China have shown that adults of the chestnut trunk borer can feed on juice from lesions they inflict to oak trunks themselves.

The development cycle of the chestnut trunk borer lasts 3 years. In the Chinese provinces of Liaoning, Jilin, and Inner Mongolia, the peak of adult appearance occurs from July 20 to August 10. Adult emergence showed a positive correlation with temperature, but a negative correlation with relative humidity in oak stands (Fu, 2010; Pest Risk Analysis..., 2018; Sun, 2001; Sun at al., 2010).

Pathways and transmission methods

Natural pathways of *Neocerambyx raddei* in the world. Adults of *Neocerambyx raddei*, although capable of flight, are characterized by relatively low migration. According to the literature, beetles fly little and unwillingly, spending most of their time on the tree where they developed. Adults can fly 160 meters on average, but the maximum flight distance can reach 950 meters (Pest Risk Analysis..., 2018; Sun, 2001). Therefore, the spread of this pest due to natural migration is not advisable to consider as a significant factor for the expansion of its range. It is much more likely that *Neocerambyx raddei* with fragments of large trees will be imported to new regions where the pest did not previously exist: this can be facilitated by the transportation of wood of different quality and purpose (round wood with bark and debarked wood, sawn timber, wood packaging materials, wood chips, etc.) (ISPM 9, 2004; ISPM 15, 2004; EPPO Standard PM 8/3, 2010; Pest Risk Analysis..., 2018; Sun, 2001; VKM, 2013).

Distribution of *Neocerambyx raddei* with plant products in international trade. The most likely and fastest way of spread of the chestwood trunk borer – transportation of larvae, pupae, and adults in various timber products in trade, in particular:

- a) timber,
- b) wood packaging,

- c) wood waste,
- d) unprocessed wood products,
- e) large planting material (more than 9 cm in diameter), which is the host of the borer,
- f) other consignments (without host plants).

Particular attention should be paid to the possibility of introducing a pest with wooden containers and pallets (EPPO, 2015; Massaro & Passari, 2012; Pest Risk Analysis., 2018).

Timber, packaging and wood waste. The main pathway of the pest is to transportation of timber, contaminated containers or other wood packaging materials from one country to another. These can be logs, firewood, various lumber, pallets, and wooden packaging.

Wood packaging materials that have not been treated thermally or chemically (in accordance with ISPM 15) are the most likely pathway for the introduction of quarantine insects. International trade involves the movement of large quantities of goods in wooden packaging. For example, based on an analysis of the number of shipping containers carrying goods from China to the EU, it is estimated that about 4 million shipping containers with hardwood packaging material arrive from China each year (Pest Risk Analysis., 2014; Pest Risk Analysis., 2018).

Wood waste and firewood may be more likely to contain pests than round wood or lumber because they are generally of lower quality. However, the survival of larvae in wood waste depends on the size of the pieces of wood and whether they have been treated (e.g. wood waste can be agglomerated into briquettes or similar forms and agglomeration damages the pest) (Alakangas, 2010; CEN, 2011; EPPO, 2015; Pest Risk Analysis., 2018; Sun et al., 2010).

Sawdust is not a pathway for *Neocerambyx raddei* because the pest cannot survive in the commodity (Pest Risk Analysis., 2014; Pest Risk Analysis., 2018).

The intended use of imported wood waste is unknown. If it is used for energy production (incineration), the probability of transfer is very low. It may be higher if wood waste is stored outdoors for at least a few weeks in suitable conditions for pest emergence in close proximity to host plants (VKM, 2013).

Wood chips (chips) and wood pulp. Batches of wood chips are often a mixture of different species of wood. They may contain a limited number of host plant species, which reduces the likeli-

hood of their introduction by spreading (Alakangas, 2010).

The production process of wood chips, i.e. shredding and chipping, usually excludes the possibility of the development of insect xylophages (e.g. *A. glabripennis* (Alakangas, 2010)). However, experiments on another xylophage, *Agrius planipennis*, McCullough et al., 2007, show that a small percentage of larvae may survive the chipping process when the sieve on shredders or grinders is more than 2.5 cm in size. Late instar larvae of *Neocerambyx raddei* are 38-65 mm long, pupae 26-52 mm long, and adults 25-52 mm long (Cherepanov, 1981; Tang, Yang et al., 2011). Only late stages of larvae development, pupae and adults may complete their development if they survive the shredding process. Larvae are unlikely to continue their development in the early stages. Eggs of *Neocerambyx raddei* are laid on living trees and will not be laid on wood chips after processing.

The European standard for solid fuels identifies four classes of wood chips according to particle size (i.e. passing through sieves with round holes of the specified size); in the largest class, at least 75% of wood chips should be 8-45 mm, a maximum of 6% should be more than 63 mm (but less than 120 mm).

Temperatures can be fatal (as a result of composting) during storage and transport inside the trunk core, and many organisms will not survive. However, some organisms may survive, especially in peripheral areas where temperatures are lower (EPPO PM 5/3, 2007; Van der Gaag et al., 2008; Yang et al., 2011). Introduction will be most likely if wood chips are shipped shortly after production and stored outdoors (i.e. giving the time to complete pest development), or used for mulching.

Chips smaller than 2.5 cm in size in each dimension cannot be a pathway for the chestnut trunk borer. Larger chips that have been thermally or chemically treated cannot contain this borer at any stage of development.

Woodprocessing waste in the form of shavings cannot be a pathway for the chestnut trunk borer and other wood pests.

Host plants for planting (except for seedlings and seeds) from where *Neocerambyx raddei* occurs. Eggs may be present in the bark, larvae and pupae – in trunks or branches (Gressitt, 1942). This pathway also includes roots.

The risk of introduction by this pathway can be only through large-size host seedlings with a diameter of 9 cm

or more (Massaro & Passari, 2012; Pest Risk Analysis., 2014; Pest Risk Analysis., 2018; Tang, Yang et al., 2011).

Cut branches. Cut branches can be imported for decorative purposes. Cut branches may contain eggs and larvae. However, cut branches are usually too small for larvae to complete their development (the thickness of the branch should be at least 9 cm). Therefore, the risk of transmission to the host plant, where the pest could complete its life cycle, is very unlikely (EPPO, 2015). There is no evidence that *Quercus* or other host plant species are being used for this purpose.

Information on the spread of *Neocerambyx raddei* by other pathways (not by means of host plants)

With other products (hitchhiking). Pests can potentially be present in any import or movement of imported goods, but the risk will be limited to the number of adults and the presence of more than one adult in the lot is unlikely. There is a high risk of introduction at ports and other points of entry due to the possible storage of large quantities of imported goods, which increases the likelihood of several adults being present at the same time and mating. The risk is also increased by the fact that adults are attracted to light sources.

Adults may be present in stored goods prior to export. The presence of infested trees in the vicinity of warehouses and terminals will facilitate further infestation. Pests are encountered during flight of adults. This period is very long and varies from country to country depending on their geography.

Imago *Neocerambyx raddei* can contact with the goods for export from May to September with maximum risk from mid-May to September.

Bark of host plants. Only eggs can be connected with the bark because they are laid its cracks (Pest Risk Analysis., 2018; Tang, Yang et al., 2011). However, the pest will not be able to complete its development in an isolated bark, and therefore will not be able to switch to a suitable host.

Fruit, host plant seeds, soil. Non-imaginal *Neocerambyx raddei* stages do not occur on (inside) these parts of the host plant or in the soil, and therefore are unlikely to be able to be introduced with these products.

Furniture and objects made of wood from host plants.

Larvae and pupae may be present in furniture and other objects, particularly wooden parts that are not visible from

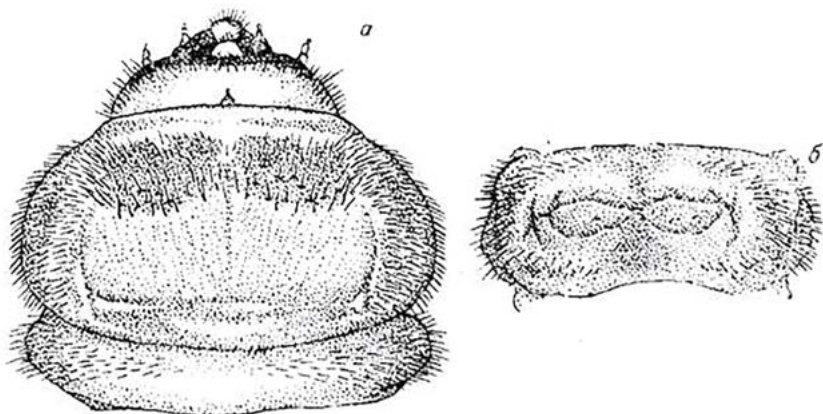


Fig. 4. *Neocerambyx raddei* larva: a – head and pronotum; б – IV dorsal plate with a dorsal ambulatory ampulla (A.I. Cherepanov, Borers of North Asia, 1981)

Рис. 4. Личинка *Neocerambyx raddei*: а – голова и переднеспинка; б – IV тергит брюшка с дорсальной двигательной мозолью (А.И. Черепанов, Усачи Северной Азии, 1981)

the outside (e.g. bed frames). Treatment (e.g. sawing) can destroy some but not all of them, and larvae and pupae are more likely to complete their development and appear in later stages of life. Furniture is reported to contain such pests as *Mono-chamus* spp. (Pest Risk Analysis..., 2014), and *Semanotus* spp. (EPPO PM 8/3, 2010; FAO, 2013a; Löbl & Smetana, 2010).

Warehouses that store large quantities of furniture over a long period of time are more likely to have several mating adults than those where wood material is shipped to the end user within a short period of time.

Transferring with items and furniture for street use is more likely than with items and furniture for indoor use (SEAP, 2009; Sun, 2001). However, *Quercus* wood is not suitable for outdoor use unless it is dried and/or treated against possible wood rot diseases and pests with appropriate fungicides/insecticides.

Movement of single specimens, delivery of live beetles, such as those sold and exchanged by collectors. Longhorn beetles are popular among bug collectors; *Neocerambyx raddei* adult can be exchanged by enthusiastic entomologists, but they are likely to be sold as dried specimens.

Harmfulness

According to the literature, the crown of infected trees dies back. It has been noted that during the last two decades, *Neocerambyx raddei* outbreaks have been recorded in Northeast China (particularly in Jilin, Inner Mongolia (Neimenggu, Liaoning) on *Quercus mongolicus* and *Q. liaotungensis*, which caused environmental and economic damage. In these infested oak forests, 45% of the trees were inhabited by the borer (Fu, 2010; FAO, 2013a; Smith et al., 2004; Wang, Yang et al., 2010b).

More viable oak trees in better growth conditions tend to resist larval activity by pouring juice into the larvae, and damaged areas are infested with a callus roll to form trunk thickening. This species prefers to attack mature and over-mature trees, and even if they survive, the borer infestation results in significant growth delay, falling leaves, reduced growth energy and reduced wood merchantability (due to densely spaced, extended galleries made by larvae deep in the wood).

The damage to sweet chestnut trees can be particularly significant, as the beetle prefers to attack weakened trees, and in the Northwest Caucasus of the Russian Federation chestnut trees are now severely weakened by the chestnut blight caused by the fungal pathogen *Cryphonectria parasitica* (Murrill) Barr (EPPO, 2016). In addition, the potential competitors to the chestnut trunk borer, borers of *Cerambyx* genus, do not damage the chestnut trees with oak being their favourite host plant. When the chestnut trunk borer is established in the sweet chestnut growing areas, it can cause 100% death of chestnut trees.

The borer damages the trunks of oak trees, especially those of *Quercus liaotungensis* and *Q. mongolicus*, and causes significant damage in natural oak forests. About 264,000 ha, or 40% of the oak stand, have been infected with this pest in Liaoning, China. The population density is generally high, averaging 6.5 individual egg-laying eggs, with a maximum of 156 eggs per tree (Fu, 2010; Pest Risk Analysis..., 2018; Tang, Yang et al., 2011).

The pest attacks mainly oaks on ridges, upper slopes and sunny mountain slopes (Tang, Yang et al., 2011).

