



2014 ГОД – 10 ЛЕТ РОССЕЛЬХОЗНАДЗОРУ

КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

НАУКА И ПРАКТИКА

НОЯБРЬ
4 | 10 | 2014

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ ЖУРНАЛ

**НОВОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ
ПЛОДОВОЙ МУХИ НА ТЕРРИТОРИИ РФ** стр. 4

**АНТРАКНОЗ
COLLETOTRICHUM ACUTATUM SIMMONDS —
ОПАСНОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ ЗЕМЛЯНИКИ** стр. 24

**МЕЖДУНАРОДНЫЙ ОПЫТ
РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРОТОКОЛОВ** стр. 36

**NEW REPORT
OF THE MEDITERRANEAN FRUIT FLY IN RUSSIA** page 5

**ANTHRACNOSE
COLLETOTRICHUM ACUTATUM SIMMONDS
IS A DANGEROUS DISEASE OF STRAWBERRY** page 30

**INTERNATIONAL APPROACHES
TO DEVELOPMENT AND APPLICATION OF DIAGNOSTIC PROTOCOLS** page 43

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL

PLANT HEALTH

RESEARCH AND PRACTICE

NOVEMBER
4 | 10 | 2014

«КАРАНТИН РАСТЕНИЙ. НАУКА И ПРАКТИКА»

ДВУЯЗЫЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ №4 (10) 2014 Г.

Главный редактор:

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

Шеф-редактор:

Светлана Зиновьева, помощник директора ФГБУ «ВНИИКР» по связям с общественностью и СМИ

Выпускающие редакторы:

Ольга Лесных, Юлия Трофимова, Юлиана Бададгулова, Анастасия Константинова
e-mail: karantin.r@yandex.ru

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

Саурин А.И. — заместитель
Руководителя Россельхознадзора

Исаев А.А. — начальник
Управления фитосанитарного
надзора и качества зерна

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

Долженко В.И. — академик
РАН, заместитель директора
Всероссийского НИИ
защиты растений

Надыкта В.Д. — академик РАН,
директор Всероссийского НИИ
биологической защиты растений

Павлюшин В.А. — академик РАН,
директор Всероссийского НИИ
защиты растений

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

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

Типография: ООО «Юнион Принт»,
603022, Нижегородская область, г. Нижний Новгород, Окский Съезд, д. 2, тел.: 8 (831) 439-44-99
Тираж 2000 экземпляров. Бесплатно.

Санин С.С. — академик РАН,
директор Всероссийского НИИ
фитопатологии

Мартин Уорд —
Генеральный директор ЕОКЗР

Рингольдс Арнитис —
Президент ЕОКЗР

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

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

Сорока С.В. — директор РУП
«Институт защиты растений»
НАН Республики Беларусь

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

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

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

Шероколава Н.А. — заместитель
директора ФГБУ «ВНИИКР»,
вице-президент ЕОКЗР

РЕДАКЦИЯ:

Волкова Е.М. — заведующая
лабораторией сорных растений

Волков О.Г. — начальник
научно-методического отдела
энтомологии

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

Приходько Ю.Н. — начальник
научно-методического отдела
фитопатологии

Скрипка О.В. — заведующая
лабораторией микологии

Дренова О.Н. — начальник
отдела по международным
связям и вопросам ВТО
(переводчик)

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

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

Дизайн и верстка:
Мария Поваляева

Корректор:
Татьяна Артемьева

**Менеджер по подписке
и дистрибуции:**
Игорь Алпатов
+7 (925) 357 20 61

СОДЕРЖАНИЕ CONTENT

I. НОВОСТИ

*Д.Г. Касаткин, заведующий лабораторией
Ростовского филиала ФГБУ «ВНИИКР»
С.В. Поушкова, агроном 2 кат.
Ростовского филиала ФГБУ «ВНИИКР»*

Новое обнаружение средиземноморской плодовой мухи
на территории РФ

I. NEWS

*D.G. Kasatkin, Chief of Laboratory at FGBU VNIKR's Rostov Branch
S.V. Poushkova, Agronomist at FGBU VNIKR's Rostov Branch*
New Report of the Mediterranean Fruit Fly in Russia

4 5

*Д.Г. Касаткин, заведующий лабораторией
Ростовского филиала ФГБУ «ВНИИКР»
Энтомологическая экспедиция в Иран — Азербайджан*

Энтомологическая экспедиция в Иран — Азербайджан

*D.G. Kasatkin, Chief of Laboratory at
FGBU VNIKR's Rostov Branch*
Entomological Expedition to Iran and Azerbaijan

6 8

II. НАУЧНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ КАРАНТИНА РАСТЕНИЙ

*Е.В. Каримова, младший научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»
Анализ фитосанитарного риска. Трудности существующей схемы
(стандарт РМ 5/3 (5))*

10 12

*С.А. Курбатов, начальник энтомологического музея ФГБУ «ВНИИКР»
Я.Н. Коваленко, научный сотрудник
энтомологического музея ФГБУ «ВНИИКР»
Комплекс андийских картофельных долгоносиков
и его современное понимание*

14 19

*О.В. Скрипка, заведующая лабораторией микологии ФГБУ «ВНИИКР»
И.П. Дудченко, старший научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»
М.Б. Копина, старший научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»
С.В. Никифоров, младший научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»
Антракноз *Colletotrichum acutatum* Simmonds —
опасное заболевание земляники*

24 30

*О.Н. Дренова, начальник отдела по международным связям и вопросам
ВТО ФГБУ «ВНИИКР»
Международный опыт разработки и применения
диагностических протоколов*

36 43

*Е.С. Мазурин, заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР»
И.О. Камаев, начальник
научно-экспериментального отдела ФГБУ «ВНИИКР»
М.Г. Кабдулова, научный сотрудник
научно-экспериментального отдела ФГБУ «ВНИИКР»
М.Б. Копина, старший научный сотрудник
лаборатории микологии ИЭЦ ФГБУ «ВНИИКР»
Г.Н. Матяшова, младший научный сотрудник
научно-экспериментального отдела ФГБУ «ВНИИКР»*

Исследование условий подготовки и хранения образцов
для проведения межлабораторных сличительных испытаний
по выявлению и идентификации возбудителя бурой
бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum*

48 54

II. RESEARCH STUDIES IN PLANT QUARANTINE

Elena V. Karimova, FGBU VNIKR's Junior Researcher
Pest Risk Analysis — Difficulties of the Existing Scheme
(Standard PM 5/3 (5))

*Sergey A. Kurbatov, Head of FGBU VNIKR's Entomological Museum
Yakov N. Kovalenko, Researcher of FGBU VNIKR's
Entomological Museum*
Andean Potato Weevil Complex
and its Current Interpretation

*Olga V. Skripka, Chief of FGBU VNIKR's Mycology Laboratory
Irina P. Dudchenko, FGBU VNIKR's Senior Researcher
Maria B. Kopina, FGBU VNIKR's Senior Researcher
Sergey V. Nikiforov, FGBU VNIKR's Junior Researcher*
Anthracnose *Colletotrichum acutatum* Simmonds
is a Dangerous Disease of Strawberry

*Aksana Drenova, Head of FGBU VNIKR's International
and WTO-related Issues Department*
International Approaches to Development and Application
of Diagnostic Protocols

*Evgeny S. Mazurin, FGBU VNIKR's Deputy Director
Ilya O. Kamaev, Head of FGBU VNIKR's
Research and Testing Department
Margarita G. Kabdulova, Researcher at FGBU VNIKR's
Research and Testing Department
Maria B. Kopina, Senior Researcher at FGBU VNIKR's
Mycology Laboratory
Galina N. Matyashova, Junior Researcher FGBU VNIKR's
Research and Testing Department*
Study on Sample Preparation and Storage
for Interlaboratory Comparisons
for Detection and Identification of *Ralstonia solanacearum*
Causing the Potato Brown Rot

Новое обнаружение СРЕДИЗЕМНОМОРСКОЙ ПЛОДОВОЙ МУХИ на территории РФ

Д.Г. Касаткин, заведующий лабораторией Ростовского филиала ФГБУ «ВНИИКР»

С.В. Поушкова, агроном 2 кат. Ростовского филиала ФГБУ «ВНИИКР»



Fig. 1. An adult male of the Mediterranean fruit fly

Рис. 1. Имаго самца средиземноморской плодовой мухи

Средиземноморская плодовая муха (*Ceratitis capitata* Wied.) — карантинный вредный организм, который включался еще в самые первые перечни КВО СССР. На территории РФ средиземноморская плодовая муха является ограничено распространенным видом. Первые очаги средиземноморской плодовой мухи в Российской Федерации были выявлены в 1994 г. в районе г. Краснодара, в г. Новороссийске, а затем, в 2009–2010 гг., в г. Анапе. На настоящее время карантинная фитосанитарная зона установлена только в г. Анапе.

Ранее на территории Ростовской области вредитель отмечался только при досмотре импортной плодовой продукции в портах. Осенью 2014 г. средиземноморская плодовая муха была обнаружена на приусадебном участке в г. Ростове-на-Дону. Проведенное обследование участка выявило, что повреждались плоды таких культур, как персик и груша. Были собраны зараженные личинками плоды, кроме того, на выставленную



Fig. 2. An adult female of the Mediterranean fruit fly

Рис. 2. Имаго самки средиземноморской плодовой мухи

феромонную ловушку был отловлен один самец *C. capitata*.

В сильно загнивших в результате повреждений плодах вместе с личинками *Ceratitis capitata* отмечалось значительное количество личинок дрозофил, которые хорошо отличимы от личинок средиземноморской плодовой мухи строением дыхалец и меньшими размерами. Также отмечено совместное со средиземноморской плодовой мухой повреждение плодов персика гусеницами плодовой мухи. Численность личинок

Рис. 3. Голова самца средиземноморской плодовой мухи



Fig. 3. The head of a Mediterranean fruit fly male

Ceratitis capitata колебалась от 8 до 15 шт. на один плод. Собранные личинки старшего возраста в течение 2–3 дней окуклились и были помещены в термостат. Инкубация проводилась при температуре 29 °С, и через 8–10 дней произошел вылет имаго.

Управлением Россельхознадзора по Ростовской и Волгоградской областям и Республике Калмыкия вынесен приказ об установлении карантинной фитосанитарной зоны на территории соответствующих районов города, а также разработан план мероприятий по локализации и ликвидации очага согласно СТО ВНИИКР 2.023-2011. На следующий год запланировано проведение обследовательских мероприятий, включая как визуальное обследование, так и выставление феромонных ловушек. Данный мониторинг должен позволить уточнить территорию заражения, прояснить некоторые аспекты биологии вредителя в условиях Ростовской области (заражаемые культуры, количество поколений и возможность перезимовки) и установить, является ли очаг постоянным или носит временный характер.

NEW REPORT OF THE MEDITERRANEAN FRUIT FLY IN RUSSIA

D.G. Kasatkin, Chief of Laboratory at FGBU VNIKR's Rostov Branch

S.V. Poushkova, Agronomist at FGBU VNIKR's Rostov Branch

The Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata* Wied.) is a quarantine pest that was listed even in the earliest quarantine pest lists of the USSR. The pest is of limited distribution in the Russian Federation. First outbreaks of the Mediterranean fruit fly in the Russian Federation were recorded in 1994 in the vicinities of the cities of Krasnodar, Novorossiysk, and later, in 2009–2010, in the vicinity of Anapa. So far, the quarantine area has been established only in Anapa.

In Rostov Region, the pest was previously intercepted only during inspections of imported fruits at the ports. In the fall of 2014, the Mediterranean fruit fly was detected in a residential yard in Rostov-on-Don. The survey revealed that such fruit crops as peaches and pears had been damaged. The fruits infested with larvae were collected. Moreover, a male of *C. capitata* was captured on a pheromone trap.

In fruits significantly rotten due to *C. capitata* infestation, a large number of *Drosophila* larvae were also observed. These are easily distinguished from those of the Mediterranean fruit fly by the spiracle structure and smaller size.

Рис. 4. Личинка средиземноморской плодовой мухи



Fig. 4. Larva of the Mediterranean fruit fly

Damage caused simultaneously by the Mediterranean fruit fly and larvae of fruit moths to peach fruits was also detected. The number of *C. capitata* larvae ranged from 8 to 15 larvae per fruit. The collected final instars pupated within 2–3 days and were placed in an incubator. Incubation was carried out at 29 °С, and in 8–10 days the emergence of adults occurred.