Detection methods

Monitoring. Plants can be inspected visually for signs of a pest: exit wounds

or the presence of *Neocerambyx raddei* larvae (Pest Risk Analysis..., 2018; Tang, Yang et al., 2011) (Fig. 4). Damaged tree trunks usually produce juice that adult beetles feed on. Regular observations are necessary to detect infestation at an early stage. Adults are large beetles (2.5-5.2 cm), which makes them easy to detect. It is well known that borers can be easily attracted by nutrient fluids, but these techniques are effective against xylophages that feed on dead or rotten wood and are less effective or absolutely ineffective for other species, especially those that affect living trees, such as *Neocerambyx raddei*. In fact, such a trap is most effective when the relative humidity is low, because adults are looking for water. This method is not yet reliable or effective in confirming detection.

Using light traps. In China, “attract and destroy” traps (equipped with UV lamps) are sold to growers (Bodisun brand), but their effectiveness has not yet been documented for *Neocerambyx raddei*.

Based on the study of the phototaxis of adults of the chestnut trunk borer, it has been found that special black light attracts adult beetles (Yang, Tang, 2011). Ten different sources of ultraviolet light with wavelengths of about 300 nm were tested, both indoors and outdoors. The results were fantastic: one light source attracted a maximum of 20 kg of borers (430 adult beetles weighing on average 1 kg) per night during adult activity. In 2008, in the province of Girin, a special black light trap attracted and destroyed 24.16 tonnes of Radde's adult mustache and 14.95 tonnes was destroyed in 2011. Female beetles from were opened up at their peak early in life and contained about 30 eggs, almost as many as virgin females. These results indicate that the captured females did not even have time to lay eggs before being attracted to the light. Thus, most of the pest population was eliminated before breeding. In the province of Jilin, pest densities in the forest area were reduced by about 90% when black light traps were used (Yang, Tang, 2011).

Likelihood of *Neocerambyx raddei* introduction and establishment in the European part of Russia

The northern border of the active spread of *Neocerambyx raddei* passes through approximately 52°N. In Russia, this latitude corresponds to the southern part of Khabarovsk Krai and Amur Oblast. For the European part of the Russian Federation in the north it is the Kursk, Voronezh, Saratov and Orenburg

regions, and in the south – the Crimea, the Caucasus and the Black Sea coast.

Relatively favorable zones for the spread and occurrence of pest harmfulness are the areas located to the south of the Rostov region latitude. These are the following regions:

Krasnodar Krai, Stavropol Krai, Republic of Crimea, Rostov Oblast, Astrakhan Oblast, Republic of Kalmykia, Republic of Dagestan, Republic of Karachay-Cherkessia, Republic of Kabardino-Balkaria, North Ossetia – Alania, Chechen Republic, Republic of Ingushetia.

The closest type of climate listed above is in Krasnodar Krai, Republic of Crimea.

Control measures *Neocerambyx raddei* Blessig

The control methods used include phytosanitary measures such as quarantine monitoring in nurseries, burning of contaminated plant material, and cutting and burning of contaminated trees. Trees can also be treated with chemical and biological insecticides.

Methods for possible control of *Neocerambyx raddei* in Russia. The main control methods in areas where *Neocerambyx raddei* does not exist include quarantine activities.

The purpose of these measures is to prevent the import of *Neocerambyx raddei* from outside to another territory. Quarantine measures imply restriction of timber import from the areas of *Neocerambyx raddei* distribution. These countries are: China, Korea, Japan, Vietnam. It is also necessary to carefully inspect consignments arriving from the Far Eastern region of the Russian Federation, especially all kinds of oak wood, including oak packing. Wood imported from these regions must be treated by methods that ensure complete pest elimination. Phytosanitary measures are described in sufficient detail in EPPO PM 8/3 and other standards (ISPM 9, 2004; ISPM 11, 2004; ISPM 15, 2004; EPPO Standard PM 8/3, 2010; Alakangas, 2010; CEN, 2011; FAO, 2013a).

Chemical regulation. The following methods are known to be used: pesticide application on tree trunks (as paint) to regulate larvae, injection of pesticides into exit holes or blocking of exit holes with fabric (impregnated with pesticides) to kill larvae and adults, and fumigation of contaminated trees with specific pesticides. Some insecticides are used in China (SEAP, 2009; Sun, 2001).

Recommended chemicals (from the list of pesticides and agrochemicals permitted for use in the Russian Federation, 2019):

- to regulate larvae that are already in wood: dimethoate, malathion, deltamethrin, phenitrothion and imidacloprid,
- for the regulation of eggs: phenitrothion, deltamethrin, fipronil and cypermethrin.

Many of the above active ingredients have restrictions on their use (e.g. they cannot be used during flowering period or they cannot be used for a relatively long period of time before harvest). Spraying insecticides is only used against adults, but is only effective in cases of contact or ingestion. Current insecticides such as pyrethroids (e.g. deltamethrin, cypermethrin) may be somewhat effective against leaf-eating pests (tortricidae, aphids, etc.), but they will not provide protection for the entire flight period of *Neocerambyx raddei*.

Systemic insecticides, such as imidacloprid, can be used on ornamental trees by injection or by soil treatment, but due to their high cost, they cannot be used in forest habitats. This treatment is not cost effective, especially in large areas. Experience with trunk injection with systemic insecticides to regulate the *Anoplophora* species has been studied, but the injection does not fully regulate the pest (Van der Gaag et al., 2008), and may lead to some undesirable side effects (Yu, Sun, & Mei, 2005). Although it may be appropriate to apply this method to some valuable single trees.

Some insecticides currently used in gardens may be effective against *Neocerambyx raddei*, but they do not provide protection throughout the entire duration of the adult pest flight (SEAP, 2009).

In order to slow down the development of resistance to insecticides, subsequent generations of pests should not be treated with active ingredients from the same group according to their action.

Biological control method. Parasitoid *Sclerodermus pupariae* Yang et Yao (Hymenoptera: Bethylinidae), was released to control young larvae of the beetle (Tang et al., 2012a; Wang et al., 2010b; Zhong-Qi Yang, 2014). Parasitism was studied on *Neocerambyx raddei* larvae of 1 and 2 instars under laboratory conditions. The results showed that a large number of young beetle larvae die as a result of parasitoid nutrition, and that the availability of additional parasitoid nutrition increases significantly with increasing host larval density. Field trials revealed that the parasitoid preferred to feed on pest larvae

from 1 to 3 instars; older hosts were not affected. The parasitism rate reached 65.6% (Wang, Yang et al., 2010b).

In order to support the number of parasites in biocoenoses, research was carried out to find alternative hosts for the parasite. *Moechotypa diphyis*, *Mesosa myops* (Coleoptera: Cerambycidae) and *Lamprodila virgata* (Coleoptera: Buprestidae) were identified as possible alternative hosts in oak trees. Observations in the forests have shown that these species can support the development of parasites at a time when the larvae of the main host (*N. raddei*) become older than 3 years of age and therefore unsuitable for the development of the parasite. The above xylophagous beetles are quite capable of maintaining effective parasite population (Tang, Wang et al., 2012a; Wang, Yang et al., 2010b; Zhong-Qi Yang et al., 2014).

Parasite *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothrididae) (an organism specializing in *N. raddei*) can control borer populations at the larval and pupal stages. This parasite has been found in the larval galleries of the chestnut trunk borer in the Meihokou forest, Changbaishan Mountains, in the Chinese province of Jilin. Its biology, behaviour, host search, temperature dependence were studied, and a technique for mass breeding and releasing the parasite for biological control was developed (Tang, Yang et al., 2012b; Wang et al., 2004; Wang et al., 2012a; Wei et al., 2008a; Wei et al., 2008b; Wei et al., 2009a; Wei et al., 2009b; Yang, Tang et al., 2012b; Yang, Li et al., 2012a). *Dastarcus helophoroides* was found to be parasitic on older larvae (above 3rd age) and pupae without damaging larvae of 1-3 years old. Tests in the forests have shown that the parasite infestation reached 88.8% 40 days after the release of adult parasites and 93.1% 30 days after their hatching from the egg. The average number of parasites released from the infected host was 30 in laboratory tests and 28 to 68 in the field. Even if only one specimen of the parasite larvae was found on the host larvae, it can kill the pest (Yang, Tang et al., 2012b). Eight species of longhorn beetles have been identified in oak groves, with four predominant species: *N. raddei*, *Moechotypa diphyis*, *Mesosa myops* and *Stenygrinum quadrinotatum*. *Moechotypa diphyis* and *Mesosa myops* are always present in the larval stages of older larvae in oak forests, while *N. raddei* larvae are of younger (1-3) ages and are not suitable for the development of *Dastarcus helophoroides*.

These two species of Cerambycidae are the main alternative hosts of *D. helophoroides* in oak forests in north-eastern China, allowing the parasite to maintain high population densities.

Another species of the chestnut trunk borer parasite, *Cerchysiella raddei* Yang (Hymenoptera: Chalcidoidea, Encyrtidae), has been found relatively recently, developing on adult larvae of the borer. It is a public coynobionic (with a strategy of survival on a mobile host) endoparasite with a large number of specimens emerging from one larva of *N. raddei* (an average of 1083.8). This species has a significant predominance of females over males (ratio 9.67:1). This species has good potential as a biological agent for population control of *N. raddei* (Zhang et al., 2005).

Experience of combined control technology application in China. A comprehensive control method has been developed and applied to monitor the chestnut trunk borer: black light traps to capture adults were, *Sclerodermus pupariae* restricts the number of younger larvae and the egg-laying and release of the adult *Dastarcus helophoroides* parasite regulates the number of older larvae and pupae. As a result of these methods, the pest has been successfully controlled for 5 years in oak forests in north-eastern China (Yang, Tang et al., 2012b).

Comparative assessment and selection of effective and safe phytosanitary measures to reduce pest risk. The most effective measures:

Possible measures: specific crop production conditions.

Plants for planting can be grown in complete isolation from pests. However, this is not common practice in forest tree nurseries. This is only possible for small production.

In theory, a pest free area can be defined, but it is not certain whether there are pest free areas in the countries of natural distribution of *Neocerambyx raddei*. Additional data on the rate of spread and the potential range of host plants are needed to better define the requirements.

In order to ensure that pest free areas in countries where the pest has already established itself, it is recommended that the following requirements are met to establish and maintain a *Neocerambyx raddei* free area:

- minimum distance of at least 2.0 km between the pest free area and the closest area where the pest is known to occur. This distance may depend on the intensity of monitoring and the level of

uncertainty of pest spread, the presence of natural barriers, etc. (Pest Risk Analysis., 2018).

- thorough inspections and surveillance should be carried out in the area for two years prior to the establishment of the pest free area and continue each year. Special investigations should be carried out between the borer free area and the known pest infestation site (outbreak) to determine the pest free area. Research should also aim to visually detect *Quercus*, *Castanea* and *Morus* trees and include the use of interception traps.

- raising public awareness of the pest is an important element for clarifying information on the pest,

- restrictions should be applied on the movement of materials from *Quercus*, *Castanea* and *Morus* species (from areas where the pest is known to occur) to pest free areas and to the surrounding areas, especially between free areas and the nearest pest outbreaks,

- immediately before export, the consignment of plants should be officially inspected for *Neocerambyx raddei*.

These recommendations may need to be adapted for countries with limited outbreaks that are officially regulated in pest free areas.

- plants should be grown during the entire life cycle or at least 3 years at the following place of production, which is free from *Neocerambyx raddei* in accordance with International Standards for Phytosanitary Measures:

- (I) which are registered and controlled by the NPPO in the country of origin,

- (II) which are subjected to at least two formal thorough inspections each year for any signs of *Neocerambyx raddei* that are carried out at the appropriate time and do not show signs of organism presence,

- (III) where plants are grown at a facility with full physical protection against introduction of *Neocerambyx raddei* and,

- (IV) where, immediately prior to export, a consignment of plants has been subjected to official inspection for the presence of the organism and for destructive sampling (Pest Risk Analysis., 2018).

Neocerambyx raddei Blessig can be relatively widespread in Russia. It represents a significant threat to oak and chestnut forests in Russia. In this regard, it is advisable to include the *Neocerambyx raddei* Blessig into both the List of Quarantine Objects of Limited Distribution in the Russian Federation and the List of Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union.

References

1. Vorontsov A.I. *Lesnaya entomologiya* [Forest entomology]. M.: Vysshdaia shkola, 1982. 384 pp.
2. Danilevskii M.L., Miroshnikov A.I. Zhuki-drovoseki Kavkaza (Coleoptera, Cerambycidae). Opreditel' [Caucasian bark borers (Coleoptera, Cerambycidae). Identification guide]. Krasnodar, 1985. 417. P. 43.
3. Liantseva I.M., Materialy k izucheniyu lichinok usachej podsem. Cerambycinae (Coleoptera, Cerambycidae) [Materials for the study of the larvae of Cerambycinae subfamily (Coleoptera, Cerambycidae)]. Entomologicheskoe obozrenie, 1978. Vol. 57, issue 2. P. 354-360.
4. ISPM 2. Framework for pest risk analysis.
5. ISPM 9. Guidelines for pest eradication programmes, 2004.
6. ISPM 11. Pest risk analysis for quarantine pests, including analysis of environmental risk and risk posed by live modified organisms, 2004.
7. ISPM 15. Regulation of wood packaging material in international trade, 2004.
8. Plavilshchikov N.N. Zhuki-drovoseki. Fauna SSSR. Nasekomye zhestkokrylye [The bark beetles. Fauna of the USSR. Coleopteran insects]. M.-L., 1940, Vol. XXII, Part. 2. 785 pp.
9. Regional standards on phytosanitary measures. EPPO Standard PM 5/3 (5). Pest risk analysis: Decision-support scheme for quarantine pests (2011) 2007-09, OEPP/EPPO.
10. EPPO PM 8/3 (Commodity-specific phytosanitary measures: *Quercus* and *Castanea*, 2010).
11. Smith I.M., Orlinskii A.D. Skhema EOZR dlya ocenki fitosanitarnogo riska. Karantin i zashchita rastenij [EPPO scheme for pest risk assessment. Quarantine and plant protection]. 1999, N 8.
12. Cherepanov A.I. Usachi Severnoj Azii (Cerambycinae: Hesperophanini: Callidiini) [Borers of North Asia (Cerambycinae: Hesperophanini – Callidiini)]. Novosibirsk: Nauka, 1981. p. 216.
13. Cherepanov A.I. Semejstvo Cerambycidae – Usachi, ili Drovoseki [The Cerambycidae family – borers or sawyers]. In collected volume: Insect identification Guide of the Far East of Russia (in six volumes, under general editorship of P.A. Ler). V. 3. P. 3. Vladivostok: Dalnauka, 1996. 555 pp.
14. Alakangas E. 2010. European standard (EN 14961) for wood chips and hog fuel, Forest Bioenergy, 2010,

- 31st August – 3rd September 2010, Book of proceedings. FINBIO Publication 47, 329-340. Available at www.woodheat-solutions.eu/documents/eng_51.pdf.
15. CEN. 2011. Standard EN 14961-4. Solid biofuels – Fuel specifications and classes. Part 4: Wood chips for non-industrial use.
16. Chou W.I. 2008. The Atlas of Taiwanese Cerambycidae (Second Edition). Owl Publishing House, Taipei. 408 pp.
17. Danilevsky M. 2004. Annotated list of longhorn beetles (Cerambycidae) of Mongolia. <http://www.zin.ru/Animalia/coleoptera/eng/moncertx.htm>.
18. Danilevsky M.L. 2007. A check list of the longicorn beetles (Cerambycidae) of Russia, Ukraine, Moldova, Transcaucasia, Central Asia, Kazakhstan and Mongolia. 35 pp.
19. Danilevsky M.L. 2013. Additions and corrections to the new catalogue of Palearctic Cerambycidae (Coleoptera), edited by I. Löbl and A. Smetana, 2010. Part VII. International Almanac, 2 (1): 170-210.
20. EEA. 2006. European forest types. Categories and types for sustainable forest management reporting and policy. Technical report No 9/2006. European Environment Agency.
21. EPPO. 2009a. Heat treatment of wood to control insects and wood-borne nematodes. PM 10/6 (1). EPPO Bulletin, 39 (1): 31.
22. EPPO. 2009b. Disinfestation of wood with ionizing radiation. PM 10/8 (1). EPPO Bulletin, 39 (1): 34-35.
23. EPPO. 2009c. Methyl bromide fumigation of wood to control insects PM 10/7 (1) EPPO Bulletin, 39 (1): 32-33.
24. EPPO. 2012c. EPPO Technical Document No. 1061, EPPO Study on the Risk of Imports of Plants for Planting EPPO Paris. www.eppo.int/QUARANTINE/EPPO_Study_on_Plants_for_planting.pdf.
25. EPPO. 2015. *Massicus raddei* (Coleoptera: Cerambycidae – oak longhorn beetle): addition to the EPPO Alert List.
26. EPPO, 2016. PQR database. Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization. <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>.
27. FAO, 2013a. ISPM 15. Regulation of wood packaging material in international trade. International Standards for Phytosanitary Measures. International Plant Protection Convention. https://www.ippc.int/index.php?id=ispms&no_cache=1&L=0.
28. FAO. 2008. IPPC Recommendation Replacement or reduction of the use of methyl bromide as a phytosanitary measure. <https://www.ippc.int/core-activities/governance/cpm-recommendations/replacement-or-reduction-of-the-use-of-methyl-bromide-as-a-phytosanitary-measure>.
29. FAO. 2013b. Draft ISPM Minimizing Pest Movement by Sea Containers. <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/member-consultation-draft-ispms>.
30. FAO. 2008. IPPC Recommendation Replacement or reduction of the use of methyl bromide as a phytosanitary measure. <https://www.ippc.int/core-activities/governance/cpm-recommendations/replacement-or-reduction-of-the-use-of-methyl-bromide-as-a-phytosanitary-measure>.
31. Fleming M.R., Hoover K., Janowiak J.J., Fang Y., Wang X. et al. 2003. Microwave irradiation of wood packing material to destroy the Asian longhorned beetle. For. Prod. J., 53 (1): 46-52.
32. Fleming M.R., Janowiak J.J., Kimmel J.D., Halbrendt J.M., Bauer L.S., Miller D.L., Hoover K. 2005. Efficacy of commercial microwave equipment for eradication of pine wood nematodes and cerambycid larvae infesting red pine. Forest Products Journal, 55 (12): 226-232.
33. Fu C. 2010. Raspberry Pest Identification and The Disease Control in Liaoning Province. Master thesis. <http://www.dissertationtopic.net/doc/116163>.
34. Gressitt J.L. 1942. Destructive Long-Horned Beetle borers at Canton, China. Special Publication 1. Lingnan Natural History Survey and Museum, Lingnan University, Canton, China. 1-60.
35. Gressitt J.L. 1951. Longicorn Beetles of China. Longicornia, 2: 1-667.
36. Hua L.Z. 2002. List of Chinese Insects. Vol. II. Zhongshan (Sun Yat-sen) University Press, Guangzhou. 612 pp.
37. Hua L.Z., Nara H., Samuelson G.A., Lingafelter S.W. 2009. Iconography of Chinese Longicorn Beetles (1406 Species) in Color. Sun Yat-sen University Press, Guangzhou. 474 pp.
38. Hua L.Z., Nara H., Yu C. 1993. Longicorn-Beetles of Hainan & Guangdong. Muh-Sheng Museum of Entomology Publisher, Nantou Hsien, Taiwan: 319 pp.
39. Lee S.M. 1982. Longicorn Beetles of Korea (Coleoptera: Cerambycidae). Insecta Koreana, 1: 1-85.
40. Lei C. & Zhou Z. 1998. Insects records of Hubei, China-Hubei Science and Technology Publishing House, Wuhan, China. 650 pp.
41. Li L. 2009. Longhorn beetles of Yunnan. 223 pp.
42. Liu Q., Wang Y., & Zhou J. 1999. Biology of RNL's boring trunk and expelling frass. Journal of China agricultural University, 4 (5): 87-91 (abstract).
43. Löbl I. & Smetana A. 2010. Catalogue of Palearctic Coleoptera, 6 Chrysomeloidea. Appollo Books, Stenstrup. 924 pp.
44. Massaro F. & Passari M. 2012. Misure fitosanitarie regionali per la lotta al Cerambicide *Neocerambyx raddei* in Campania ai sensi del decreto legislativo 19 agosto 2005, n. 214 e sue modifiche. Giunta Regionale della Campania: Decreto Dirigenziale. http://www.agricoltura.regione.campania.it/difesa/files/DRD_426-14-11-12.pdf.
45. Matsushita M. 1933. Beitrag zur Kenntnis der Cerambyciden des Japanischen Reich. Journal of the Faculty of Agriculture. Hokkaido imperial University, 34 (2): 157-445.
46. McCullough D.G., Poland T.M., Cappaert D., Clark E.L., Fraser I., Mastro V., Smith S. & Pell C. 2007. Effects of chipping, grinding, and heat on survival of emerald ash borer, *Agrilus planipennis* (Coleoptera, Buprestidae), in chips. Journal of Economic Entomology, 100 (4): 1304-1315.
47. New M., Lister D., Hulme M., Makin I. 2002. A high-resolution data set of surface climate over global land areas. Climate Research, 21.
48. Okamoto H. 1927. The Longicorn Beetles from Corea. Insecta Matsumurana, 2 (2): 62-86.
49. Pest Risk Analysis for *Aromia bungii* EPPO. 2014. Paris. Available at http://www.eppo.int/QUARANTINE/Pest_Risk_Analysis/PRA_intro.htm.
50. Pest Risk Analysis for *Massicus raddei* (Coleoptera: Cerambycidae), oak longhorn beetle. EPPO, September 2018. Available at <https://gd.eppo.int/taxon/MALLRA/documents>.
51. Plavilstshikov N.N. 1934. Bestimmungs-Tabellen der europäischen Coleopteren. 112. Cerambycidae 3. Cerambycinae: Cerambycini 3 (Callichromina, Rosaliina, Callidiina). Verlag: Edmund Reitter, Troppau: 230 pp.
52. Qi C. 1999. Longicorn Beetles fauna of Shandong province, China. 112 pp.
53. SEAP (Shandong Ecological Afforestation Project), 2009. Integrated pest management plan. Shandong Academy of Environmental Science, E2221, Vol. 2: 40 pp.
54. Smith M.T., Tobin P.C., Bancroft J., Li G. & Gao R. 2004. Dispersal and spatiotemporal dynamics of Asian Longhorned Beetle (Coleoptera: Cerambyci-

dae) in China. Environmental Entomology, 33 (2): 435-442.

55. Sun J.L., Sun G.J., Dong X.N., Gao Z.Q., Tang Y.L., Jiang J., Yang Z.Q. 2010. Studies on biological characteristics and biocontrol techniques for *Massicus raddei*. Liaoning Forestry Science and Technology, 2010 (4), 5-7.

56. Sun Y.P. (ed.), 2001. Control techniques of the oak longhorn beetle. Liaoning Sci. & Tech. Press, Shengyang. P. 1-84.

57. Tang Y.L., Wang X.Y., Yang Z.Q., Jiang J., Wang X.H., Lü J. 2012a. Alternative hosts of *Sclerodermus pupariae* (Hymenoptera: Bethyilidae), a larval parasitoid of the longhorn beetle *Massicus raddei* (Coleoptera: Cerambycidae). Acta Entomologica Sinica, 55 (1), 55-62.

58. Tang Y.L., Yang Z.Q., Jiang J., Wang X.Y., Gao C. 2011. Distribution pattern of larvae and pupae of *Massicus raddei* in the trunk of *Quercus liaotungensis*. Scientia Silvae Sinicae, 47 (3), 117-123 (abst.).

59. Tang Y.L., Yang Z.Q., Wang X.Y., Tang H., Jiang J., Wei K., Lü J. 2012b. Biocontrol of oak longhorn beetle, *Massicus raddei* by releasing parasitoid *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothrididae) adults and eggs. Scientia Silvae Sinicae, 48 (7), 186-191.

60. Tian J., Wang X.Y., Yang Z.Q., Ma L., Lang J., Zeng F.X., He G.P. 2009. Effects of temperature on development and reproduction of parasitic wasp *Spathius agrili* Yang (Hymenoptera: Braconidae), an effective parasitoid of emerald ash borer. Acta Entomologica Sinica, 52 (11), 1223-1228.

61. Van der Gaag D.J., Ciampitti M., Cavagna B., Maspero M., Hérard F. 2008. Pest Risk Analysis for *Anoplophora chinensis*. Plant Protection Service, Wageningen (NL).

62. VKM, 2013. Import of deciduous wood chips from eastern North America – pathway-initiated risk characterizations of relevant plant pests. <http://www.english.vkm.no/dav/68ef0595b3.pdf>.