The Territorial Office of Ros-selkhoz-nadzor for Rostov and Volgograd Regions and the Republic of Kalmykia issued an order to establish the quarantine area in the respective parts of the city, and develop an action plan

to contain and eradicate the outbreaks according to VNIKR technical Standard 2.023–2011.

Monitoring activities through surveys including visual examinations and deployment of pheromone traps are planned for the next year. The monitoring should specify the infested area and clarify certain aspects of the pest biology under the conditions of Rostov Region (crops affected, number of generations and the possibility of over-wintering) as well as to determine whether the outbreak is permanent or temporary.

Рис. 5. Пулпации средиземноморской плодовой мухи



Fig. 5. Puparia of the Mediterranean fruit fly

ЭНТОМОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПЕДИЦИЯ В ИРАН — АЗЕРБАЙДЖАН

Д.Г. Касаткин, заведующий лабораторией Ростовского филиала ФГБУ «ВНИИКР»

В период с 17 мая по 13 июня 2014 года заведующий лабораторией Ростовского филиала ФГБУ «ВНИИКР» Д.Г. Касаткин принял участие в энтомологической экспедиции совместно с сотрудниками Южного научного центра РАН и Института Зоологии НАН Азербайджана. Цель экспедиции состояла в изучении энтомофауны Азербайджана и Исламской Республики Иран и сборе коллекционного материала по различным группам насекомых.

Иран является очень интересной с точки зрения энтомологических исследований территорией, как в отношении изучения энтомофауны Ближнего Востока (систематики, биологии и распространения насекомых), так и в фитосанитарном отношении. Страна имеет разнообразные ландшафты и климатические условия, богатые флору и фауну, занимая переходное положение между Центральной Азией и Восточным Средиземноморьем. Разнообразные природные условия позволяют выращивать весьма широкий спектр сельскохозяйственных культур, главным ограничением при этом является нехватка воды и недостаточное развитие орошения. Основными выращиваемыми в Иране культурами являются пшеница, рис, бобовые, ячмень, хлопчатник, орехи, финики, чай. В прикаспийском регионе, отличающемся мягким климатом и высокой влажностью, развито овощеводство и садоводство.

Вместе с тем Иран является недостаточно изученной территорией, чему способствовало и нарушение международных связей в течение нескольких десятилетий. Отсутствие серьезных контактов с западными научными центрами не могло не сказаться как на уровне разви-



Fig. 1. Expedition route

Рис. 1. Маршрут экспедиции



Fig. 2. Agricultural landscape near the border between Iran and Turkey, West Azerbaijan Province

Рис. 2. Агротландшафт близ ирано-турецкой границы, провинция Зап. Азербайджан

тия местной энтомологии (имеются крупные специалисты лишь по нескольким группам насекомых), так и на изученности энтомофауны в целом. Учитывая высокую вероятность увеличения объемов поставок иранской сельхозпродукции на российский рынок, изучение энтомофауны и фитосанитарного состояния этой страны является важной задачей. Азербайджан, через который пролегал маршрут экспедиции, кроме того, что имеет общую с РФ границу, является достаточно заметным поставщиком сельхозпродукции на российский рынок и значение изучения энтомофауны этой страны в дополнительном обосновании не нуждается.

Маршрут экспедиции включал ряд районов центрального и южного Азербайджана, северо-западного и северо-восточного Ирана. Энтомологические сборы осуществлялись в Гобустанском, Шемахинском, Ленкоранском и Хызынском районах Азербайджана, в ботаническом саду НАН Азербайджана (г. Баку), провинциях Мазандаран, Гилан и Западный Азербайджан Ирана. Иран показал себя довольно удобной для экспедиционной деятельности страной. Это связано в первую очередь с невысокими ценами на питание и жилье, высоким уровнем безопасности для путешественника, комфортабельным и недорогим общественным транспортом, хорошо развитой дорожной сетью, очень благожелательным отношением к гражданам РФ. К сложностям следует отнести незначительный процент населения, владеющий европейскими языками, малое количество надписей и указателей, выполненных на английском языке, а также серьезную зависимость от источников питьевой воды на большей части территории страны при автономном путешествии.

Несмотря на сложные погодные условия, сложившиеся на Ближнем Востоке и в Закавказье весной 2014 г., из-за чего произошел серьезный фенологический сдвиг развития растительного покрова и лета многих видов насекомых, в результате экспедиции был собран интересный энтомологический материал по жесткокрылым, трипсам, Coccidae, двукрылым, перепончатокрылым и чешуекрылым — около 2500 эк-

земпляров. Были получены новые данные по распространению и трофическим связям ряда редких и малоизученных видов жуков-дровосеков, таких как *Eurycoptosis bodoani*, *Agapanthia hirsuticornis*, *Phytoecia* cf. *prasina*, впервые сфотографированы их кормовые растения, биотопы, сделаны снимки этих видов в естественной среде обитания. Также впервые для Ирана было собрано три вида Cleridae, два ранее не отмечавшихся для Ирана вида трипсов, найдено два вида жуков-чернотелок, известных ранее только по типовым экземплярам. В провинции Западный Азербайджан был собран, вероятно, новый таксон жуков-дровосеков. В провинции Гилан (29–30 мая) и в Ленкоранском районе Азербайджана (7–8 июня) отмечен лет самцов непарного шелкопряда на светоловушку. При этом самок этого вида обнаружено не было. Одновременно с имаго в Ленкоранском рай-

оне встречались гусеницы старших возрастов. Был собран материал для генетических исследований в ФГБУ «ВНИИКР» по непарному шелкопряду (гусеницы и имаго). При обработке материала по трипсам, собранного в Баку и его окрестностях, два экземпляра были идентифицированы как *Frankliniella occidentalis*. Особи данного вида были собраны в открытом грунте на растениях огурца. *F. occidentalis* является карантинным для РФ видом и, согласно базе данных ЕОКЗР, не представлен в фауне Азербайджана.

Собранный в ходе экспедиции энтомологический материал частично передан на обработку специалистам по разным группам насекомых, а также в научно-методический отдел и в музей ФГБУ «ВНИИКР» для определения и пополнения справочной коллекции. Наиболее важные сведения, полученные в ходе экспедиции, будут опубликованы, планируется дальнейшее изучение иранской энтомофауны.

Рис. 3. Растения повилики (*Cuscuta* sp.), провинция Гилан



Fig. 3. Dodder plants (*Cuscuta* sp.), Gilan Province

ENTOMOLOGICAL EXPEDITION TO IRAN AND AZERBAIJAN

D.G. Kasatkin, Chief of Laboratory at FGBU VNIKR's Rostov Branch



Рис. 4. Агроценозы вокруг Рудбара, провинция Гилан

Fig. 4. Farming ecosystems around Rudbar, Gilan Province

Between May 17 and June 13 2014, D.G. Kasatkin, chief of Laboratory at FGBU VNIKR's Rostov branch took part in an entomological expedition together with a group of specialists from the Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences and the Zoology Institute of the Azerbaijani National Academy of Sciences. The aim of the expedition was to study entomofauna in Azerbaijan and the Islamic Republic of Iran and to amass a collection of various insect groups.

Iran is a very interesting area for entomological studies with regard to entomofauna of the Middle East (taxonomy, biology and spread of insects) and phytosanitary issues. The country's landscape and climate vary, flora and

fauna are rich, and location is transitional — in-between Central Asia and the Eastern Mediterranean. Varying natural conditions enable to grow a rather wide range of agricultural crops, lack of water and underdeveloped irrigation being the substantial limiting factor. Iran's major crops include wheat, rice, legumes, barley, cotton, dates, and tea. Vegetable and fruit growing is developed in the Caspian region notable for its mild climate and high humidity.

Along with that, Iran is understudied because of, among other things, several decades of severed international ties. Absence of regular contacts with western research centers has impacted both the development of the local entomology (qualified experts are available only

in a few groups of insects) and the state of knowledge on entomofauna, in general. Taking into account the substantial likelihood of increased supplies of Iranian agricultural products to the Russian market, it is important to study the country's entomofauna and phytosanitary condition. The expedition route ran through Azerbaijan. Not only does the country share a common border with Russia, it is a fairly distinguishable supplier of agricultural products to Russia, which obliterates the need to provide additional rationale for studying the entomofauna of the country.

The expedition covered a number of regions in central and southern Azer-



Рис. 5. Жук-усач *Eurycoptasia bodoani* Pic., Иран, провинция Зап. Азербайджан

Fig. 5. *Eurycoptasia bodoani* Pic., Iran, West Azerbaijan Province

baijan, north-western and north-eastern Iran. Insects were collected in Gobustan, Shamakhi, Lankaran and Khyzy regions of Azerbaijan, in the botanical garden of the Azerbaijani National Academy of Sciences (Baku), and in Iran's provinces: Mazandaran, Gilan and West Azerbaijan. Iran proved to be very convenient for expedition activities, in the first place, owing to low food and accommodation costs, high level of safety for travelers, convenient and inexpensive public transport, a well-developed road network, and a very amiable attitude to Russian citizens. The difficulties were comprised of a negligible percentage of the population speaking European languages, paucity of signs and signposts in English, and strong

dependency on drinking water springs in most areas of the country if travelling autonomously.

The severe spring weather of 2014 in the Middle East and Transcaucasus evoked a considerable phenologic shift in the development of vegetative cover and the flight of many insect species. Notwithstanding this fact, the expedition collected interesting entomological material of Coleoptera, Thripidae, Coccidae, Diptera, Hymenoptera and Lepidoptera — about 2,500 specimens. New data was gathered on the spread and food chains of rare and understudied Cerambycidae species, for instance, *Eurycoptasia bodoani*, *Agapanthia hir-*

suticornis, *Phytoecia* cf. *prasina*. First photographs of these species in their natural habitat, their host plants and biotope were taken. Furthermore, for the first time three Cleridae species and two Thripidae spp. previously unknown to occur in Iran were found. Moreover, two species of darkling beetles previously known only by holotypes were discovered. A new taxon of longhorned beetles is likely to have been collected in West Azerbaijan Province. Gypsy moth males were captured on the light trap in Iran's Gilan Province (May 29–30) and Azerbaijan's Lankaran region. No females of this species were found. In Lankaran region, both imagoes and late instar gypsy moths were encountered. Gypsy moth imagoes and larvae were collected for genetic studies at FGBU VNIKR. Upon examining thrips collected in Baku and its vicinity, two specimens were identified as *Frankliniella occidentalis*. They were found on cucumber plants under unprotected conditions. *F. occidentalis* is of quarantine concern for the Russian Federation. According to the EPPO database, it is not present in Azerbaijan's fauna.

Some collected specimens were sent to specialists on various insect groups for identification. FGBU VNIKR's Museum and Entomology Methods Development Department have also received the collected insects for identification and replenishment of the reference collection. The most important expedition results will be published. Iranian entomofauna is to be further studied.

Fig. 6. Process of collecting insects, Shamakhi region, Azerbaijan



Рис. 6. Сбор материала, Шемахинский р-н, Азербайджан

АНАЛИЗ ФИТОСАНИТАРНОГО РИСКА. ТРУДНОСТИ СУЩЕСТВУЮЩЕЙ СХЕМЫ

(стандарт РМ 5/3 (5))

Е.В. Каримова, младший научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»

Увеличение объемов международной торговли растительными продуктами, саженцами и растениями увеличивает риск интродукции вредных организмов на территорию импортирующих стран.

Согласно Соглашению о санитарных и фитосанитарных мерах ВТО (СФС) и Международной конвенции по карантину и защите растений ФАО (МККЗР) статус вредного организма, а также меры, принимаемые НОКЗР для защиты от данных организмов, устанавливаются в процессе анализа фитосанитарного риска (АФР) [1, 2].

Анализ фитосанитарного риска — это процесс оценки биологических или других научных и экономических данных с целью определения того, является ли организм вредным организмом, должен ли регулироваться и какова должна быть жесткость фитосанитарных мер, принимаемых против него [4].

Фитосанитарные меры, определяемые на стадии оценки управления фитосанитарным риском, являются элементами правил по карантину растений, а документированные результаты АФР служат их техническим обоснованием. Меры, которые не были технически обоснованы, могут рассматриваться как неоправданные барьеры в торговле. Страны-экспортеры имеют право в соответствии с СФС и МККЗР опротестовывать технически необоснованные фитосанитарные меры стран-импортеров.

Таким образом, на основе вышесказанного, АФР является средством научного и технического обоснования фитосанитарных мер, принимаемых в отношении вредных организмов или импортируемых товаров.