63. Wang X.D., Huang H.H., Xu Z.F., Yang Z.Q., Fan J.X., Chen J.J., Qian M.H. 2004. Primary study on the bionomics of *Dastarcus helophoroides* (Fairmaire). Natural Enemies of Insects, 26 (2), 60-65.

64. Wang X.Y., Yang Z.Q., Tang Y.L., Jiang J., Gao C., Liu Y.C. 2010b. Parasitism of *Sclerodermus pupariae* (Hymenoptera: Bethyilidae) on the young larvae of *Massicus raddei* (Coleoptera: Cerambycidae). Acta Entomologica Sinica, 53 (6), 675-682.

65. Wang X.Y., Yang Z.Q., Tang Y.L.,

Jiang J., Yang Y.L., Gao C. 2012. Determination of larval instar number and duration in the oak longhorn beetle, *Massicus raddei* (Coleoptera: Cerambycidae). Acta Entomologica Sinica, 55 (5), 575-584.

66. Wang Y.H., Lai Y.X., Cen D.H., Wang J.Y., Yang Z.Q. 2012a. Behavior and numbers of *Dastarcus helophoroides* beetle's laying egg and its first-instar larvae parasitism on larvae of *Monochamus alternatus*. Journal of Environmental Entomology, 33 (4), 517-522.

67. Wei J.R., Yang Z.Q., Du J.W. 2008a. R)-(+)-limonene, kairomone for *Dastarcus helophoroides*, a natural enemy of longhorned beetles. Agricultural and Forest Entomology, 10, 323-330.

68. Wei J.R., Yang Z.Q., Tang H., Ma J.H., Du J.W. 2008b. Behavior of a cerambycid parasitoid beetle (*Dastarcus helophoroides*). Scientia Silvae Sinicae, 44 (7), 50-55.

69. Wei J.R., Yang Z.Q., Poland T.M., Du J.W. 2009a. Parasitism and olfactory responses of *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothrididae) to different Cerambycid hosts. Biological Control, 51, 733-742.

70. Wei J.R., Yang Z.Q., Wang P.Y., Sun X.G., Sun L.G. 2009b. Control of *Massicus raddei* (Blessig) (Coleoptera: Cerambycidae) by parasitic beetle *Dastarcus helophoroides* Sharp (Coleoptera: Bothrididae). Chinese Journal of Biological Control, 26 (3), 285-287.

71. Yang Z.Q. 2004. Advance in biocontrol of researches of the important forest insect pests with natural enemies in China. Chinese Journal of Biological Control, 20 (4), 221-228.

72. Yang Z.Q. 2007. Recent advance in the biological control of forest invasive pests in China. In: Proceedings of the International Symposium on Plant Quarantine and Exotic Pest Management. P. 109-134.

73. Yang Z.Q., Wei J.R., You L.S. 2002. Two new braconid species parasitizing larva of all webworm from China (Hymenoptera, Braconidae). Acta Zootaxonomica Sinica, 27 (3), 608-615.

74. Yang Z.Q., Wei J.R., 2003a. Two new species of howardi-species group in the genus *Tetrastichus* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing fall webworm from China. Scientia Silvae Sinicae, 39 (5), 67-73.

75. Yang Z.Q., Wang C.Z., Liu Y.M. 2003b. A new species in the genus *Aprostocetus* (Hymenoptera: Eulophidae) parasitizing pupa of fall webworm from Yantai, Shandong Province, China. Scientia Silvae Sinicae, 39 (6), 87-90.

76. Yang Z.Q., Tang H., 2011. Black-light lamp filtration in attracting long horned beetles and its application in forest. In: Lei Chao-Liang, Wu Kong-Ming, Zhao Shu-Ying (Eds.), Pests Physical Monitoring and Control Technology Research in China. Hubei Science and Technology Press, Wuhan. P. 15-17.

77. Yang Z.Q., Wang X.Y., Wang B., Yu Y.P., Dong Z.M., Mou Z.H., Wang H.S. 2011. Relationship between adult emergence of *Massicus raddei* (Coleoptera: Cerambycidae) and temperature and relative humidity. Acta Ecologia Sinica, 31 (24), 7486-7491.

78. Yang Z.Q., Li M.L., Lei Q., Wang X.Y. 2012a. Effects of temperature on development and reproduction of *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothrididae). Chinese Journal of Biological Control, 28 (1), 9-14.

79. Yang Z.Q., Tang Y.L., Jiang J., Wang X.Y., Tang H., Lü J., Gao Y. 2012b. Study on alternative hosts of *Dastarcus helophoroides*, a parasitoid of *Massicus raddei* / Biological Control, 68 (2014) 117-128.

80. Yang Z.Q. et al. 2012. Population-keeping mechanism of the parasitoid *Dastarcus helophoroides* (Coleoptera: Bothrididae) of *Massicus raddei* (Coleoptera: Cerambycidae) in oak forest. Acta Ecologia Sinica, 32 (24), 7764-7773.

81. Yang Z.Q., Tang H., Wang X.Y., Wei J.R., Zhao H.B. 2013a. A new species of *Cerchysiella* (Hymenoptera: Encyrtidae) parasitic in larva of chestnut trunk borer (Coleoptera: Cerambycidae) from China with notes on its biology. Journal of Natural History, 47 (3-4), 129-138.

82. Yang Z.Q., Wang X.Y., Cao L.M., Tang Y.L., Tang H. 2013b. *Cerchysiella mesosae*, a new species of Encyrtidae (Hymenoptera) parasitizing in larva of *Mesosa myops* (Coleoptera: Cerambycidae) from China. Zootaxa, 3619 (2), 154-160.

83. Yu J., Sun J. & Mei Z. 2005. Diseases and pests of the main economic plants in sample area of Huajiang valley and their control. Guizhou Forestry Science and Technology, 33 (1): 34-36.

84. Zhang Y.Z., Huang D.W., Zhao T.H., Liu H.P., Bauer L.S. 2005. Two new species of egg parasitoids (Hymenoptera: Encyrtidae) of wood-boring beetle pests from China. Phytoparasitica, 33 (3), 253-260.

85. Zhong-Qi Yang, Xiao-Yi Wang, Yi-Nan Zhang, 2014. Recent advances in biological control of important native and invasive forest pests in China Biological Control, 68, 117-128.

STRIGA HERMONTHICA (DEL.) BENTH. – ОПАСНАЯ КРАСАВИЦА ИЗ АФРИКИ

Н.В. Цинкевич, младший научный сотрудник научно-методического отдела филиала ФГБУ «ВНИИКР» в Республике Крым

Ю.Ю. Кулакова, к.б.н., ведущий научный сотрудник

научно-методического отдела инвазивных видов растений ФГБУ «ВНИИКР»

Аннотация. Стриги – корневые полупаразиты, главным образом од-
нодольных растений, злостные сор-
няки культурных и дикорастущих
злаков. Эти растения образуют мно-
гочисленные пылевидные семена, ко-
торые засоряют зерно, корма, почву
и могут легко распространяться на
новые территории. Их выявление в
семенном и продовольственном мате-
риале крайне затруднительно, очист-
ка зерна от семян стриг практически
невозможна, поэтому ввоз продукции
данного типа на территорию ЕАЭС
из стран распространения сорняка
запрещен и подлежит возврату или
уничтожению.

Ключевые слова. *Striga hermonthica*
(Delile) Benth., стрига, корневой полу-
паразит, карантинный организм.

Striga Lour (Orobanchaceae) – па-
леотропический род, объединяющий

около 42 видов облигатных и факультативных корневых полупаразитов (Mohamed et al., 2001). Зонай их естественного обитания являются страны Африки и Азии (Holm et al., 1991). В Африке 2/3 сельскохозяйственных земель находятся в зоне распространения этих растений (Ivens, 1993; Mohamed et al., 2001). Основным путем распространения стриг на другие континенты является засоренное фуражное зерно и семенной материал (EPPO, 2000).

Жизненный цикл различных видов стриг имеет общие закономерности. Основной способ размножения – семенной. Семена прорастают через несколько месяцев после созревания плодов, корешок молодого проростка реагирует на корневые выделения растения-хозяина и прикрепляется к его корням при помощи гаусторий. В отличие от других представителей семейства Orobanchaceae у стриг формиру-



Fig. 1. General view of *Striga hermonthica* (photo by N.V. Tsinkevich)

Рис. 1. Общий вид стриги египетской (фото Н.В. Цинкевича)



Fig. 2. Corn crops infested by *Striga hermonthica* (photo by N.V. Tsinkevich)

Рис. 2. Зараженные стригой египетской посевы кукурузы (фото Н.В. Цинкевича)

ются зеленые побеги и настоящие листья, обеспечивающие им фототрофный тип питания. При этом воду и минеральные вещества паразит получает от растения-хозяина, что в дальнейшем приводит к замедлению роста последнего, вызывая серьезные потери урожая (Parker, Riches, 1993). Жизненный цикл стриг составляет 90-120 дней, половина которого проходит под землей. Зацветают стриги через месяц после появления надземных побегов и еще через месяц созревают семена.

Семена стриг очень мелкие (до 0,25 мм), практически неотличимы от частичек пыли; могут легко разноситься ветром, водой, животными, с почвой и сельскохозяйственной техникой, способны прилипать к зернам злаковых растений (Berner et



Fig. 3. Crop inspection in Kenya (photo by N.V. Tsinkevich)

Рис. 3. Обследование посевов в Кении (фото Н.В. Цинкевича)

al., 1994). Жизнеспособность семян сохраняется в течение 14 лет, однако во влажной почве она быстро теряется.

Наибольший ущерб в мире причиняют три вида стриг: *Striga asiatica* (L.) Kuntze, *S. hermonthica* (Delile) Benth. и *S. gesnerioides* (Willd.) Vatke (Mohamed et al., 2001). Стриги имеют жесткую специализацию в отношении растений-хозяев. Первые два вида поражают исключительно однодольные растения, включая *Zea mays* (кукурузу), *Pennisetum* spp. (пеннисетум), *Panicum* spp. (просо), *Eragrostis tef* (теф) и *Sorghum bicolor* (сорго), *Saccharum* spp. (сахарный тростник) и *Oryza sativa* (суходольный рис). Единственный вид стриг, который поражает только двудольные растения (вигну, табак, пасленовые, молочайные), – это *Striga gesnerioides*. Эти злостные сорняки наносят ощутимый удар по экономике многих африканских и азиатских стран, причиняя колоссальные потери урожая – на сумму около 1 миллиарда долларов ежегодно.

Род *Стрига* полностью включен в Единый перечень карантинных объектов ЕАЭС и регулируется при ввозе семенного и продовольственного материала зерновых и зернобобовых культур.

В мае 2019 года сотрудники ФГБУ «ВНИИКР» (Я.Н. Коваленко, С.Ю. Муханов, Н.В. Цинкевич) посетили Республику Кению, где наблюдали поля, засоренные стригой египетской *Striga hermonthica* (Delile) Benth. Это однолетнее растение, 15-100 см высотой, образует ветвистые побеги, покрытые щетинистым опушением. Листья супротивные, узколанцетные или эллиптические, 2-8 см длиной и до 1 см шириной; соцветие верхушечное, кистевидное, на кото-

ром расположены крупные сидячие цветки. Цветки окружены прицветниками 1-2 см длиной и 3 мм шириной с бахромой из реснитчатых волосков. Околоцветник двойной: чашечка трубчатая, до 1 см длиной, ребристая, с зубцами; венчик асимметрично колокольчатый, с трубкой, достигающей до половины или более половины длины цветка и коротким отгибом. Плод – коробочка удлинненно-овальной формы, до 1 см длиной, сдавленная с боков, с желобком по шву, в которой развивается несколько сотен мельчайших семян до 0,3 мм длиной. На одном растении может формироваться до 60 плодов-коробочек.

Стрига египетская распространена в 38 странах мира. В Африке она встречается преимущественно на северо-востоке континента, где за последние 100 лет оккупировала значительную часть Эфиопии. Является злостным сорняком Кении, вызывая высокие потери при выращивании кукурузы и сорго (Esilaba, 2006). На западе Африки растения этого вида имеют более мелкие цветки, на основании чего был описан новый вид *Striga senegalensis* Benth., который ныне сведен в синонимы к *S. hermonthica* (Delile) Benth. В целом более 10 млн га сельскохозяйственных угодий Африки засорены этим сорняком (Sauerborn, 1991). В Азии стрига египетская зарегистрирована в Саудовской Аравии, Йемене, Камбодже (Parker, Wuson, 1986). Вид регулируется карантинными перечнями Аргентины, Бразилии, Израиля, Мексики, Парагвая, Чили, Уругвая, Украины, США.