Иными словами, АФР можно назвать основой для всей деятельности по карантину растений. Страны-члены МККЗР и ВТО должны основывать свои фитосанитарные меры на международных стандартах, разработанных МККЗР.

Международными стандартами, связанными с АФР, являются: МСФМ № 2 «Структура анализа фитосанитарного риска», МСФМ № 11 «Анализ фитосанитарного риска для карантинных вредных организмов, включая анализ риска для окружающей среды, и риска, представляемого живыми модифицированными организмами», МСФМ № 14 «Использование интегрированных мер в системном подходе к управлению фитосанитарным риском», МСФМ № 21 «Анализ фитосанитарного риска для регулируемых некарантинных вредных организмов» [3, 5, 6, 7]. Данные стандарты разъясняют общие принципы проведения АФР, который состоит из следующих основных этапов: инициирование (подготовительный), оценка фитосанитарного риска, оценка управления фитосанитарным риском и документирование результатов.

Схемой АФР, утвержденной РОКЗР, соответствующей международ-

Экспертная рабочая группа по АФР (автор Muriel Suffert)

Expert working group for PRA (by Muriel Suffert)

ным стандартам и основанной на МСФМ № 11, является стандарт РМ 5/3 (5): «Руководство по анализу фитосанитарного риска: схема принятия решения для карантинных вредных организмов». Стандарт РМ 5/3 (5) содержит схему, основанную на следующих друг за другом вопросах для принятия решения о том, имеет ли организм характеристики карантинного вредного организма и для определения возможных способов управления риском. Схема может быть использована для проведения АФР, инициированного выявлением пути распространения или новой ситуации с вредным организмом, а также пересмотром или изменением политики. Данный стандарт был разработан в Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР) и утвержден в сентябре 2011 г.

В рамках проекта PRATIQUE на базе стандарта РМ 5/3 экспертами ЕОКЗР была разработана компьютерная программа CAPRA (Computer

Assisted Pest Risk Analysis) для оказания помощи специалистам в работе со схемой принятия решений по АФР. Программное обеспечение CAPRA построено из независимых модулей, соответствующих различным разделам схемы АФР. В программе представлены все вопросы схемы, при этом большинство вопросов снабжено примерами и руководствами, которые помогают специалистам правильно ответить на вопросы.

CAPRA не относится к числу статичных программ. В 2012 г. она была переведена на русский язык. Русскоязычную версию компьютерной программы CAPRA, а также руководство пользователя можно скачать бесплатно, пройдя по ссылке <http://capra.eppo.org/download.php>.

Согласно замечаниям и предложениям, поступившим от специалистов ФГБУ «ВНИИКР», которые проводят АФР по стандарту РМ 5/3 (5), программа совершенствовалась, были внесены изменения в формулировки вопросов, добавлены руководства

Страны-члены МККЗР и ВТО должны основывать свои фитосанитарные меры на международных стандартах, разработанных МККЗР.

и примеры на русском языке. Данные изменения и комментарии необходимы для улучшения и развития АФР, а также для облегчения процесса его проведения.

В 2011 г. Исполнительный комитет ЕОКЗР принял решение, что процесс развития АФР на некоторое время должен быть приостановлен, для того чтобы сосредоточиться на применении ранее разработанных инструментов АФР. Также было решено, что необходимо провести пересмотр схемы ЕОКЗР для АФР через три года после ее принятия, а именно в 2014 г., определить будущее данной схемы. За это время рабочими группами ЕОКЗР было выполнено девять АФР в соответствии со стандартом РМ 5/3 (5).

Для того чтобы провести АФР и правильно ответить на вопросы схемы, экспертная рабочая группа должна состоять из нескольких специалистов разного профиля и специальностей: экспертов по рассматриваемому вредному организму и растениям-хозяевам, экспертов по схеме АФР и по картированию, экс-

перта по ликвидации и локализации очагов, аналитиков риска и экономиста (см. рисунок).

Специалистами ФГБУ «ВНИИКР» с 2012 года было выполнено 5 АФР согласно РМ 5/3 (5) для следующих вредных организмов:

- *Monochamus carolinensis*;
- *Naupactus leucoloma*;
- *Margarodes vitis*;
- *Chalara fraxinea*;
- *Acidovorax citrulli*.

Все это позволило получить определенный опыт в использовании данной схемы.

Для получения отзывов, комментариев, совершенствования, а также определения дальнейшего пути развития схемы и перспективы разработки новой схемы АФР Секретариатом ЕОКЗР было организовано заседание экспертов, которые проводят АФР по стандарту РМ 5/3 (5). В ходе заседания были выявлены основные трудности, с которыми сталкиваются специалисты в процессе проведения АФР по данной схеме.

Был проведен SWOT-анализ, позволяющий определить сильные и слабые стороны, возможности и негативные последствия, связанные со схемой АФР по стандарту РМ 5/3 (5). Результаты анализа можно представить в следующем виде:

Сильные стороны:

- Схема АФР по стандарту РМ 5/3 (5) основана на Международном стандарте по фитосанитарным мерам № 11;

- Имеет структурированный поэтапный подход к рассмотрению всех факторов;

- Частично соответствует схеме АФР EFSA (пересмотренная версия стандарта РМ 5/3 была принята в 2011 году, руководство по АФР EFSA принято в 2010 году и не пересматривалось);

- Дает указания по регулированию вредного организма.

Слабые стороны:

- Длина схемы и время, необходимое на проведение АФР, являются основным препятствием для использования схемы (схема используется

только в особых случаях, при таких как внесение изменений в законодательство ЕС, с возможным влиянием на торговлю и др.);

- На некоторые вопросы схемы зачастую трудно ответить;

- Не все вопросы схемы являются значимыми;

- Отсутствие руководства по рейтингу вероятности и неопределенности в некоторых разделах схемы (например, проникновение).

Возможности:

- Организация исследования (изучения) схемы АФР на национальном уровне;

- На основании опыта использования существующей схемы АФР основные эксперты считают, что есть возможности для упрощения схемы;

- Упрощенная схема АФР, возможно, будет более активно использоваться НОКЗР и другими организациями;

- Проведение дальнейшей гармонизации между региональным руководством по АФР.

Негативные последствия:

- Использование длинной и сложной схемы ограничивает количество вредных организмов, по которым может быть проведен АФР. Следовательно, вредные организмы, которые необходимо регулировать, не могут быть вовремя оценены и к ним не могут применяться фитосанитарные меры.

Слабые стороны и негативные последствия, выявленные в ходе SWOT-анализа, позволили определить будущее схемы АФР. Необходимо внести изменения в существующую схему АФР, основанную на стандарте РМ 5/3 (5) для ее упрощения. После внесения изменений в разделы, вызывающие трудности, существующая схема будет более активно использоваться НОКЗР и ее сотрудниками, которые проводят АФР. Следовательно, вредные организмы, которые необходимо регулировать, будут вовремя оценены и к ним могут быть применены фитосанитарные меры.

Литература

1. Соглашение по применению санитарных и фитосанитарных мер ВТО, 1994.

2. Международная конвенция по карантину и защите растений, 1997. ФАО, Рим.

3. Структура анализа фитосанитарного риска, 2007, МСФМ № 2, ФАО, Рим.

4. Глоссарий фитосанитарных терминов, 2007, МСФМ № 5, ФАО, Рим.

5. Анализ фитосанитарного риска для карантинных вредных организмов, включая анализ риска для окружающей среды и риска, представляе-

мого живыми модифицированными организмами, 2004. МСФМ № 11, ФАО, Рим.

6. Использование интегрированных мер в системном подходе к управлению фитосанитарным риском, 2002, МСФМ № 14, ФАО, Рим.

7. Анализ фитосанитарного риска для регулируемых некарантинных

вредных организмов, 2004, МСФМ № 21, ФАО, Рим.

8. Стандарт по фитосанитарным мерам РМ 5/3 (5) Руководство по анализу фитосанитарного риска: схема принятия решения для карантинных вредных организмов. 2011, ЕОКЗР, Париж.

PEST RISK ANALYSIS — DIFFICULTIES OF THE EXISTING SCHEME (Standard PM 5/3 (5))

Elena V. Karimova, FGBU VNIKR's Junior Researcher

Increased international trade in plant products, seedlings and plants further enhance the risk of introducing harmful organisms into importing countries.

Under the WTO Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary (SPS) Measures and the International Plant Protection Convention (IPPC), both pest status and measures to be taken by an NPPO to provide protection against a specific pest are determined through Pest Risk Analysis (PRA) [1, 2].

Pest Risk Analysis is a process of evaluating biological or other scientific and economic evidence to determine whether an organism is a pest, whether it should be regulated, and the strength of any phytosanitary measures to be taken against it [4].

Phytosanitary measures identified at the pest risk management stage are the components of plant quarantine regulations while documented PRA results provide their technical justification. Phytosanitary measures that lack technical justification may be regarded as unjustified barriers to trade. Under the IPPC and SPS, exporting countries are entitled to lodge a complaint against im-

porting countries that apply technically unjustified phytosanitary measures.

Thus, in view of the above said, PRA is a means of scientific and technical justification of phytosanitary measures applied to imported goods or against harmful organisms. *Videlicet*, PRA may be defined as the basis for all plant quarantine activities. The IPPC and WTO Member-countries should establish their phytosanitary measures based on the International Standards developed by the IPPC.

The International Standards related to PRA are ISPM 2 *Framework for pest risk analysis*, ISPM 11 *Pest risk analysis for quarantine pests including analysis of environmental risks and living modified organisms*, ISPM 14 *The use of integrated measures in a systems approach for pest risk management*, ISPM 21 *Pest risk analysis for regulated non quarantine pests* [3, 5, 6, 7]. These standards present general principles of conducting PRA which consists of the following main stages: initiation, pest risk assessment, pest risk management and documentation of pest risk analysis.

PM 5/3 (5) *Guidelines on pest risk analysis: Decision-support scheme for*

The IPPC and WTO Member-countries should establish their phytosanitary measures based on the International Standards developed by the IPPC.

quarantine pests is a PRA scheme approved by an RPPO. This standard was developed by the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) and adopted in September 2011. It presents a series of successive questions to determine whether a pest qualifies as a quarantine pest and to identify appropriate pest risk management options. It is based on ISPM 11 and consistent with the relevant international standards.

PM 5/3 (5) is applicable to PRA initiated by the identification of a pathway or a pest, or the review or revision of a policy

As part of the PRATIQUE project, EPPO experts developed the CAPRA software (Computer Assisted Pest Risk

Analysis) based on PM 5/3 to assist specialists in using the decision-support scheme for PRA. CAPRA comprises independent modules corresponding to various sections of the PRA scheme. It includes all questions given in the scheme. Furthermore, guidance and examples are provided for most questions to facilitate experts in choosing the most suitable option from those given.

CAPRA is not static software. In 2012, CAPRA was translated into Russian. The Russian version is available for free download at <http://capra.eppo.org/download.php>.

Comments and suggestions made by FGBU VNIKR's specialists using PM 5/3 (5) to perform PRA contributed to the improvement of the program, i.e. changes were made to the wording of the questions and guidance and examples in Russian were added. Comments and changes are necessary to further improve and develop PRA, as well as to facilitate its implementation.

In 2011, the EPPO Executive Committee decided to briefly suspend the PRA development process to focus on the use of previously developed PRA tools. The Committee also agreed to review the scheme in three years after its adoption, namely in 2014, to identify its further application. In this period, experts have conducted nine PRAs following PM 5/3 (5).

In order to conduct the PRA and correctly answer the questions of the scheme, an expert working group should consist of a number of experts in different fields and on various subjects, i.e. the pest concerned and its host plants, the PRA scheme and mapping, outbreak containment and eradication, risk analysis and economics (see Figure).

Since 2012, FGBU VNIKR's specialists conducted five PRAs following PM 5/3 (5):

- *Monochamus carolinensis*;
- *Naupactus leucoloma*;
- *Margarodes vitis*;
- *Chalara fraxinea*;
- *Acidovorax citrulli*.

This enabled to gain experience in applying the scheme.

To get feedback and further improve the existing scheme and options as well as to determine the prospects for developing a new PRA scheme, the EPPO Secretariat organized a meeting of experts following PM 5/3 (5) when conducting PRAs. The participants identified the main challenges encountered

by PRA experts when working with the scheme. Also, SWOT-analysis was conducted to identify advantages and disadvantages as well as undesirable consequences associated with the scheme. The results of the analysis are as follows:

Advantages:

- The scheme is based on the International Standard for Phytosanitary Measures № 11;
- The scheme applies a structured step-by-step approach to considering all given factors;
- To a certain extent, the scheme corresponds to the EFSA Environmental Risk Assessment scheme (revised PM 5/3 was adopted in 2011; the EFSA scheme was adopted in 2010 and has not yet been revised);
- The scheme provides guidance on pest regulation.

Disadvantages:

- The major factor hindering the use of the scheme is that it contains a plethora of questions and is very time-consuming (the scheme is used in particular instances, e.g. when making amendments to the EU legislation that might affect trade, etc.);
- Certain questions of the scheme are often difficult to answer;
- Some of the questions are irrelevant;
- The scheme lacks guidance on ratings of likelihood and uncertainty in certain sections (for instance, for entry).

Options:

- Performing the evaluation of the PRA scheme on the national level;
- Based on users' experience, the key experts concluded that the scheme might be simplified;
- A simplified scheme might be more readily used by NPPOs and other organizations;
- Further harmonization of the regional guidelines on PRA.

Undesirable consequences:

The complexity and ponderosity of the scheme limits the capacity to perform PRAs which consequently hinders timely risk assessment and application of phytosanitary measures.

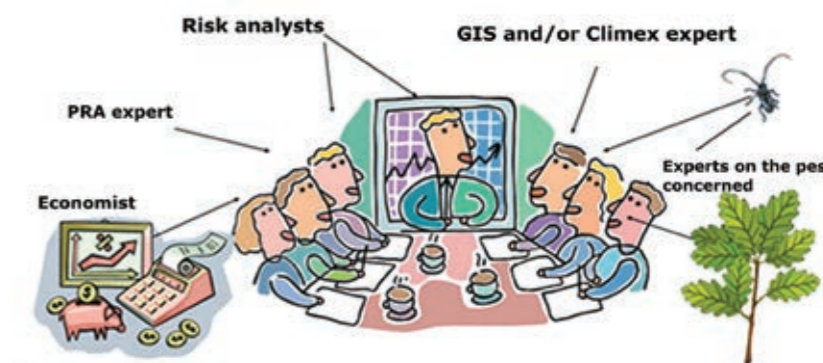
Advantages and disadvantages as well as undesirable consequences identified through the SWOT-analysis allowed to determine the future of the PRA scheme. The existing PRA scheme needs to be modified. The modification of the most arduous sections will result in more active employment of the scheme by NPPOs and their PRA experts. Thus, risks posed by harmful organisms that are to be regulated will be timely assessed and appropriate phytosanitary measures will be applied.

References

1. Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary. WTO, 1994.
2. International Plant Protection Convention. FAO, Rome, 1997.
3. ISPM 2. *Framework for pest risk analysis*. FAO, Rome, 2007.
4. ISPM 5. *Glossary of phytosanitary terms*. FAO, Rome, 2007.
5. ISPM 11. *Pest risk analysis for quarantine pests including analysis of environmental risks and living modified organisms*. FAO, Rome, 2004.
6. ISPM 14. *The Use of integrated measures in a systems approach for pest risk management*. FAO, Rome, 2002.
7. ISPM 21. *Pest risk analysis for regulated non-quarantine pests*. FAO, Rome, 2004.
8. PM 5/3 (5). *Guidelines on Pest Risk Analysis. Decision-support scheme for quarantine pests*. EPPO, Paris, 2011.

Expert working group for PRA (by Muriel Suffert)

Экспертная рабочая группа по АФР (автор Muriel Suffert)



КОМПЛЕКС АНДИЙСКИХ КАРТОФЕЛЬНЫХ ДОЛГОНОСИКОВ и его современное понимание

С.А. Курбатов, начальник энтомологического музея ФГБУ «ВНИИКР»

Я.Н. Коваленко, научный сотрудник энтомологического музея ФГБУ «ВНИИКР»

Андийские картофельные долгоносики (АКД) являются важнейшими вредителями картофеля в зоне его естественного произрастания и культивирования в высокогорьях Анд. Нередки случаи, когда АКД уничтожают до 100% урожая картофеля. Местные фермеры называют жуков “gorgojo de los Andes”, а их личинок — “gusano blanco de la papa”. Три вида из рода *Premnotrypes* (*latithorax*, *suturicallus* и *vorax*) включены в карантинный перечень ЕОКЗР, а в Российской Федерации этот род целиком внесен в национальный перечень карантинных организмов. Именно представители рода *Premnotrypes* традиционно ассоциируются в нашей стране с понятием «андийские картофельные долгоносики». Однако в мировой литературе это понятие трактуется несколько более широко. Считается, что это совокупность тех видов андийских долгоносиков, которые способны проходить весь цикл своего развития исключительно на картофеле и при этом давать жизнеспособное потомство. Таким образом, помимо представителей рода *Premnotrypes* в комплекс АКД (в англоязычной литературе — APW Complex: Andean potato weevil Complex) входят также виды из родов *Rhigopsidius* и *Phyrdenus*. Необходимо уточнить, что все эти три рода объединены в единый комплекс лишь на основании их пищевой специализации, в то время как в таксономическом смысле они не являются близкими родственниками и принадлежат к трем разным подсемействам долгоносиков. Рассмотрим

Именно представители рода *Premnotrypes* традиционно ассоциируются в нашей стране с понятием «андийские картофельные долгоносики».

по порядку всех представителей этого комплекса.

Род *Premnotrypes* Pierce, 1914 (подсемейство Entiminae, триба Premnotrypini) в настоящее время включает в свой состав 12 видов, распространенных в Андах от Венесуэлы до севера Чили (см. таблицу и рис. 1).

Некоторые виды первоначально были описаны в составе других родов: *Trypopermnon* Pierce, 1914

(*latithorax* и *sanfordi*), *Solanophagus* Hustache, 1933 (*vorax*) и *Plastoleptops* Heller, 1935 (*solanivorax*). Впоследствии (Kuschel, 1956) все эти рода были сведены в синонимы к *Premnotrypes*.

Картофельные долгоносики рода *Premnotrypes* — коренастые темноокрашенные жуки длиной 4–10 мм. Головотрубка короткая, не более чем в два раза длиннее ширины и значительно короче переднеспинки. Глаза

Таблица. Видовой состав и распространение долгоносиков рода *Premnotrypes*

Название вида	Распространение
<i>Premnotrypes solani</i> Pierce, 1914	Перу
<i>P. latithorax</i> (Pierce, 1914)	Боливия, Перу, Чили
<i>P. sanfordi</i> (Pierce, 1918)	Перу
<i>P. vorax</i> (Hustache, 1933)	Венесуэла, Колумбия, Перу, Эквадор
<i>P. solanivorax</i> (Heller, 1935)	Перу
<i>P. fractirostris</i> Marshall, 1936	Перу
<i>P. clivosus</i> Kuschel, 1956	Боливия
<i>P. pusillus</i> Kuschel, 1956	Перу
<i>P. solaniperda</i> Kuschel, 1956	Боливия, Перу
<i>P. suturicallus</i> Kuschel, 1956	Перу
<i>P. zischkai</i> Kuschel, 1956	Боливия
<i>P. piercei</i> Alcalá, 1979	Перу



Рис. 1. Различные виды андийских картофельных долгоносиков рода *Premnotrypes*: *P. latithorax* (слева); *P. solaniperda* (в центре); *P. vorax* (справа) (www.padil.gov.au)

Fig. 1. Various species of the Andean potato weevils of the genus *Premnotrypes* *P. latithorax* (on the left); *P. solaniperda* (in the middle); *P. vorax* (on the right) (www.padil.gov.au)

крупные, состоят не менее чем из 80 фасеток, усики коленчатые, с удлинённым первым члеником. На переднем крае переднегруди имеются развитые заглазничные лопасти. Скульптура надкрыльев (а нередко и переднеспинки) обычно грубая, представлена бугорками различной степени развития, причем расположение и форма бугорков имеют диагностическое значение при идентификации видов. Крылья недоразвиты или полностью отсутствуют, жуки неспособны к полету. Лапки 5-члениковые, но кажутся 4-члени-

Жуки рода *Premnotrypes* обитают в высокогорьях от 2100 до 4500 м.

ковыми, так как их четвертый членик чрезвычайно мал и незаметен. Чаще всего покровы живых жуков загрязнены почвой, что хорошо маскирует этих насекомых в агроценозе. Всем видам рода свойствен половой диморфизм: самки обычно крупнее самцов, вершина 5-го стернита заостренная у самок, тупая у самцов, и, кроме того, скат надкрыльев гораздо четче выражен у самок по сравнению с самцами. Более детальные сведения по морфологии рода приведены у Kuschel [21].

Наибольшее разнообразие рода (10 видов) отмечается в перуанских Андах, 4 вида встречаются в Боливии; на этом основании Alcazar и Cisneros [3] считают этот район центром происхождения рода. С другой стороны, в Венесуэле единственный вид рода (*P. vorax*) впервые был зарегистрирован лишь в 1964 году [6] тогда как в соседней Колумбии он известен по крайней мере с 1925 года [34]. В связи с этим Kühne [20] выдвинул предположение о завозе этого вида в Венесуэлу с посевным картофелем. То же самое, вероятно, относится и к виду *P. suturicallus*, который был отмечен в Коста-Рике [17].

Жуки рода *Premnotrypes* обитают в высокогорьях от 2100 до 4500 м. Климатические условия на таких высотах могут быть довольно суровыми. Так, в горах северной Аргентины выше 3000 м (где встречается *Premnotrypes piercei*) средняя летняя температура не достигает и 14 °С, а зимой температура держится ниже 4 °С [1].

Основным кормовым растением, на котором долгоносики этого рода проходят полный цикл развития и дают фертильное потомство, является картофель. Однако взрослые жуки, проходя дополнительное питание, могут повреждать множество других культурных и дикорастущих растений из различных системати-

ческих групп, далеких друг от друга. К таким растениям относятся, например, овес посевной (*Avena sativa*), бобы (*Vicia faba*), паслен черный (*Solanum nigrum*), кислица клубненосная (*Oxalis tuberosa*), капуста полевая (*Brassica campestris*), редька посевная (*Raphanus sativus*), одуванчик (*Taraxacum officinale*), череда волосистая (*Bidens pilosa*), клевер ползучий (*Trifolium repens*), бархатцы (*Tagetes minuta*), щавель (*Rumex* spp.) и многие другие. При этом в литературе имеются сообщения о том, что отдельные виды *Premnotrypes* способны проходить в своем развитии полный цикл за счет других растений (*P. latithorax* — на настурции клубненосной, капусте полевой и аистнике обыкновенном, а *P. solaniperda* — на крестовнике, ковыле ичу и также на аистнике), однако тестирование в лаборатории показало, что личинки не выживают ни на каких других растениях, кроме собственно картофеля [32].