Striga hermonthica предпочитает малоплодородные почвы с низкой влажностью, редко встречается на орошаемых полях, хотя может пере-

носить кратковременное затопление. Сорняк поражает в первую очередь посевы сорго, а также риса, кукурузы, сахарного тростника; может угнетать некоторые дикорастущие злаки из родов *Panicum*, *Setaria*. При средней зараженности 1 паразит / 1 растение-хозяин потери урожая составляют около 5% (Parker, Riches, 1993). Общие потери урожая сорго в Северной Гане, причиняемые этим сорняком, составляли 21%, всех зерновых в Нигерии – 10%, в Гамбии – 8%, в Бенине – 6% (Sauerborn, 1991). К числу других серьезно пострадавших от сорняка стран относятся Камерун, Кот-д'Ивуар, Буркина-Фасо, Нигер, Мали, Сенегал, Того, Судан, Эфиопия, Кения, Уганда и Танзания (<https://www.cabi.org>).

Стрига египетская необычайно красива в период цветения. Засоренные ею поля выглядят как яркие декоративные клумбы, к которым устремляются опылители из различных отрядов насекомых (Lepidoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Coleoptera) (Musselman et al., 1983). У одного растения в соцветии может образовываться до 100 крупных лиловых цветков, которые распускаются по 10-15 одновременно. Цветки содержат богатый сахарами нектар. Период цветения длится около месяца.

Во время экспедиционной поездки на всем протяжении маршрута с севера на юг по территории Кении сотрудники ФГБУ «ВНИИКР» осматривали посевы кукурузы и суходольного риса. Зараженные стригой участки были обнаружены в окрестностях озера Виктория. Первое обнаружение было сделано в 7 км от города Ахеро, на территории фермерского хозяйства, выращивающего томаты и рис. Вторая находка расположена в 11 км от Национального аэропорта Кисуму и представляла собой непрерывную сеть полей кукурузы, зараженных стригой египетской.

Общая засоренность полей оценивалась от 2 до 20 растений стриги на 1 м². Пораженные стригой растения кукурузы имели хлоротические пятна на листьях, наблюдалось отставание в росте и недоразвитость отдельных побегов. В результате выкорчевывания этих растений удалось наблюдать место прикрепления гаусторий паразита к растению-хозяину.

Местные жители с энтузиазмом стали помогать в поисках и сборе сорняка, который у них называется «хаюм-



Рис. 4. Место прикрепление паразита к корням растения-хозяина (фото Н.В. Цинкевича)

ба». В итоге удалось собрать и гербаризировать цветущие растения стриги египетской в значительных количествах; найти зрелые плоды с семенами. Все эти уникальные материалы были переданы специалистам профильных отделов ФГБУ «ВНИИКР» для дальнейшего изучения. Данные материалы позволят детальнее ознакомиться с особенностями строения опасного сорного растения; пополнят коллекционный фонд ФГБУ «ВНИИКР», будут использованы при обучении специалистов испытательных лабораторий в области карантина растений и для проведения туров МСИ.

Литература

1. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 30 ноября 2016 г. № 157 «Единые карантинные фитосанитарные требования, предъявляемые к подкарантин-

ной продукции и подкарантинным объектам на таможенной границе и на таможенной территории Евразийского экономического союза».

2. Berner D.K., Cardwell K.F., Faturoti B.O., Ikie F.O., Williams O.A. Relative roles of wind, crop seeds, and cattle in dispersal of *Striga* spp. // Plant Disease, 1994. Vol. 78 (4). P. 402-406.

3. Esilaba A.O. Options for *Striga* management in Kenya // Kenya Agricultural Research Institute KARI, 2006. Technical Note № 19.

4. Holm L.G., Pancho J.V., Hergerger J.P., Plucknett D.L. A geographical atlas of world weeds // Krieger publishing Company, Malabar, Florida (US), 1991. 391 pp.

5. Ivens G.W. East African weeds and their control (new edition) // Oxford university Press, Nairobi, 1993. 288 pp.

6. Mohamed K.I., Musselman L.J., Riches C.R. The genus *Striga*

(Scrophulariaceae) in Africa // Annals of the Missouri Botanical Garden, 2001. Vol. 88 (1). P. 60.

7. Mini data sheet on *Striga* spp. EPPO, 2000.

8. Musselman L.J., Matteson P.C., Fortune S. Potential pollen vectors of *Striga hermonthica* (Scrophulariaceae) in West Africa. // Annals of Botany, 1983. № 51. P. 859-862.

9. Musselman L.J., Hepper F.N. The Witchweeds (*Striga*, Scrophulariaceae) of the Sudan Republic // Kew Bulletin, 1986. Vol. 41, No. 1. P. 205-221.

10. Parker C., Riches C.R. Parasitic weeds of the world: biology and control // Wallingford, UK; CAB International, 1993. 332 pp.

11. Parker C., Wuson A.K. Parasitic weed and their control in the Near East // FAO Plant Prot. Bull., 1986. Vol. 34 (2). P. 53-98.

12. Sauerborn J. The economic importance of the phytoparasites *Orobanche* and *Striga* // Proceedings of the Fifth International Symposium of Parasitic Weeds, Nairobi, Kenya, 24-30 June 1991. Nairobi, Kenya: CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center), 1991. P. 137-143.

13. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://gd.eppo.int/taxon/ISTRG/reporting>.

14. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cabi.org/isc/abstract/19932333951>.

UDC 632.5.01/.08

STRIGA HERMONTHICA (DEL.) BENTH. – DANGEROUS BEAUTY FROM AFRICA

N.V. Tsinkevich, Junior Researcher of the Research and Methodology Department of the Crimean Branch of FGBU "VNIICR"

Y.Y. Kulakova, PhD in Biology, Leading Researcher of the Invasive Plant Species Department of FGBU "VNIICR"

Abstract. Purple witchweeds are root semi-parasites of monocotyledonous plants mainly and are malignant weeds of cultivated and wild cereals. These plants form numerous dustlike seeds, which contaminate grain, fodder, soil and can easily

spread to new territories. Their detection in seeds and commodities is extremely difficult. Cleaning the grain from purple witchweed is almost impossible, thus it is prohibited to import the products of this type into the territory of the EEU from

the countries of distribution of weeds and such products must be returned or destroyed.

Keywords. *Striga hermonthica* (Delile) Benth., purple witchweed, brown semi-parasite, quarantine pest.



Рис. 5. Цветущие растения *Striga hermonthica* (фото Н.В. Цинкевича)

Fig. 5. Flowering plants of *Striga hermonthica* (photo by N.V. Tsinevich)



Рис. 6. Плоды *Striga hermonthica* (фото Н.В. Цинкевича)

Fig. 6. Fruits of *Striga hermonthica* (photo by N.V. Tsinevich)

Striga Lour (Orobanchaceae) is a paleotropical genus comprising about 42 species of obligate and facultative root semi-parasites (Mohamed et al., 2001). Their natural habitat is African and Asian countries (Holm et al., 1991). In Africa, 2/3 of agricultural land is in the distribution zone of these plants (Ivens, 1993; Mohamed et al., 2001). The main pathways of the purple witchweed to other continents are contaminated fodder grains and seeds (EPPO, 2000).

The life cycle of different species of the purple witchweed has common features. These plants are propagated only by seeds. Seeds start to sprout in a few months after the fruits have ripened; roots of the young seedling reacts to the root substances of the host plant and is attached to its roots with the help of histormiums. Unlike other members of the *Orobanchaceae* family, the purple witchweed forms green shoots and leaves, providing them with a phototrophic type of nutrition. The parasite receives water and minerals from the host plant, which further slows down the growth of the latter, causing serious crop losses (Parker and Riches, 1993). The life cycle of the purple witchweed is 90-120 days, half of which takes place underground. The purple witchweed blossoms one month after the appearance of the above-ground shoots and seeds ripen another month later.

Seeds of the purple witchweed are very small (up to 0.25 mm), practically indistinguishable from dust particles; they can be easily spread by wind, water, animals, soil and agricultural machinery, and can stick to cereal grains (Berner et al., 1994).

Seeds are viable for 14 years, but their viability rapidly reduces in wet soil.

Three species of the purple witchweed are the most damaging in the world: *Striga asiatica* (L.) Kuntze, *S. hermonthica* (Delile) Benth. and *S. gesnerioides* (Willd.) Vatke (Mohamed et al., 2001). The purple witchweed is highly specialized with host plants. The first two species only affect monocotyledonous plants, including *Zea mays* (corn), *Pennisetum* spp. (*Pennisetum*), *Panicum* spp. (millet), *Eragrostis tef* (teff) and *Sorghum bicolor* (sorghum), *Saccharum* spp. (sugar cane) and *Oryza sativa* (common rice). The one species that only affects dicotyledonous plants (cowpea, tobacco, solanaceous and spurge family plants) is *Striga gesnerioides*. These harmful weeds are a major blow to the economies of many African and Asian countries, causing enormous crop losses of about \$1 billion a year.

Striga genus is fully included in the Unified List of Quarantine Objects of the EEU and is regulated when importing commodities such as grain and legume seeds.

In May 2019, employees of FGBU "VNIIEK" (Ya.N. Kovalenko, S.Yu. Mukhanov, N.V. Tsinevich) visited the Republic of Kenya, where they observed fields infested with *Striga hermonthica* (Delile) Benth. This annual plant, 15-100 cm tall, forms branchy shoots covered with bristly hairs. Leaves are opposite, narrowly lanceolate or elliptical, 2-8 cm long and up to 1 cm wide; the inflorescence is apical, racemous, with sessile flowers. Flowers are surrounded by bracts 1-2 cm long and 3 mm wide with a

tassel of ciliate hairs. The perianth is double: calyx tubular, up to 1 cm long, ribbed, with teeth; corolla asymmetrically bell-shaped, with a tube reaching half or more than half the length of the flower and a short limb. Fruit represents a capsule of elongated-oval shape, up to 1 cm long, compressed from the sides, with a groove at the raphe, which develops several hundred tiny seeds up to 0.3 mm long. Up to 60 fruits can be formed on one plant.

Striga hermonthica is widespread in 38 countries around the world. In Africa, it is found mainly in the north-east of the continent, where it has occupied a significant part of Ethiopia over the past 100 years. It is an aggressive weed in Kenya, causing high losses in maize and sorghum production (Esilaba, 2006). In western Africa, plants of this species have smaller flowers, and a new species *Striga senegalensis* Benth. has been described, which is now synonymous with *S. hermonthica* (Delile) Benth. In total, more than 10 million hectares of agricultural land in Africa are infested with this weed (Sauerborn, 1991). In Asia, *Striga hermonthica* is registered in Saudi Arabia, Yemen, Cambodia (Parker, Wuson, 1986). The species is regulated by quarantine lists of Argentina, Brazil, Chile, Israel, Mexico, Paraguay, Uruguay, Ukraine and the USA.