Биологические особенности детально изучались у видов *P. latithorax* [11, 13, 30 и др.], *P. vorax* [9, 25 и др.], *P. suturicallus* [2 и др.], *P. piercei* [12] и *P. solaniperda* [19] и оказались довольно сходными. Взрослые жуки днем прячутся среди частиц почвы, под камнями, растительными остатками или в других подходящих укрытиях, а вечером переходят к активности, питаются на растениях и спариваясь. Самки откладывают яйца в растительные остатки около растений картофеля. Отродившиеся личинки углубляются в почву и внедряются в клубни, которыми



Fig. 2. *Premnotrypes* larvae on the surface of a potato tuber (www.cipotato.org)

Рис. 2. Личинки *Premnotrypes* на поверхности клубня картофеля (www.cipotato.org)

они питаются (рис. 2, 3). В своем развитии личинки обычно проходят 4 возраста (пять у *P. vorax*). По окончании развития личинки выходят из клубня и на глубине 10–30 см превращаются в куколку внутри специально сделанной из частиц почвы куколочной колыбельки. Значительное большинство личинок покидает клубни до сбора урожая, но все же небольшая их часть может транспортироваться вместе с клубнями на новые места и таким образом способствовать распространению вредителя. Молодые жуки выходят на поверхность с началом периода дождей. Общая продолжительность цикла развития нескольких видов изучена Alcazar и Cisneros (1999) и составляет в условиях Перу около 434 дней для *P. suturicallus*, 463 дня для *P. vorax* и 549 дней для *P. piercei*, при этом самцы последнего вида живут до 280 дней. Опыты с *P. vorax* и *P. suturicallus* показали, что в отсутствие пищи имаго могут выживать до 4,5 месяцев [2, 10]. В местах естественного распространения вредителей повреждение картофеля молодыми личинками начинается с середины марта и продолжается как минимум до конца апреля. Стадия куколки приходится на май-октябрь. Выход жуков из почвы проходит

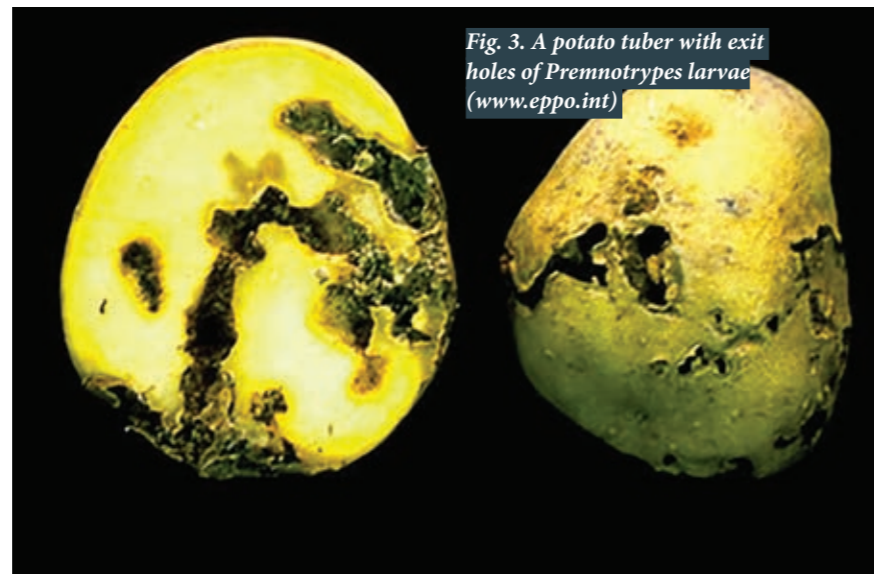


Fig. 3. A potato tuber with exit holes of *Premnotrypes* larvae (www.eppo.int)

Рис. 3. Клубень картофеля с ходами личинок *Premnotrypes* (www.eppo.int)

с конца октября до конца февраля. Таким образом, именно в феврале на полях наблюдается наибольшая численность имаго.

Естественных врагов у *Premnotrypes* немного. Действительно эффективными хищниками считаются лишь муравьи из рода *Iridomirmex* [18]. Что касается паразитов, то показательным является тот факт, что Alcazar и Cisneros [3] в течение многих лет собирали десятки тысяч личинок долгоносиков, изучая их зараженность. За весь период наблюдений не было отмечено ни одного экземпляра паразитов!

Вредоносность андийских долгоносиков очень велика. Даже при си-

стематических обработках инсектицидами личинки повреждают и приводят в негодность до 45% клубней картофеля, а в случае отсутствия обработок ущерб может достигать 100%, что часто заставляет фермеров забрасывать свои поля [27]. В Колумбии фермеры ежегодно тратят около 22 млн долларов на химическую борьбу с долгоносиком; это составляет 90% от стоимости всех инсектицидных обработок на картофеле в стране [31]. Взрослые жуки также могут приносить существенный вред, поедая листья. Zenner и Posada [34] показали, что 5 жуков могут полностью уничтожить молодое растение картофеля в течение трех дней, а Durán [15] определил, что 1 жук в течение своей жизни в среднем съедает около 10 см² листовой поверхности (рис. 4). Arestegui [7] наблюдал, как высокая численность долгоносиков приводила к полной дефолиации молодых растений картофеля.

Интересно отметить, что плотность популяции андийских долгоносиков практически всегда существенно (часто в 20–30 раз) выше по краям полей, чем в их середине. Это связано с тем, что нелетающие жуки мигрируют на новые поля извне и таким образом в первую очередь заселяют растения, которые расположены ближе к краю [28 и др.].

Наиболее эффективными средствами борьбы с долгоносиками являются механические и агротех-

нические методы. Часто новые, еще не зараженные поля огораживают сплошным пластиковым барьером, что служит непреодолимым препятствием для нелетающих жуков (рис. 5, 6). Соблюдение севооборота и разнесение полей картофеля на расстояние более 1 км друг от друга также резко снижают численность долгоносиков, так как миграционные способности вредителя невелики; эксперименты в Боливии с *P. latithorax* и *P. solaniperda* показали, что в поисках новых полей картофеля жуки могут самостоятельно мигрировать не дальше, чем на 300 м, развивая скорость 0,6 м/ч [14].

Род *Rhigopsidius* Heller, 1906 (подсемейство Rhytirrhiniinae, триба Rhytirrhiniini) состоит из двух видов: *R. tucumanus* Heller, 1906 и *R. piercei* Heller, 1936 (рис. 7). Эти два вида, распространенные в Боливии, южном Перу и северо-западной Аргентине, являются единственными американскими представителем трибы Rhytirrhiniini, которая дает большое разнообразие форм в Старом Свете.

Жуки рода *Rhigopsidius* имеют темно-коричневую окраску, ячеистую структуру покровов и размеры от 6,5 до 10 мм. Чешуйки, покрывающие тело, снабжены на основании длинным и тонким выростом. Глаза крупные, примерно треугольной формы, головотрубка не более чем в 1,5 раза длиннее ширины, короче переднеспинки, усики колеччатые, с удлиненным первым члеником,

Рис. 4. Повреждения листьев картофеля имаго *Premnotrypes suturicallus* Kuschel (www.forestryimages.org)



Fig. 4. Potato leaves damaged by adult *Premnotrypes suturicallus* Kuschel (www.forestryimages.org)

усиковые бороздки глубокие, направлены в сторону глаз; мандибулы асимметричные, с двумя щетинками. Переднеспинка бугорчатая, с развитыми заглазничными лопастями, на диске с раздваивающимся у основания килем. Надкрылья с небольшими бугорками на четных промежутках и с тремя крупными бугорками на скате. Крылья атрофированы, жуки неспособны к полету.

Rhigopsidius обитают в несколько более засушливых условиях по сравнению с *Premnotrypes* и занимают меньший ареал, не распространяясь

В Колумбии фермеры ежегодно тратят около 22 млн долларов на химическую борьбу с долгоносиком; это составляет 90% от стоимости всех инсектицидных обработок на картофеле в стране [31].

на север дальше крайнего юга Перу. Образ жизни и пищевая специализация в целом сходны с таковыми у *Premnotrypes*. Важное отличие состоит в том, что личинки *Rhigopsidius* не покидают клубни, а окукливаются внутри них. Поскольку клубень с находящейся в нем личинкой или куколкой долгоносика внешне ничем не отличается от незараженного клубня, то этот вредитель имеет повышенные возможности заноса на новые территории.

Обычно цифры экономического ущерба, приводимые в литературе, касаются деятельности всего комплекса андийских картофельных долгоносиков, поэтому из них до-

вольно трудно вычленить «вклад» *Rhigopsidius*. Тем не менее Vigiana и Serrano [33, цитата из 20] указывают, что для семенного картофеля экономически неприемлемым считается превышения уровня зараженности в 2 личинки на 1 кг клубней.

Род *Phyrdenus* LeConte, 1876 (подсемейство Cryptorhynchinae, триба Cryptorhynchini) включает около 20 видов, распространенных исключительно в Новом Свете [5]. В состав комплекса АКД входит только один представитель этого рода — *Ph. muriceus* (Germar, 1824).

Этот вид распространен от Аргентины до Мексики и юго-восточных штатов США и везде, где встречается, является серьезным вредителем культурных растений из рода *Solanum* [22, 23].

Долгоносики *Ph. muriceus* — не крупные (самцы — от 4,3 до 5,2 мм, самки — от 5,4 до 6,3 мм) коренастые жуки серой или коричневой окраски. Неровная, покрытая бугорками, бороздками и чешуйками поверхность переднеспинки и надкрыльев этих долгоносиков (рис. 8) способствует налипанию частичек почвы, что хорошо маскирует жуков, как и в случае с другими представителями комплекса АКД. Головотрубка у *Phyrdenus* в отличие от *Premnotrypes* и *Rhigopsidius* довольно длинная, однако общий план строения, неровный, покрытый корочкой земли верх тела — все это делает всех андийских картофельных долгоносиков внешне довольно похожими друг на друга. Однако *Ph. muriceus* является единственным представителем комплекса, имеющим хорошо развитые крылья и сохранившим, таким образом, способность к полету [3].

Согласно исследованиям Edelman и Walter [16] жизненный цикл *Ph. muriceus* в целом очень схож с таковым видов рода *Premnotrypes*. Однако в отличие от всех остальных андийских долгоносиков этот вид, помимо картофеля, может развиваться и на других культурах, вклю-

чая томаты и баклажаны. В этом случае личинки питаются не клубнями, а корнями растений; взрослые жуки помимо листьев и стеблей повреждают корневую шейку, что в итоге приводит к слому и гибели даже внешне здоровых растений. Вред, причиняемый культуре томатов, зачастую настолько велик, что иногда этого вредителя называют «томатным долгоносиком» (gorgojo del tomate). Во многих регионах Нового Света именно *Ph. muriceus* считается главным вредителем картофеля, томатов и баклажанов [8, 26, 29].

Итак, после рассмотрения всех представителей комплекса андийских картофельных долгоносиков можно констатировать, что *Phyrdenus muriceus* и виды рода *Rhigopsidius* при сравнении с представителями рода *Premnotrypes* обладают более высокими расселительными возможностями: *Phyrdenus* — благодаря способности имаго к активному полету, а *Rhigopsidius* — в связи с увеличенной продолжительностью скрытого развития (так как их личинки не покидают клубень, а окукливаются внутри). Кроме того, *Phyrdenus muriceus* помимо картофеля может также развиваться на томатах и баклажанах. Поэтому, по всей видимости, представители этих двух родов могут представлять для нашей страны не меньшую, а возможно даже большую фитосанитарную опасность, чем представители рода *Premnotrypes*.

Литература

1. Agostini de Manero (1993) Distribution and degree of infestation of *Rhigopsidius piercei* Heller (Coleoptera: Curculionidae) in Jujuy province, Argentina. — Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 52 (1–4): 29–35.
2. Alcázar J. (1976) Biología y comportamiento del “gorgojo de los Andes” *Premnotrypes suturicallus* Kuschel (Coleoptera: Curculionidae). — Thesis of the Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo, Peru. 108p.
3. Alcázar J. and F. Cisneros (1999) Taxonomy and bionomics of the Andean potato weevil complex: *Premnotrypes* spp. And related genera. — In: Impact on a changing world: Program report 1997–98. C. Arthur, P. Ferguson and B. Smith (eds.). Lima, International Potato Center: pp. 141–151.
4. Alcázar J. and J. Kroschel (2009) Plastic barriers control Andean potato

weevils (*Premnotrypes* spp.): Large-scale testing of efficacy, economic and ecological evaluation and farmers’ perception. — 15th Triennial of the Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, 2–6 November 2009.

5. Alonso-Zarazaga M.A. and C.H.C. Lyal (1999) A world catalogue of families and genera of Curculionioidea (Insecta: Coleoptera) (excepting Scolytidae and Platypodidae). Entomopraxis, Barcelona. 315 pp.

6. Angeles N.J. (1966) Presencia del “Gorgojo de la papa”, *Premnotrypes vorax* (Hustache (Curculionidae-Coleoptera)) en la región Andina de Venezuela. — Agronomía Tropical, 16 (4): 295–298.

7. Arestegui P.A. (1976) Plagas de la papa en Andahuaylas-Apurímac. — Revista Peruana de Entomología, 19 (1): 97–98.

8. Argerich C. and L. Troilo (eds.) (2010) Buenas prácticas agrícolas en la cadena de tomate. Buenos Aires (AR): FAO, INTA. 258 p.

9. Calvache G.H. (1986) Aspectos biológicos y ecológicos del gusano blanco. — Memorias del curso sobre el control integrado de plagas de la papa. International Potato Center and Instituto Colombiano Agropecuario. Bogota, Colombia, p. 18–24.

10. Calvache G.H. and L.F. Alvarado (1980) El gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache) y su control. — Pasto, Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) — Centro Regional de Investigaciones “Obonuco”: 34.

11. Carbajal C.P. (1992) Biología, fluctuación de población y control del gorgojo de los Andes *Premnotrypes latithorax* en la localidad de Aguirre. — Thesis of the Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia. 105 p.

12. Carhuamaca J. and A. Tovar (1987) Estudio del ciclo biológico de *Premnotrypes piercei* Alcalá. — Proceedings XXX Convención Nacional de Entomología held in Cajamarca, Perú. Entomological Society of Peru. Lima, Peru.

13. Carrasco Z.F. (1961) Sistemática y biología del gorgojo de los Andes *Premnotrypes latithorax* Pierce 1914 (Coleopt.: Curculionidae). — Revista Peruana de Entomología Agrícola, 4 (1): 30–42.

14. Chaves A.C.R. (1997) Actividad migratoria y daño del Gorgojo (*Premnotrypes* spp.) en dos comunidades altiplánicas del departamento de La Paz. —

Thesis of the Universidad Técnica de Oruro, Bolivia, 118 pp.

15. Durán A.J. (2001) Determinación de plantas cultivadas y no cultivadas como hospedantes de *Premnotrypes latithorax* (Pierce) en el distrito de Chinchero. — Proceedings of the Manejo integrado de plagas de los principales cultivos andinos. Memoria del seminario taller nacional y regional. Valle Sagrado de los Incas. June, 20–22 and October 21–23 2001. Urubamba – Cusco (Peru), ARARIWA. pp. 29–31.

16. Edelstein J.D. and S. Walter (2014) Manejo integrado de plagas (MIP) del gorgojo *Phyrdenus muriceus* en papa. — Cartilla Digital Manfredi, 5: 1–6.

17. EPPO (2011) Data Sheets on Quarantine Pests: *Premnotrypes* spp. (Andean). — https://www.eppo.int/QUARANTINE/insects/Premnotrypes_latithorax/PREMSP_ds.pdf.

18. Garmendia A. (1961) Observaciones sobre un posible control biológico de la gusanera de la papa depositada en almacén. — Revista Peruana de Entomología Agrícola, 4 (1): 76–77.

19. Gil A.P. (1991) Biología y comportamiento de *Premnotrypes solaniperda* Kuschel (Coleoptera: Curculionidae). — Thesis of the Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Peru. 72 p.

20. Kühne M. (2007) The Andean potato weevil *Premnotrypes suturicallus*. Ecology and interactions with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. — Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen. Göttingen, 178 p.

21. Kuschel G. (1956) Revisión de los Premnotrypini y adiciones a los Bagoiini (Aporte 17 sobre Coleoptera Curculionioidea). — Boletín Museo Nacional de Historia Natural, Chile, 26: 187–235.

22. Maes J.-M. and Ch.W. O’Brien (1990) Lista anotada de los Curculionioidea (Coleoptera) de Nicaragua. — Revista Nicaraguense de entomología, 12: 1–78.

23. Morrone J.J. (2014) Biodiversidad de Curculionioidea (Coleoptera) en México. — Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl. 85: 312–324.

24. Morrone J.J. and M.S. Loiacono (1992) Revision of the genus *Rhigopsidius* Heller (Insecta, Coleoptera, Curculionidae, Rhytirrhininae). — Entomologische Abhandlungen, 54 (7): 129–139.

25. Muñoz M. and J. Alcázar (1998) Biología y comportamiento del gorgojo

de los Andes *Premnotrypes vorax*. — Resúmenes del XL Convención Nacional Entomología del Perú, Nov. 1998. Lima, Perú.

26. Novo R.J., Viglianco A. and E. Vaudagna (2002) Efectos de insecticidas sobre el gorgojo de la papa, *Phyrdenus muriceus* (Germ.) (Coleoptera: Curculionidae). Agriscientia (AR), 19 (1): 3–10.

27. Ortiz O., Alcázar J., Catalán W., Villano W., Cerna V., Fano H. and T.S. Walker (1996) Economic impact of IPM practices on the Andean potato weevil in Peru. In: Case studies of the economic impact of CIP-related technology. T.S. Walker and C.C. Crissman (eds.). Lima, International Potato Center, pp. 95–110.

28. Ravines N.L.A. (2002) Dinámica poblacional del gorgojo de los Andes *Premnotrypes vorax*. — Thesis of the Universidad Nacional de Cajamarca, Peru. 56 pp.

29. Saini E.D. and L. Alvarado (2006) Insectos y ácaros perjudiciales a los cultivos de tomate y pimiento y sus enemigos naturales. Castelar, Buenos Aires (AR): INTA — IMYZA. 1, 68 p.

30. Tisoc I. (1989) Ciclo biológico de *Premnotrypes latithorax* bajo condiciones de laboratorio en el Cusco. — Revista Peruana de Entomología Agrícola, 32: 89–92.

31. Trillos G.O., Valencia L., Pineda R.C. and R.B. Martínez (1993) Evaluación de híbridos de *Solanum polyadenium* Grenm. for white worm resistance

of potatoes (*Premnotrypes vorax* Hustache). — Agronomía Colombiana, 10 (2): 128–131.

32. Vera A., Alcázar J., Cisneros F., and W. Catalán (1994) Evaluación de la susceptibilidad de los principales tubérculos Andinos al gorgojo de los Andes. — Resúmenes XXXVI Convención Nacional de Entomología. Iquitos, Peru.

33. Vigiana A. and M. Serrano (2001) Manejo integrado de plagas en papa. — Unpublished Manuscript, Universidad Nacional de Jujuy (Argentina): 24 pp.

34. Zenner I. and L.O. Posada (1968) Generalidades sobre el gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache). — Agricultura tropical, 24 (1): 33–40.

ANDEAN POTATO WEEVIL Complex and its Current Interpretation

Sergey A. Kurbatov, Head of FGBU VNIKR's Entomological Museum

Yakov N. Kovalenko, Researcher of FGBU VNIKR's Entomological Museum

Andean Potato Weevils (APWs) are the most important potato pests in the potato growing and cultivating areas of the Andean highlands. It is not uncommon for these pests to destroy up to 100 % of potato harvests. Local farmers refer to the weevils as “gorgojo de los Andes”, and to their larvae as “gusano blanco de la papa”. Three *Premnotrypes* species (*latithorax*, *suturicallus* and *vorax*) are on the EPPO A1 List of pests recommended for regulation as quarantine pests. Russia’s List of quarantine pests includes all species of the genus *Premnotrypes*. In Russia, it is *Premnotrypes* spp. that are traditionally associated with the term “Andean potato weevils”. However, in international publications, the term has a wider implication. The term is applied to the weevil species able to go through the entire development cycle exclusively in potato and

produce viable progeny. Thus, along with *Premnotrypes* spp., the Andean potato weevil complex (as referred to in English-language literature) also includes species of the genera *Rhigopsidius* and *Phyrdenus*. It should be clarified that these three genera are regarded as a single complex based solely on their food preference. Taxonomically, however, they are not closely related and belong to three distinct weevil subfamilies. Let us have a look at each representative of the complex.

Genus *Premnotrypes* Pierce, 1914 (subfamily Entiminae, tribe Premnotrypini) now includes 12 species occurring in the Andes from Venezuela to the northern Chile (see Table and Fig. 1).

Some of these species were originally described as belonging to other genera — *Trypopermo* Pierce, 1914 (*latithorax* and *sanfordi*), *Solanophagus* Hus-

Russia’s List of quarantine pests includes all species of the genus Premnotrypes.

tache, 1933 (*vorax*) and *Plastoleptops* Heller, 1935 (*solanivorax*). Subsequently (Kuschel, 1956), all of these genera were recognized as synonyms for the genus *Premnotrypes*.

Premnotrypes spp. are dark-colored stout weevils about 4–8 mm long. The rostrum is short with the length only about twice the width and significantly shorter than the pronotum. Eyes are large with more than 80 facets. Antennae are geniculate with an elongated scape. Prothorax is with well-developed postorbital lobes. The sculpturing of the elytra (and often that of pronotum) is usually rough with knobs of varying

Table. Species composition and distribution of the genus *Premnotrypes* weevils

Name	Distribution
<i>Premnotrypes solani</i> Pierce, 1914	Peru
<i>P. latithorax</i> (Pierce, 1914)	Bolivia, Peru, Chile
<i>P. sanfordi</i> (Pierce, 1918)	Peru
<i>P. vorax</i> (Hustache, 1933)	Venezuela, Colombia, Peru, Ecuador
<i>P. solanivorax</i> (Heller, 1935)	Peru
<i>P. fractirostris</i> Marshall, 1936	Peru
<i>P. clivosus</i> Kuschel, 1956	Bolivia
<i>P. pusillus</i> Kuschel, 1956	Peru
<i>P. solaniperda</i> Kuschel, 1956	Bolivia, Peru
<i>P. suturicallus</i> Kuschel, 1956	Peru
<i>P. zischkai</i> Kuschel, 1956	Bolivia
<i>P. piercei</i> Alcalá, 1979	Peru

degrees of development. The position and form of the knobs are diagnostic features for species identification. Wings are either lacking or underdeveloped. The pests are not able to fly. The tarsi have five tarsomeres, but appear to have only four due to the small size of the fourth tarsomere.

The pest integuments often become contaminated with soil which serves as camouflage in agrocenoses. All species are characterized by sexual dimorphism: females are usually larger than males. The apex of the 5th sternite is blunt in males, pointed in females. Moreover, the elytra are strongly declivous in females, less declivous in males. More detailed information on the species morphology is given by Kuschel (1956).

The greatest number of the species of this genus (10) is observed in the Peruvian Andes; four species occur in Bolivia. Based on this data, Alcazar and Cisneros (1999) believe that this area is the center of the species origin. On the other hand, in Venezuela, the only species of the genus — *P. vorax*, was for the first time recorded only in 1964 (Angel, 1966), while in neighboring Colombia, it is known to occur at least since 1925 (Zenner and Posada, 1968). In this regard, Kühne (2007) put forward an assumption that this species had been introduced in Venezuela with seed potatoes. The same probably holds true to *P. suturicallus* which was recorded in Costa Rica (EPPO, 2011).

Weevils of the genus *Premnotrypes* inhabit highlands at an altitude of 2,100

Weevils of the genus *Premnotrypes* inhabit highlands at an altitude of 2,100 to 4,500 meters.

to 4,500 meters. The climatic conditions at these altitudes may be quite severe. For instance, in the mountains of the northern Argentina at above 3,000 meters (where *Premnotrypes piercei* occurs) the average temperature in summer does not even reach 14 °C, and in winter, the temperature is below 4 °C (Agostini de Manero, 1993).

The main host plant on which the weevils complete their full cycle of de-

Fig. 5. Potato field safeguarded by a plastic barrier (Alcázar and Kroschel, 2009)



Рис. 5. Поле картофеля, огороженное пластиковым барьером (Alcázar and Kroschel, 2009)

velopment and produce fertile offspring is potato. However, adults seeking for extra food may damage many other cultivated and wild plants of various dissimilar taxonomic groups. These are, for instance the common oat (*Avena sativa*), broad bean (*Vicia faba*), black nightshade (*Solanum nigrum*), hispanicized oca (*Oxalis tuberosa*), field mustard (*Brassica campestris*), radish (*Raphanus sativus*), common dandelion (*Taraxacum officinale*), cobbler's pegs (*Bidens pilosa*), white clover (*Trifolium repens*), southern cone marigold (*Tagetes minuta*), docks (*Rumex* spp.) and many others. Moreover, the published data report that some *Premnotrypes* species are able to go through their development cycle in other plants (*P. latithorax* – in mashua, field mustard and redstem filaree, and *P. solaniperda* — in Senecio, Peruvian feather grass and redstem filaree). However, laboratory testing showed that the larvae could only survive in potato (Vera et al., 1994).

Biological characteristics of *P. latithorax* (Carrasco, 1961; Tisoc, 1989; Carbajal, 1992; etc.), *P. vorax* (Calvache, 1986; Muñoz and Alcázar, 1998; etc.), *P. suturicallus* (Alcázar, 1976; etc.), *P. piercei* (Carhuamaca and Tovar, 1987) and *P. solaniperda* (Gil, 1991) were studied in detail and found to be quite similar. By day, adult weevils hide in soil particles, under stones, in plant debris or other suitable shelters, and in the evening become active and start to feed on plants and mate.

Females lay their eggs inside plant debris near the plants. As eggs hatch, larvae make their way into the soil and bore into tubers to feed on. Larvae complete their development in four instars (*P. vorax* has five larval instars). Then,

the final instars abandon tubers and pupate in pupal cells at 10–30 cm into the soil. Most larvae abandon the tuber before harvest. Still, a small number of larvae may be transported with the tubers into new areas. This may facilitate the spread of the pest.