Striga hermonthica prefers low fertility soils with low humidity, rarely found in irrigated fields, although it can tolerate short-term flooding. Weed primarily affect sorghum crops, as well as rice, corn, sugar cane; it can hamper the growth of some wild grains like as *Panicum* spp., *Setaria* spp. With an average infestation of 1 para-

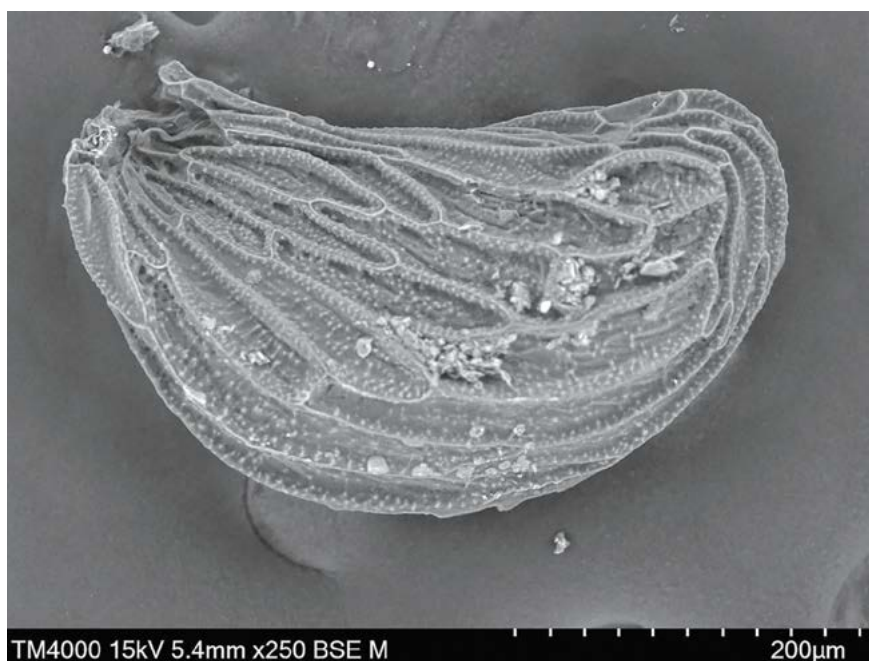


Рис. 7. Семя *Striga hermonthica* (SEM) (фото Ю.В. Орловой)

Fig. 7. Seed of *Striga hermonthica* (SEM) (photo by Y.V. Orlova)

site / 1 host plant, yield losses are about 5% (Parker and Riches, 1993). The total loss of sorghum yield in Northern Ghana was 21%, in Nigeria it was 10%, in the Gambia it was 8%, and in Benin it was 6% (Sauerborn, 1991). Other countries seriously affected by weeds include Cameroon, Côte d'Ivoire, Burkina Faso, Ethiopia, Niger, Mali, Senegal, Togo, Sudan, Uganda and Tanzania (<https://www.cabi.org>).

Striga hermonthica is surprisingly beautiful plant during the flowering period. The fields it covers look like bright decorative flowerbeds, to which pollinators from various insect groups rush (Lepidoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Coleoptera) (Musselman et al., 1983). One plant can produce up to 100 large purple flowers in the inflorescence, 10 to 15 of which blossom simultaneously. The flowers contain sugar-rich nectar. The flowering period lasts about a month.

During the expedition trip all along the route from north to south in Kenya, the team of FGBU "VNIKR" inspected corn and upland rice crops. Areas infested by *Striga hermonthica* were found in the vicinity of Lake Victoria. It was first detected 7 km from the city of Ahero, on a tomato and rice farm. The second detection was 11 km from Kisumu National Airport, which was a continuous network of corn fields infested with *Striga hermonthica*.

The total infestation of the fields was estimated at 2 to 20 purple witchweeds plants per 1 m². Plants affected by *Striga hermonthica* had chlorotic spots on their leaves, and some shoots were stunted and underdeveloped. As a result of uprooting

of these plants it was possible to observe the place of attachment of parasite haustoria to the host plant.

The locals enthusiastically began to help in finding and collecting weeds, which they call Hayumba. As a result, it was possible to collect and desiccate flowering *Striga hermonthica* in significant quantities and also to find mature fruits with seeds. All these unique materials were handed over to the specialists of the relevant departments of FGBU "VNIKR" for further study. The given materials will allow to study in details of the morphologically structure of this dangerous weed plant, will replenish the collection fund of FGBU "VNIKR", and will be used at the training of experts of test laboratories in the field of plant quarantine and for carrying out of inter-laboratory proficiency testing.

References

1. Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission of 30 November 2016 No. 157 Common Quarantine Phytosanitary Requirements imposed on quarantine products and quarantine pests at the customs border and in the customs territory of the Eurasian Economic Union.
2. Berner D.K., Cardwell K.F., Faturoti B.O., Ikie F.O., Williams O.A. Relative roles of wind, crop seeds, and cattle in dispersal of *Striga* spp. // Plant Disease, 1994. Vol. 78 (4). P. 402-406.
3. Esilaba A.O. Options for *Striga* management in Kenya // Kenya Agricultural Research Institute KARI, 2006. Technical Note № 19.



Рис. 8. Н.В. Цинкевич во время сбора растений стриги

Fig. 8. N.V. Tsinevich during the collection of the purple witchweed plants

4. Holm L.G., Pancho J.V., Hergerger J.P., Plucknett D.L. A geographical atlas of world weeds // Krieger publishing Company, Malabar, Florida (US), 1991. 391 pp.

5. Ivens G.W. East African weeds and their control (new edition) // Oxford university Press, Nairobi, 1993. 288 pp.

6. Mohamed K.I., Musselman L.J., Riches C.R. The genus *Striga* (Scrophulariaceae) in Africa // Annals of the Missouri Botanical Garden, 2001. Vol. 88 (1). P. 60.

7. Mini data sheet on *Striga* spp. EPPO, 2000.

8. Musselman L.J., Matteson P.C., Fortune S. Potential pollen vectors of *Striga hermonthica* (Scrophulariaceae) in West Africa. // Annals of Botany, 1983. № 51. P. 859-862.

9. Musselman L.J., Hepper F.N. The Witchweeds (*Striga*, Scrophulariaceae) of the Sudan Republic // Kew Bulletin, 1986. Vol. 41, No. 1. P. 205-221.

10. Parker C., Riches C.R. Parasitic weeds of the world: biology and control // Wallingford, UK; CAB International, 1993. 332 pp.

11. Parker C., Wuson A.K. Parasitic weed and their control in the Near East // FAO Plant Prot. Bull., 1986. Vol. 34 (2). P. 53-98.

12. Sauerborn J. The economic importance of the phytoparasites *Orobanch* and *Striga* // Proceedings of the Fifth International Symposium of Parasitic Weeds, Nairobi, Kenya, 24-30 June 1991. Nairobi, Kenya: CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center), 1991. P. 137-143.

13. [Electronic resource]. – Access mode: <https://gd.eppo.int/taxon/1STRG/reporting>.

14. [Electronic resource]. – Access mode: <https://www.cabi.org/isc/abstract/19932333951>.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ ЭКСПЕДИЦИЯ ФГБУ «ВНИИКР» в Республику Кения

Я.Н. Коваленко, к.б.н. старший научный сотрудник НМО энтомологии ФГБУ «ВНИИКР»

Н.В. Цинкевич, младший научный сотрудник научно-методического отдела филиала ФГБУ «ВНИИКР» в Республике Крым

С.Ю. Муханов, научный сотрудник отдела организации МСИ ФГБУ «ВНИИКР»

Аннотация. Статья посвящена энтомологическо-герботологической научно-практической экспедиции ФГБУ «ВНИИКР» на территорию Республики Кения в мае 2019 года. Кратко рассмотрены особенности растениеводческого сектора сельского хозяйства Кении, а также изложены результаты экспедиции.

Ключевые слова. Африка, Кения, фауна, флора, энтомология, герботология, вредные организмы, сорные растения, карантинные объекты.

Введение

Республика Кения – государство, расположенное в Восточной Африке, в северо-восточной части Восточно-Африканского плоскогорья. На севере Кения граничит с Эфиопией и Южным Суданом, на западе – с Угандой, на востоке – с Сомали, на юге – с Танзанией. Центральную часть Восточно-Африканского плоскогорья на территории страны пересекает Великая рифтовая долина (рис. 1), западнее которой расположено плодородное плато, восточнее – плоскогорье, ступенчато понижающееся вплоть до побережья Индийского океана, вдоль которого тянется участок восточной границы страны. Наивысшая точка на территории государства, гора Кения (5199 метров н.у.м.) (рис. 2), является второй вершиной Африки после Килиманджаро, часть подошвы которого также расположена на территории Кении. Еще одна из высочайших гор континента (7-е место после Килиманджаро), гора Элгон, также частично расположена в Кении; есть на территории страны и множество более мелких гор (частично, как и гиганты региона, представленных стратовулканами). Подобное ландшафтно-географическое разнообразие, обусловленное во многом высотной

пооясностью, определяет климатические особенности отдельных территорий Кении и их пригодность для использования в различных отраслях сельского хозяйства. Знаменитые кенийские плоскогорья, идеально подходящие для выращивания ценных сортов арабики и чая, являются одним из самых продуктивных сельскохозяйственных регионов Восточной Африки (рис. 3). При общей площади Кении в 58 тыс. га, земли сельскохозяйственного назначения составляют почти 28 тыс. га, занимая, таким образом, практически половину всей территории страны (FAO, 2019). По последним данным, более четверти (26%) ВВП Кении приходится на продукцию сельского хозяйства, еще примерно столько же (27%) – на другие секторы экономики страны, косвенно связанные с сельским хозяйством. Более 40% населения страны заня-

пооясностью, определяет климатические особенности отдельных территорий Кении и их пригодность для использования в различных отраслях сельского хозяйства. Знаменитые кенийские плоскогорья, идеально подходящие для выращивания ценных сортов арабики и чая, являются одним из самых продуктивных сельскохозяйственных регионов Восточной Африки (рис. 3). При общей площади Кении в 58 тыс. га, земли сельскохозяйственного назначения составляют почти 28 тыс. га, занимая, таким образом, практически половину всей территории страны (FAO, 2019). По последним данным, более четверти (26%) ВВП Кении приходится на продукцию сельского хозяйства, еще примерно столько же (27%) – на другие секторы экономики страны, косвенно связанные с сельским хозяйством. Более 40% населения страны заня-

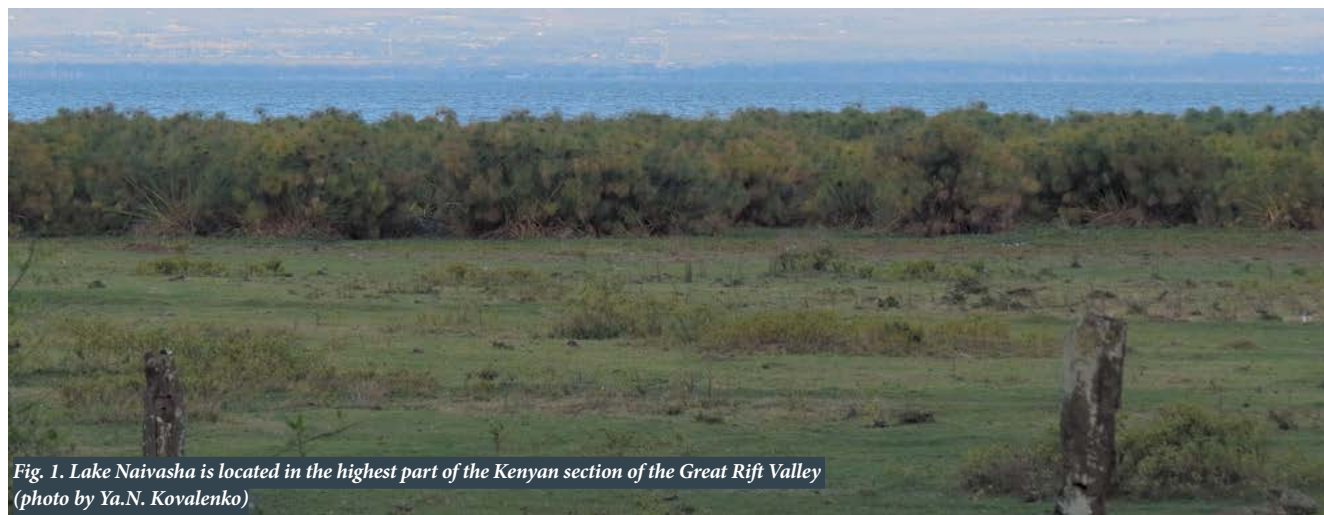


Fig. 1. Lake Naivasha is located in the highest part of the Kenyan section of the Great Rift Valley (photo by Ya.N. Kovalenko)

Рис. 1. Озеро Найваша расположено в наиболее высокой части кенийского участка части Великой рифтовой долины (фото Я.Н. Коваленко)