Young adults emerge with the onset of rains. Alcazar and Cisneros (1999) studied the duration of life cycle of several species. Under Peru's conditions life cycle is 434 days for *P. suturicallus*, 463 days for *P. vorax* and 549 days for *P. piercei*; *P. piercei* males live for up to 280 days. Trials showed that *P. vorax* and *P. suturicallus* adults could survive without food for up to 4.5 months (Calvache and Alvarado, 1980; Alcázar, 1976). In natural habitats, larval damage to tubers starts in the middle of March and continues until at least April. Prepupae occur from May to October. Adults emerge from the soil from late October to late February. Thus, the largest number of adults occurs in February.

Natural enemies of the genus *Premnotrypes* are scarce. The only effective predators are believed to be ants of the genus *Iridomirmex* (Garmendia, 1961). As for parasites, it is illustrative that none have been recorded during many years that Alcazar and Cisneros (1999) collected tens of thousands of larvae and observed them for the parasite occurrence.

The impact of Andean potato weevils is significant. Even regular insecticide treatments do not prevent larvae from damaging and destroying up to 45% of potato tubers. When no treatments are applied, the damage may amount up to 100% which often is the reason why farmers abandon their fields (Ortiz et al., 1996). In Columbia, farmers have to spend about \$22 million annually on chemical control of the weevils which accounts for 90% of the total cost of insecticide treatments of Columbian potato (Trillos et al., 1993). Adults feeding on leaves may cause serious damage. Zenner and Posada (1968) demonstrated that five adult weevils are capable of destroying a young potato plant within three days; Durán (2001) found that throughout its life, a weevil consumes about 10 cm² of the leaf surface (Fig. 4). Arestegui (1976) observed that a large number of the weevils caused complete defoliation of young potato plants.

Interestingly, population density is almost always substantially greater (often 20 to 30 times) on the periphery of

fields than in their center. This is due to the fact that flightless weevils migrate to new fields and thus primarily colonize plants located closer to the field border (Ravines, 2002; etc.).

Cultural practices are the most effective measures to control weevils. Often, pest free fields are safeguarded by a solid plastic barrier that serves as an insurmountable obstacle for flightless weevils (Figures 5, 6).

Crop rotation and a distance of over 1 km between the fields significantly reduce the number of the weevils since the pests have limited migration abilities. Trials conducted on *P. latithorax* and *P. solaniperda* in Bolivia showed that weevils seeking to spread into new fields were only able to cover the distance of no more than 300 m at 0.6 m/h (Chaves, 1997).

The genus *Rhigopsidius* Heller, 1906 (subfamily Rhytirrhiniinae, tribe Rhytirrhiniini) consists of two species — *R. tucumanus* Heller, 1906 and *R. piercei* Heller, 1936 (Fig. 7). These species occur in Bolivia, southern Peru and north-west Argentina. These are the only representatives of the tribe *Rhytirrhiniini* present in America. In the Old World, the tribe *Rhytirrhiniini* occurs in a variety of forms.

Rhigopsidius weevils are dark-brown, 6.5 to 10 mm; integuments vesicular; body covered by setae with long thin protuberances at the tips; eyes large, roughly triangular; The rostrum is only about 1.5 times the width and shorter than the pronotum. The antennae are geniculate with an elongated scape. Sulci are deep, directed towards the eyes.

Fig. 6. Safeguarding a field with plastic barriers (Alcázar and Kroschel, 2009)



Рис. 6. Огораживание полей картофеля пластиковыми барьерами (Alcázar and Kroschel, 2009)

Mandibles are asymmetric with two setae. The pronotum is knobby with well-developed postorbital lobes on the disk with a keel divaricate at the base. The elytra are slightly knobby at even intervals with three large knobs on the slope. Wings are nonfunctional; the weevils are unable to fly.

Rhigopsidius inhabit somewhat drier areas than *Premnotrypes* and have a smaller habitat with the extreme south of Peru being its northern limit. Lifestyle and food preferences are in general similar to those of *Premnotrypes*. An important difference is that *Rhigopsidius* larvae not leave tubers for pupation. Since a tuber infested with larva or pupae does not look different from a pest free tuber, the likelihood of the pest being introduced into new territories is higher.

Usually, the economic data on the pest damage given in the literature describe the combined damage caused by the entire complex of potato weevils, so it is quite difficult to specify the economic damage of *Rhigopsidius* per se. Nevertheless, Vigiana and Serrano (2001; quote from Kühne, 2007) indicate that an infestation level of over 2 larvae per 1 kg of tubers is considered unacceptable for seed potatoes.

The genus *Phyrdenus* LeConte, 1876 (subfamily Cryptorhynchinae, tribe Cryptorhynchini) includes about 20 species distributed exclusively in the New World (Alonso-Zarazaga and Lyal, 1999). The APW complex includes only one representative of this genus — *Ph. muriceus* (Germar, 1824). This species is distributed from Argentina to Mexico and in the areas of its distribution is a serious pest of cultivated plants of the ge-

nus *Solanum* (Maes and O'Brien, 1990; Morrone, 2014)

Ph. muriceus weevils are small (males between 4.3 to 5.2 mm, females between 5.4 to 6.3 mm) stout, gray or brown. Uneven surfaces of the pronotum and elytra covered with knobs, sulci and scales (Fig. 8) are easy for soil particles to stick to which well masks these weevils and other members of the complex.

Unlike *Premnotrypes* and *Rhigopsidius*, *Phyrdenus* has a rather long rostrum. However, the Andean potato weevils are quite similar in the body structure as well as uneven body surface covered with soil particles. Nonetheless, *Ph. muriceus* is the only representative of the complex that has well-developed wings and thus, the only one able to fly (Alcázar and Cisneros, 1999).

According to the research by Edelstein and Walter (2014), on the whole, life cycle of *Ph. muriceus* is very similar to that of the *Premnotrypes* species. However, unlike other Andean weevils, this species can develop not only in potato but also in other crops, including tomatoes and eggplants. In this case, larvae feed on roots rather than tubers. Adult weevils damage root crown along with leaves and stems which eventual-

In Columbia, farmers have to spend about \$22 million annually on chemical control of the weevils which accounts for 90% of the total cost of insecticide treatments of Colombian potato (Trillos et al., 1993).

ly leads to a breakdown and death of seemingly healthy plants. The damage caused to tomatoes is often so serious that sometimes this pest is called a "tomato weevil" (gorgojo del tomate). In many regions of the New World, *Ph. muriceus* is considered a major pest of potatoes, tomatoes and eggplants (Argerich et al., 2010; Saini, Alvarado, 2006; Novo et al., 2002).

Thus, after considering all the representatives of the Andean potato weevil complex, we can confirm that *Phyrdenus muriceus* and species of the genus *Rhigopsidius* when compared with the *Premnotrypes* species are more capable of spreading since *Phyrdenus* adults are capable of active flight and *Rhigopsidius* weevils have increased period of latent development (larvae do not leave tubers for pupation). Moreover, *Phyrdenus muriceus* is capable of developing not only in potatoes but also in tomatoes

and eggplants. Thus, in Russia, the representative of the two genera apparently may even pose a higher pest risk than those of *Premnotrypes*.

References

1. Agostini de Manero (1993) Distribution and degree of infestation of *Rhigopsidius piercei* Heller (Coleoptera: Curculionidae) in Jujuy province, Argentina. — Revista de la Sociedad Entomológica Argentina, 52 (1–4): 29–35.
2. Alcázar J. (1976) Biología y comportamiento del "gorgojo de los Andes" *Premnotrypes suturicallus* Kuschel (Coleoptera: Curculionidae). — Thesis of the Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo, Peru. 108p.
3. Alcázar J. and F. Cisneros (1999) Taxonomy and bionomics of the Andean potato weevil complex: *Premnotrypes* spp. And related genera. — In: Impact on a changing world: Program report

1997–98. C. Arthur, P. Ferguson and B. Smith (eds.). Lima, International Potato Center: pp. 141–151.

4. Alcázar J. and J. Kroschel (2009) Plastic barriers control Andean potato weevils (*Premnotrypes* spp.): Large-scale testing of efficacy, economic and ecological evaluation and farmers' perception. — 15th Triennial of the Symposium of the International Society for Tropical Root Crops, 2–6 November 2009.

5. Alonso-Zarazaga M.A. and C.H.C. Lyal (1999) A world catalogue of families and genera of Curculionidae (Insecta: Coleoptera) (excepting Scolytidae and Platypodidae). Entomopraxis, Barcelona. 315 pp.

6. Angeles N.J. (1966) Presencia del "Gorgojo de la papa", *Premnotrypes vorax* (Hustache (Curculionidae-Coleoptera)) en la región Andina de Venezuela. — Agronomía Tropical, 16 (4): 295–298.

7. Arestegui P.A. (1976) Plagas de la papa en Andahuaylas-Apurímac. — Revista Peruana de Entomología, 19 (1): 97–98.

8. Argerich C. and L. Troilo (eds.) (2010) Buenas prácticas agrícolas en la cadena de tomate. Buenos Aires (AR): FAO, INTA. 258 p.

9. Calvache G.H. (1986) Aspectos biológicos y ecológicos del gusano blanco. — Memorias del curso sobre el control integrado de plagas de la papa. International Potato Center and Instituto Colombiano Agropecuario. Bogota, Colombia, p. 18–24.

10. Calvache G.H. and L.F. Alvarado (1980) El gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache) y su control. — Pasto, Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) — Centro Regional de Investigaciones "Obonuco": 34.

11. Carbajal C.P. (1992) Biología, fluctuación de población y control del gorgojo de los Andes *Premnotrypes latithorax* en la localidad de Aguirre. — Thesis of the Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia. 105 p.

12. Carhuamaca J. and A. Tovar (1987) Estudio del ciclo biológico de *Premnotrypes piercei* Alcalá. — Proceedings XXX Convención Nacional de Entomología held in Cajamarca, Perú. Entomological Society of Peru. Lima, Peru.

13. Carrasco Z.F. (1961) Sistemática y biología del gorgojo de los Andes *Premnotrypes latithorax* Pierce 1914 (Coleopt.: Curculionidae). — Revista

Peruana de Entomología Agrícola, 4 (1): 30–42.

14. Chaves A.C.R. (1997) Actividad migratoria y daño del Gorgojo (*Premnotrypes* spp.) en dos comunidades altiplánicas del departamento de La Paz. — Thesis of the Universidad Técnica de Oruro, Bolivia, 118 pp.

15. Durán A.J. (2001) Determinación de plantas cultivadas y no cultivadas como hospedantes de *Premnotrypes latithorax* (Pierce) en el distrito de Chinchero. — Proceedings of the Manejo integrado de plagas de los principales cultivos andinos. Memoria del seminario taller nacional y regional. Valle Sagrado de los Incas. June, 20–22 and October 21–23 2001. Urubamba — Cusco (Peru), ARARIWA. pp. 29–31.

16. Edelstein J.D. and S. Walter (2014) Manejo integrado de plagas (MIP) del gorgojo *Phyrdenus muriceus* en papa. — Cartilla Digital Manfredi, 5: 1–6.

17. EPPO (2011) Data Sheets on Quarantine Pests: *Premnotrypes* spp. (Andean). — https://www.eppo.int/QUARANTINE/insects/Premnotrypes_latithorax/PREMSP_ds.pdf.

18. Garmendia A. (1961) Observaciones sobre un posible control biológico de la gusanera de la papa depositada en almacén. — Revista Peruana de Entomología Agrícola, 4 (1): 76–77.

19. Gil A.P. (1991) Biología y comportamiento de *Premnotrypes solaniperda* Kuschel (Coleoptera: Curculionidae). — Thesis of the Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Peru. 72 p.

20. Kühne M. (2007) The Andean potato weevil *Premnotrypes suturicallus*. Ecology and interactions with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. — Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Agrarwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen. Göttingen, 178 p.

21. Kuschel G. (1956) Revisión de los *Premnotrypini* y adiciones a los Bagoiini (Aporte 17 sobre Coleoptera Curculionidae). — Boletín Museo Nacional de Historia Natural, Chile, 26: 187–235.

22. Maes J.-M. and Ch.W. O'Brien (1990) Lista anotada de los Curculionidae (Coleoptera) de Nicaragua. — Revista Nicaraguense de entomología, 12: 1–78.

23. Morrone J.J. (2014) Biodiversidad de Curculionidae (Coleoptera) en México. — Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl. 85: 312–324.