ты в сельском хозяйстве, данная отрасль остается ведущей в экономике страны, отличаясь при этом очень неоднородной структурой со множеством общественных, полугосударственных, неправительственных и частных хозяйствующих субъектов (рис. 4). Сельскохозяйственный сектор в целом, как за счет занятости населения, так и через непосредственное удовлетворение продовольственных нужд, обеспечивает средства к существованию для более чем 80% населения Кении, а сельхозпродукция при ее продаже за рубеж дает около 65% общей экспортной выручки страны ежегодно (FAO, 2019). Основные выращиваемые в стране культуры представлены кукурузой, сахарным тростником, чаем, кофе, рисом, сорго, просо, арахисом, маниок (кассавой), масличной пальмой и т.д. (FAO, 2019). По данным Федеральной таможенной службы (Таможенная статистика внешней торговли, 2019), в настоящее время Кения является крупным экспортером сельскохозяйственной продукции в Российскую Федерацию: так, в период 2016-2019 гг. этой страной в РФ были поставлены более 81 тыс. т чая и кофе, почти 21 тыс. т свежих цветов (включая срезанные), луковиц, корневищ и саженцев преимущественно декоративных культур, почти 18 тыс. т фруктов и орехов, более 2 тыс. т табака и его производных, более 0,5 тыс. т овощной продукции, а также многое другое. Кроме того, Кения является крупным импортером российской зернопродукции: за тот же период (2016-2019 гг.) эта страна закупила ее из России в количестве около 2 млн т. Приведенные данные свидетельствуют о достаточно интенсивном товарообмене сельхозпродукцией между двумя странами. При этом на территории Кении, по данным ЕОКЗР (EPPO Global Database, 2019) и САБИ (Invasive Species Compendium, 2019), зарегистрированы многие объекты Единого перечня карантинных объектов Евразийского экономического союза (ЕПКО) (около двадцати видов только насекомых-вредителей), а также насекомые-вредители и сорные растения, близкие к карантинным объектам или рекомендо-



Fig. 2. Alpine zone of Mount Kenya. Large plants in the photo are endemic for Mount Kenya *Dendrosenecio keniensis* (Baker f.) Mabb. (photo by Ya.N. Kovalenko)

Рис. 2. Альпийский пояс горы Кения. Крупные растения в кадре – эндемичные для горы Кения *Dendrosenecio keniensis* (Baker f.) Mabb. (фото Я.Н. Коваленко)



Fig. 3. Coffee plant on a coffee plantation in Kiambu County (photo by Ya.N. Kovalenko)

Рис. 3. Растение кофе на кофейной плантации в округе Киамбу (фото Я.Н. Коваленко)



Fig. 4. Rice fields of one of the agricultural cooperatives in the Lake Victoria area (photo by Ya.N. Kovalenko)

Рис. 4. Рисовые поля одного из сельскохозяйственных кооперативов в районе озера Виктория (фото Я.Н. Коваленко)



Fig. 5. Corn plantations on the shore of Lake Victoria
(photo by Ya.N. Kovalenko)

Рис. 5. Посадки кукурузы на берегу озера Виктория
(фото Я.Н. Коваленко)

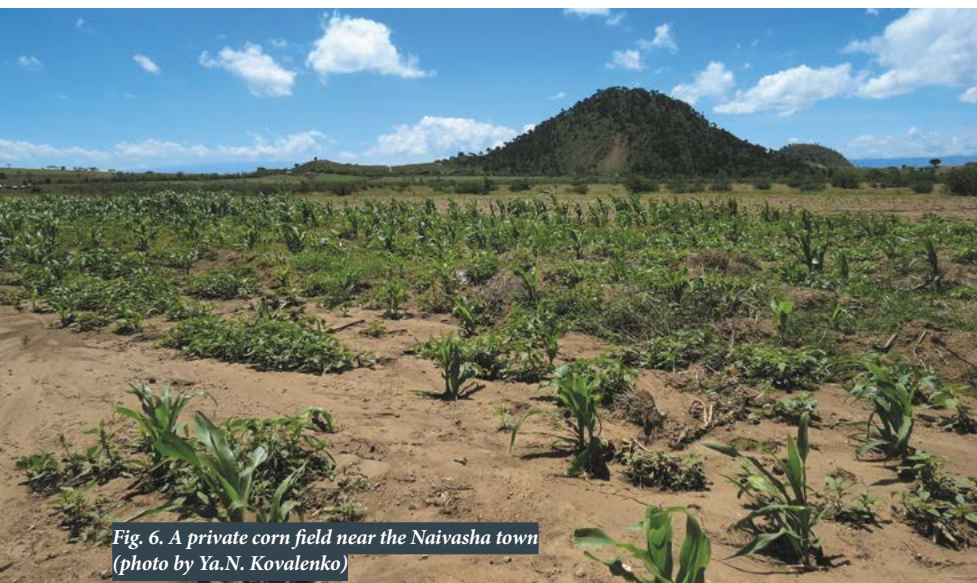


Fig. 6. A private corn field near the Naivasha town
(photo by Ya.N. Kovalenko)

Рис. 6. Частное кукурузное поле в окрестностях города Найваша
(фото Я.Н. Коваленко)

ванные ко включению в Перечень. С целью пополнения научных коллекций ФГБУ «ВНИИКР» материалами, необходимыми для проведения научно-исследовательских работ, разработки методов идентификации карантинных объектов, а также для проведения новых раундов межлабораторных сличительных испытаний на базе ФГБУ «ВНИИКР», в том числе по ранее не затронутым МСИ организмам, в период с 30 апреля по 28 мая 2019 года состоялась энтомологическо-герботологическая научно-исследовательская экспедиция ФГБУ «ВНИИКР» в Республику Кения. В ней приняли участие Я.Н. Коваленко, С.Ю. Муханов и Н.В. Цинкевич.

Материалы и методы

Разработанный участниками маршрут экспедиции затрагивал ос-

новные сельскохозяйственные районы Кении, в первую очередь с учетом посещения локаций, приводимых в научной литературе в качестве мест распространения ряда карантинных объектов и, кроме того, как можно более широкого охвата разнообразных ландшафтно-географических зон страны. Особое внимание было уделено региону на юго-западе Кении, граничащему с озером Виктория, где традиционно выращивается множество сельскохозяйственных культур при относительно низком уровне агротехники (рис. 5); кроме того, с учетом информации, имевшейся у исследовательской группы, были произведены поиски карантинных объектов в многочисленных локациях центра (окрестности городов Найроби, Найваша и др.) (рис. 6) и отчасти юго-востока страны (окрестности города Момбаса и

др.). По отношению к вредителям растений применялись различные методы сбора, включавшие энтомологическое кошение, ручной сбор, лов на искусственные источники света, оконные, феромонные и пищевые ловушки различных модификаций, просеивание субстратов через почвенные и специальные энтомологические сита, отряхивание с растений на белые листы бумаги с последующей фиксацией в спирт (рис. 7) и т.д. Опасные сорняки и близкие к ним виды растений тщательно извлекались из субстрата и гербаризировались с использованием гербарных сеток.

Результаты и их обсуждение

В результате проведенной экспедиции были собраны обширные и разнообразные материалы по различным систематическим и экологическим группам вредителей и опасных сорных растений, существенно пополнившие фонды научных энтомологической и герботологической коллекций ФГБУ «ВНИИКР». Как минимум два карантинных объекта, а именно египетская стрига (*Striga hermonthica* (Delile) Benth.) (рис. 8) и красная померанцевая щитовка (*Aonidiella aurantii* (Maskell, 1879)), были собраны в количестве, достаточном для проведения межлабораторных сличительных испытаний. Кроме того, коллекцию дополнили материалы по следующим карантинным объектам: бразильская бобовая зерновка (*Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833)), арахисовая зерновка (*Caryedon gonagra* (Fabricius, 1838)), несколько видов рода *Callosobruchus* (рис. 9), кукурузная листовая совка (*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)) (рис. 10), представленная большой серией особей из новой, инвазивной части ареала, – африканской; несколько видов повилики (*Cuscuta* sp.) (рис. 11), а также некоторые другие виды (представители отрядов Coleoptera, Hemiptera, Diptera и др.), в настоящее время ожидающие подтверждения идентификации специалистами по определенным систематическим группам насекомых. Помимо насекомых и растений, имеющих для ЕАЭС карантинное значение, во множестве были собраны объекты, морфологически близкие к ряду карантинных организмов, напри-



Fig. 7. Collection of thrips from tomato plants on a white paper sheet. Outskirts of Lake Victoria (photo by Ya.N. Kovalenko)

Рис. 7. Сбор трипсов с растений томатов на белый бумажный лист. Окрестности озера Виктория (фото Я.Н. Коваленко)



Fig. 8. *Striga hermonthica* on suppressed corn plants. Outskirts of Lake Victoria (photo by S.Yu. Mukhanov)

Рис. 8. Езунетская стрига (*Striga hermonthica*) на угнетенных растениях кукурузы. Окрестности озера Виктория (фото С.Ю. Муханова)

мер, некоторые представители семейства Diaspididae (Hemiptera), в числе которых – щитовки рода *Aulacaspis*, морфологически близкие к японской палочковидной щитовке (*Lopholeucaspis japonica* (Cockerell, 1897)), в связи с чем удобно их использование для проведения МСИ в качестве пары к указанному карантинному объекту; ряд представителей семейств Pseudococcidae и Aleyrodidae (Hemiptera), в том числе собранные в массе некарантинные черные белокрылки *Aleurocanthus* sp., которых впоследствии предполагается использовать в качестве пары для проведения МСИ по черной цитрусовой белокрылке (*Aleurocanthus woglumi* Ashby, 1915). Некоторые из собранных в Кении насекомых ранее были рекомендованы к внесению в ЕПКО, например, серьезный вредитель запасов – ложнослоник *Araecerus fasciculatus* (DeGeer, 1775), недавно впервые отмеченный также на территории нашей страны (Коваль и др., 2018). Несомненный научный и практический

интерес представляют сборы некоторых сорных растений, близких к карантинным, например, гербарные образцы не идентифицированного пока паслена (*Solanum* sp.) (рис. 12), морфологически крайне близкого к паслену каролинскому (*S. carolinense* L.), молочая разнолистного (*Euphorbia heterophylla* L.) (рис. 13), близкого к молочаю зубчатому (*E. dentata* Michx.), а также некоторых других.

Заключение

Полевые исследования, проведенные на территории Республики Кения, позволили пополнить коллекционные фонды ФГБУ «ВНИИКР» как рядом карантинных для ЕАЭС объектов, так и богатыми материалами по близким к ним таксонам, и видам, рекомендованным ко внесению в Перечень. Результаты экспедиции вновь подтвердили, что практика научно-исследовательских экспедиций в регионы, являющиеся местами обитания карантинных и других вредоносных объектов, отсутствующих на территории ЕАЭС,

позволяет расширить возможности для новых научных исследований и способствует выходу ФГБУ «ВНИИКР» на новый, более высокий научный уровень.

Литература

1. Коваль А.Г., Макаров К.В., Коротяев Б.А. 2018. О находке многоядного вредителя – кофейного ложнослоника *Araecerus fasciculatus* (DeG.) (Coleoptera, Anthribidae) – в природных условиях разных районов Юга России. Энтомологическое обозрение. Т. 97, вып. 3. С. 564-568.
2. Таможенная статистика внешней торговли. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://stat.customs.ru>.
3. Invasive Species Compendium. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.cabi.org>.
4. EPPO Global Database. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://gd.eppo.int>.
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.fao.org>.

RESEARCH EXPEDITION OF FGBU “VNIKR” to the Republic of Kenya

Ya.N. Kovalenko, PhD in Biology, Senior Researcher of Research and Methodology Department for Entomology of FGBU “VNIKR”

N.V. Tsinkevich, Junior Researcher of the Research and Methodology Department of Crimean Branch of FGBU “VNIKR”

S.Yu. Mukhanov, Researcher of the Department for Interlaboratory Comparison Testing of FGBU “VNIKR”

Abstract. *The article is devoted to the entomological and herbological research expedition of FGBU “VNIKR” to the territory of the Republic of Kenya in May 2019. The characteristics of the agricultural sector in Kenya are briefly considered, and the results of the expedition are also presented.*

Keywords. *Africa, Kenya, fauna, flora, entomology, herbology, pests, weeds, quarantine objects.*

Introduction

The Republic of Kenya is a country located in East Africa, in the north-eastern part of the East African Plateau. Kenya borders on Ethiopia and South Sudan in the north, Uganda in the west, Somalia in the

east and Tanzania in the south. The central part of the East African Plateau in the country is crossed by the Great Rift Valley (Fig. 1), to the west of which there is a fertile plateau, to the east – an upland, which gradually descends to the coast of the Indian Ocean, along which the eastern border of the country stretches. The highest point on the territory of the state, Mount Kenya (5199 m) (Fig. 2), is the second highest point in Africa after Kilimanjaro, part of the bottom of which is also located in Kenya. Another of the continent's highest mountains (7th highest point after Kilimanjaro), Mount Elgon, is also partially located in Kenya; there are also many smaller mountains in the country (partly as well as the

region's giants represented by stratovolcanoes). Such landscape and geographical diversity, due in large part to its altitude, determines the climatic characteristics of certain areas of Kenya and their suitability for use in various sectors of agriculture. The famous Kenyan plateaus, ideal for growing valuable Arabica coffee and tea varieties, are one of the most productive agricultural regions in East Africa (Fig. 3). With a total area of 58,000 ha, Kenya has almost 28,000 ha of agricultural land, covering almost half of the country's territory (FAO, 2019). According to recent data, about a quarter (26%) of Kenya's GDP comes from agriculture, and approximately the same value (27%) – from other sectors of the country's economy that are indirectly related to agriculture. More than 40% of the country's population is engaged in agriculture, which remains the leading sector in the country's economy, with a very heterogeneous structure with many public, parastatal, non-governmental and private economic entities (Fig. 4). The agriculture sector as a whole, both through employment and direct food provision, provides livelihoods for more than 80% of Kenya's population, while agricultural products sold abroad generate about 65% of the country's total export earnings annually (FAO, 2019). The main crops grown in the country are corn, sugar cane, tea, coffee, rice, sorghum, millet, peanuts, cassava, African oil palm, etc. (FAO, 2019). According to the



Рис. 9. Закупка продуктов, зараженных вредителями запасов. Окрестности озера Виктория (фото Я.Н. Коваленко)

Fig. 9. Purchase of products contaminated with pests. Outskirts of Lake Victoria (photo by Ya.N. Kovalenko)

Federal Customs Service (Customs Statistics of Foreign Trade, 2019), Kenya is currently a major exporter of agricultural products to the Russian Federation: for example, in the period 2016-2019 this country supplied more than 81 thousand tons of tea and coffee, almost 21 thousand tons of fresh flowers (including cut flowers), bulbs, rhizomes and seedlings, mainly ornamental crops, almost 18 thousand tons of fruits and nuts, more than 2 thousand tons of tobacco and its derivatives, more than 0.5 thousand tons of vegetable products, and much more. In addition, Kenya is a major importer of Russian grain products: over the same period (2016-2019), the country purchased about 2 million tons of grain from Russia. These data indicate a rather intensive exchange of agricultural products between the two countries. At the same time, according to EPPO Global Database (2019) and CABI (Invasive Species Compendium, 2019), many objects of the Unified List of Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union (EAEU) (about twenty species of insect pests only), as well as insect pests and weeds closely-related to quarantine objects or recommended for inclusion in the list are registered in Kenya. In order to replenish the scientific collections of FGBU "VNIIEK" with materials necessary for research, development of methods for identification of quarantine objects, as well as to conduct new rounds of interlaboratory comparative tests on the basis of FGBU "VNIIEK", including the previously unaffected organisms, in the period from April 30 to May 28, 2019 entomological and herbological research expedition of FGBU "VNIIEK" to the Republic of Kenya took place. Its members were Ya.N. Kovalenko, S.Yu. Mukhanov and N.V. Tsinevich.

Materials and methods

The route developed by the expedition participants covered the main agricultural areas of Kenya, primarily in view of the visits to locations cited in the scientific literature as sites for the distribution of a number of quarantine objects and the widest possible coverage of the country's diverse landscape



Рис. 10. Гусеница кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) на поврежденном растении кукурузы. Окрестности озера Найваша (фото С.Ю. Муханова)

Fig. 10. Caterpillar of *Spodoptera frugiperda* on damaged corn plant. Outskirts of Lake Naivasha (photo by S.Yu. Mukhanov)



Рис. 11. *Cuscuta* sp. паразитирует на *Bougainvillea* sp. Окрестности города Гатунду (фото Н.В. Цинкевича)

Fig. 11. *Cuscuta* sp. parasites on *Bougainvillea* sp. Outskirts of the Gatundu town (photo by N.V. Tsinevich)



Рис. 12. Паслен (*Solanum* sp.), близкий к паслену каролинскому (*S. carolinense* L.). Заповедник Гатамайо (фото Н.В. Цинкевича)

Fig. 12. *Solanum* sp., closely-related to the *S. carolinense* L. Gatamaiyo Forest Nature Reserve (photo by N.V. Tsinevich)



Рис. 13. Молочай разнолистный (*Euphorbia heterophylla* L.) близкий к молочаю зубчатому (*Euphorbia dentata* Michx.). Окрестности города Кутус (фото Н.В. Цинкевича)

Fig. 13. *Euphorbia heterophylla* L. closely-related to *Euphorbia dentata* Michx. Outskirts of the city of Kutus (photo by N.V. Tsinkevich)

and geographical areas. Particular attention was paid to the region of southwest Kenya bordering Lake Victoria, where many crops are traditionally cultivated with relatively low levels of agrotechnology (Fig. 5); in addition, taking into account the information available to the research team, quarantine objects were searched in numerous locations of the centre (Nairobi, Naivasha, etc.) (Fig. 6) and partly in the south-east of the country (Mombasa, etc.). Various collection methods were applied to plant pests, including entomological mowing, manual collection, catching by artificial light sources, window, pheromone and food traps of various modifications, sifting of substrates through soil and special entomological sieves, shaking off from plants on white sheets of paper with subsequent fixation in alcohol (Fig. 7), etc. Dangerous weeds and closely-related plant species were carefully extracted from the substrate and herbarized using herbarial nets.

Results and discussions

As a result of the expedition extensive and diverse materials on various systematic and ecological groups of pests and dangerous weeds were collected, which significantly increased the funds of scientific entomological and herborological collections of FGBU "VNIIEK". At least two quarantine objects, namely the *Striga hermonthica* (Delile) Benth.

(Fig. 8) and *Aonidiella aurantii* (Maskell, 1879) were collected in quantities sufficient for interlaboratory comparative tests. In addition, the following quarantine objects were added to the collection: *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833), *Caryedon gonagra* (Fabricius, 1838), several species of the *Callosobruchus* genus (Fig. 9), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Fig. 10), represented by a large series of species from the new, invasive part of the range – African; several species *Cuscuta* sp. (Fig. 11), as well as some other species (representatives of Coleoptera, Hemiptera, Diptera, etc.), currently awaiting confirmation of identification by specialists in certain systematic insect groups. In addition to insects and plants of quarantine importance for the EAEU, many objects closely-related to a number of quarantine organisms were collected, for example, some members of the Diaspididae (Hemiptera) family. Among them are the scales of the *Aulacaspis* genus, morphologically closely-related to *Lopholeucaspis japonica* (Cockerell, 1897), and therefore it is convenient to use them for conducting interlaboratory comparative tests as a pair to the specified quarantine object; a number of members of the Pseudococcidae and Aleyrodidae (Hemiptera) families, including the non-quarantine blackfly of *Aleurocanthus* sp., which is intended to be used as a pair for conducting in-

terlaboratory comparative tests on a citrus blackfly afterwards (*Aleurocanthus woglumi* Ashby, 1915). Some of the insects collected in Kenya have previously been recommended for inclusion in the Unified List of Quarantine Objects of the Eurasian Economic Union (EAEU), such as the serious stock pest *Araecerus fasciculatus* (DeGeer, 1775), which was also recently recorded in our country for the first time (Koval et al., 2019). Of undoubted scientific and practical interest are the collections of some weeds close to quarantine plants, for example, herbal specimens not yet identified as nightshade (*Solanum* sp.) (Fig. 12), morphologically very close to *S. carolinense* L., *Euphorbia heterophylla* L. (Fig. 13), closely-related to the *E. dentata* Michx., as well as some others.

Conclusion

Field research conducted in the Republic of Kenya allowed to replenish the collection funds of FGBU "VNIIEK" with a number of objects which are quarantine for the EAEU, rich materials on taxa close to them, and species recommended for inclusion in the list. The results of the expedition once again confirmed that the practice of research expeditions to the regions that are habitats of quarantine and other harmful objects that are absent in the territory of the EAEU, allows to expand the opportunities for new research and contributes to moving of FGBU "VNIIEK" to a new, higher scientific level.

References

1. Koval A.G., Makarov K.V., Korotyaev B.A. 2019. On a Finding of the Polyphagous Pest, Coffee Bean Weevil *Araecerus fasciculatus* (DeG.) (Coleoptera, Anthribidae), in Natural Habitats of Different Regions of Southern Russia. Entomological Review, 99 (1): 129-132.
2. Customs statistics foreign trade. [Electronic resource]. – Access mode: <http://stat.customs.ru>.
3. Invasive Species Compendium. [Electronic resource]. – Access mode: <https://www.cabi.org>.
4. EPPO Global Database. [Electronic resource]. – Access mode: <https://gd.eppo.int>.
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Electronic resource]. – Access mode: <http://www.fao.org>.



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



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



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



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

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

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

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

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

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

- Имеет 21 филиал на территории Российской Федерации

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

ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

Журнал «Карантин растений. Наука и практика» приглашает авторов для публикации своих научных работ

Редакция журнала «Карантин растений. Наука и практика» рада предложить Вам возможность публикации Ваших статей на страницах журнала. Наша цель – привлечение внимания к наиболее актуальным проблемам карантина растений специалистов сельского хозяйства и всех заинтересованных в этом людей.

В журнале рассматриваются основные направления развития науки и передового опыта в области карантина и защиты растений, публикуется важная информация о новых методах и средствах, применяемых как в России, так и за рубежом, а также о фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации.

Мы доносим до широкого круга читателей объективную научно-просветительскую и аналитическую информацию: мнения ведущих специалистов по наиболее принципиальным вопросам карантина растений, данные о значимых новейших зарубежных и отечественных исследованиях, материалы тематических конференций.

Редакция журнала «Карантин растений. Наука и практика» приглашает к сотрудничеству как выдающихся деятелей науки, так и молодых ученых, специалистов-практиков, работающих в области фитосанитарии, для обмена опытом, обеспечения устойчивого фитосанитарного благополучия и для новых научных дискуссий.

ЗАДАЧИ ЖУРНАЛА



Изучение основных тенденций развития науки в области карантина растений



Анализ широкого круга передовых технологий в области мониторинга и лабораторных исследований по карантину растений



Обсуждение актуальных вопросов карантина растений

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫМ СТАТЬЯМ

К публикации принимаются статьи на двух языках: русском и английском, содержащие результаты собственных научных исследований, объемом до 10-12 страниц – но не менее 5 (при одинарном интервале и размере шрифта 12). Оптимальный объем статьи: до 20 тыс. знаков (включая пробелы).

СТРУКТУРА ПРЕДОСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ*

1. Название статьи.
2. Имя, отчество, фамилия автора.
3. Место работы автора, должность, ученая степень, адрес электронной почты.
4. Аннотация (краткое точное изложение содержания статьи, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): около 7-8 строк (300-500 знаков с пробелами).
5. Ключевые слова (5-6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи.
6. Материалы и методы.
7. Результаты и обсуждения.
8. Выводы и заключение.
9. Список литературы (т. е. список всей использованной литературы, ссылки на которую даются в самом тексте статьи): правила составления – ГОСТ Р 7.05-2008.
10. Иллюстративные материалы (фотографии, рисунки) допускаются хорошей контрастности, с разрешением не ниже 300 точек на дюйм (300 dpi), оригиналы прикладываются к статье отдельными файлами в формате tiff или jpeg (иллюстрации, не соответствующие требованиям, будут исключены из статей, поскольку достойное их воспроизведение типографским способом невозможно).
11. Рецензия на статью (доктор наук) и решение экспертной комиссии учреждения.

**В таком же порядке и структуре предоставляется англоязычный перевод статьи.*

Работа должна быть предоставлена в редакторе WORD, формат DOC, шрифт Times New Roman, размер шрифта – 12, межстрочный интервал – одинарный, размер полей по 2 см, отступ в начале абзаца 1 см, форматирование по ширине. Рисунки, таблицы, схемы, графики и пр. должны быть обязательно пронумерованы, иметь источники, размеры рисунка в см не больше размеров печатного поля страницы. Название таблицы – над таблицей; название рисунка/графика – под рисунком/графиком.

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

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

Контактное лицо: Зиновьева Светлана Георгиевна

Телефон: +7 499 707 22 27