24. Morrone J.J. and M.S. Loiacono (1992) Revision of the genus *Rhigopsidius* Heller (Insecta, Coleoptera, Curculionidae, Rhytirrhiniinae). — Entomologische Abhandlungen, 54 (7): 129–139.

25. Muñoz M. and J. Alcázar (1998) Biología y comportamiento del gorgojo de los Andes *Premnotrypes vorax*. — Resúmenes del XL Convención Nacional Entomología del Perú, Nov. 1998. Lima, Perú.

26. Novo R.J., Viglianco A. and E. Vaudagna (2002) Efectos de insecticidas sobre el gorgojo de la papa, *Phyrdenus muriceus* (Germ.) (Coleoptera: Curculionidae). Agriscientia (AR), 19 (1): 3–10.

27. Ortiz O., Alcázar J., Catalán W., Villano W., Cerna V., Fano H. and T.S. Walker (1996) Economic impact of IPM practices on the Andean potato weevil in Peru. In: Case studies of the economic impact of CIP-related technology. T.S. Walker and C.C. Crissman (eds.). Lima, International Potato Center, pp. 95–110.

28. Ravines N.L.A. (2002) Dinámica poblacional del gorgojo de los Andes *Premnotrypes vorax*. — Thesis of the Universidad Nacional de Cajamarca, Peru. 56 pp.

29. Saini E.D. and L. Alvarado (2006) Insectos y ácaros perjudiciales a los cultivos de tomate y pimiento y sus enemigos naturales. Castelar, Buenos Aires (AR): INTA — IMYZA. 1, 68 p.

30. Tisoc I. (1989) Ciclo biológico de *Premnotrypes latithorax* bajo condiciones de laboratorio en el Cusco. — Revista Peruana de Entomología Agrícola, 32: 89–92.

31. Trillos G.O., Valencia L., Pineda R.C. and R.B. Martinez (1993) Evaluation of hybrids of *Solanum polyadenium* Grenm. for white worm resistance of potatoes (*Premnotrypes vorax* Hustache). — Agronomía Colombiana, 10 (2): 128–131.

32. Vera A., Alcázar J., Cisneros F., and W. Catalán (1994) Evaluación de la susceptibilidad de los principales tubérculos Andinos al gorgojo de los Andes. — Resúmenes XXXVI Convención Nacional de Entomología. Iquitos, Peru.

33. Vigiana A. and M. Serrano (2001) Manejo integrado de plagas en papa. — Unpublished Manuscript, Universidad Nacional de Jujuy (Argentina): 24 pp.

34. Zenner I. and L.O. Posada (1968) Generalidades sobre el gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Hustache). — Agricultura tropical, 24 (1): 33–40.

Fig. 7. *Rhigopsidius tucumanus* Heller (www.coleoptera-neotropical.org)



Fig. 8. *Phyrdenus muriceus* (Germar) (www.coleoptera-neotropical.org)



АНТРАКНОЗ *Colletotrichum acutatum* Simmonds — ОПАСНОЕ ЗАБОЛЕВАНИЕ ЗЕМЛЯНИКИ

О.В. Скрипка, заведующая лабораторией микологии ФГБУ «ВНИИКР»

И.П. Дудченко, старший научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»

М.Б. Копина, старший научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»

С.В. Никифоров, младший научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»

В последние годы земляника становится все более популярной и экономически значимой культурой во всем мире. На ее долю приходится 68% общемирового производства ягод и эта доля с каждым годом возрастает [15]. Современная селекция земляники идет по пути создания высокопродуктивных, ремонтантных сортов, способных давать гарантированный урожай в течение длительного времени вегетационного периода, однако при этом часто приходится жертвовать устойчивостью растений к заболеваниям. Появляющиеся новые штаммы и расы фитопатогенов, приобретая устойчивость к применяемым пестицидам, с посадочным материалом распространяются по всему миру. Одним из таких недавно выявленных заболеваний является черная пятнистость, или антракноз земляники, вызываемый *Colletotrichum acutatum* Simmonds. Возбудитель этой болезни — гриб, относится к классу Sordariomycetes, порядку Phyllachorales. Впервые патоген обнаружен в Австралии в 1965 г. на землянике и папайе, однако как самостоятельный вид был описан только в 1968 г. [14].

Антракноз земляники — уже широко распространившееся по всему миру заболевание. В настоящее время *C. acutatum* зарегистрирован в следующих странах:

Европа: Австрия, Бельгия, Босния и Герцеговина, Болгария, Кипр, Чехия, Дания, Финляндия, Франция, Германия, Венгрия, Италия, Латвия,

Антракноз земляники — уже широко распространившееся по всему миру заболевание.

Литва, Мальта, Нидерланды, Норвегия, Польша, Португалия, Россия, Сербия, Словения, Испания, Швеция, Швейцария, Великобритания.

Азия: Китай, Индия, Индонезия, Ява, Суматра, Израиль, Япония, Республика Корея, Малайзия, Сабах, Непал, Шри-Ланка, Тайвань, Таиланд, Турция.

Африка: Конго, Египет, Эфиопия, Кения, Маврикий, Нигерия, Южная Африка, Танзания, Уганда и Зимбабве.

Северная Америка: Канада, Мексика, США.

Центральная Америка и страны Карибского бассейна: Белиз, Коста-Рика, Доминика, Доминиканская Республика, Ямайка и Сент-Люсия.

Южная Америка: Аргентина, Бразилия, Чили, Колумбия, Эквадор, Гайана, Уругвай и Венесуэла.

Океания: Австралия, Вануату, Новая Зеландия [9, 16].

На территории России отмечены отдельные случаи обнаружения этого заболевания в Краснодарском крае, Московской и Тамбовской областях [1, 2]. Болезнь была выявлена на сортах земляники (Зенга Зенгана, Полка, Редгонтлит, Ароса и Мармалода, Клер и др.), завезенных из Польши, Финляндии и Италии. При этом информации об образовании очагов или акклиматизации патогена

в этих районах не поступало.

C. acutatum является одним из наиболее патогенных видов рода *Colletotrichum* Corda, поражающим ряд сельскохозяйственных культур в тропических, субтропических и умеренных регионах, однако наибольшее экономическое значение имеет для основного растения-хозяина — земляники (*Fragaria ananassa* Duch) [6]. Патоген особенно опасен в период созревания ягод.

В зависимости от региона, по своему разрушительному воздействию на землянику *C. acutatum* приравнивается к серой и фитотфорозной гнилям. Экономические потери урожая могут составлять от 30 до 80%, а выпадения растений в маточных насаждениях — более 33% [4, 5, 8]. Так, например, в фермерском хозяйстве Белореченского района Краснодарского края урожай на площади около 2 га погиб полностью [3]. Болезнь опасна еще тем, что после проникновения в растение патоген прекращает свое развитие до определенного периода и симптомы заражения могут не проявляться в течение нескольких лет. Именно с такими бессимптомными растениями и произошло быстрое распространение антракноза. Следует отметить, что возбудитель заболевания также может наносить существенный вред другим ягодным (клюква, черника), плодово-декора-

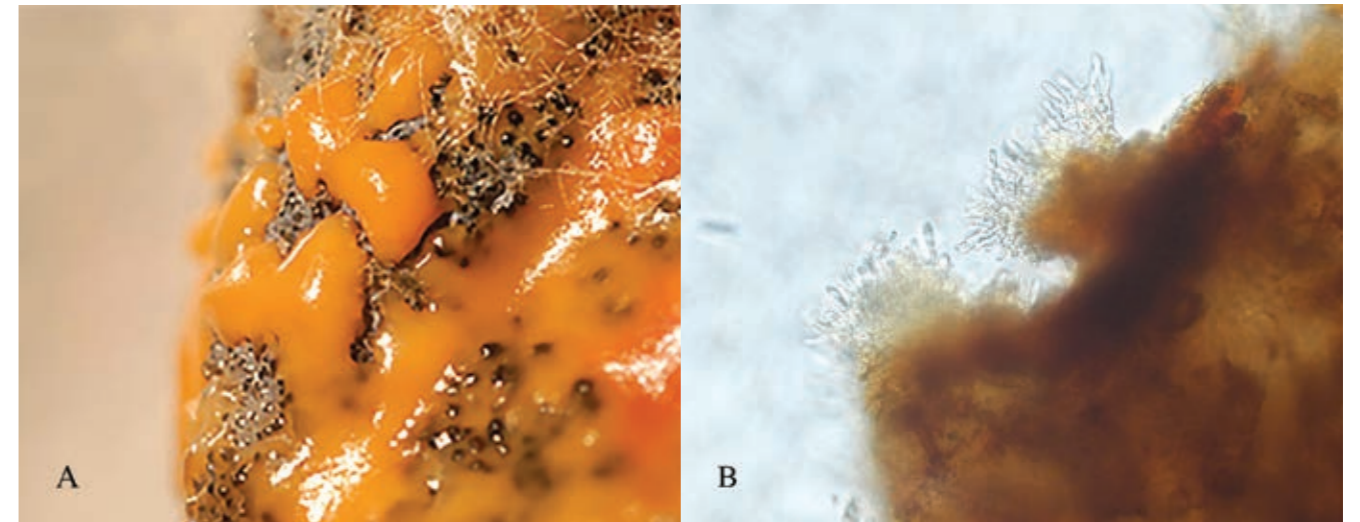


Рис. 1. Экссудат на ягоде земляники, пораженной антракнозом (А) и ложе с конидиеносцами и конидиогенными клетками (В)

Fig. 1. Exudate (A) and acervulus with conidiophores and conidiogenic cells (B) on a strawberry infected by anthracnose

тивным (яблоня), овощным и травянистым культурам.

В связи с высокой вредоносностью *Colletotrichum acutatum* включен в карантинный список стран Европейского союза, ввоз и распространение которых с растительной продукцией запрещен. Кроме того, патоген является карантинным для Израиля и Чили [9, 16]. В России *C. acutatum* пока не является карантинным видом, однако анализ фитосанитарного риска (АФР) показал высокую опасность для ягодоплодных культур в случае его проникновения и акклиматизации. Вследствие этого *C. acutatum* представлен для включения в карантинный перечень РФ и Таможенного союза.

Возбудитель болезни *C. acutatum* сохраняется в форме покоящегося мицелия или конидий на растительных остатках, в пораженных побегах, тканях растений земляники и сорняках. В летний период на пораженных участках растений образуется конидиальное спороношение, из которого (во влажных условиях) выступают слизистые капельки желто-оранжевого цвета, состоящие из конидий возбудителя. По мере подсыхания оранжево-коричневые споровые массы становятся подобными корке.

Наиболее вероятными путями проникновения инфекции являются ввоз пораженного посадочного материала, растений и плодов.

Спорогенный мицелий со спорами может сохраняться и в сухом материале (черешках или ягодах) как на, так и под кожицей характерных вдавленных повреждений.

Попадая на растения, конидии прорастают и проникают в ткани хозяина с помощью апрессориев. Гифы гриба распространяются внутриклеточно, уничтожая отдельные клетки или участки тканей растения. Патоген может присутствовать в тканях растения не развиваясь и проявить себя только после сбора урожая. В погибших тканях образуются подушечки гриба (ацервулы), из которых, тесно прилегая друг к другу, вырастают длинные конидиеносцы, от которых отпочковываются одноклеточные бесцветные эллипсоидальные конидии. Они являются источником вторичного заражения [10, 11, 13].

Рост мицелия и спорообразование *C. acutatum* может происходить в широком диапазоне температур: от +10 °С до +35 °С. Оптимальными условиями для развития гриба являются температура от +25 °С до +28 °С и высокая относительная влажность воздуха 95-100%. При наличии капельно-жидкой влаги инкубационный период длится от 6 до 12 дней. Жизнеспособность патогена в почве

сохраняется в течение года в умеренном климате. Хотя известно, что в условиях Финляндии гриб перезимовывал в растительных остатках на поверхности почвы в течение двух зим [12].

В биологии возбудителя еще много неизученного. Например, недостаточно данных о роли половой стадии в жизни популяции, т.к. телеоморфа гриба (*Glomerella acutatum* Guerber & Correl) выявлена пока только в культуре (в лабораторных условиях) и нет сведений о нахождении ее в природе [10].

C. acutatum — очень пластичный вид, гриб образует множество рас, патогенных для различных культур. Наиболее вероятными путями проникновения инфекции являются ввоз пораженного посадочного материала, растений и плодов. Кроме того, *C. acutatum* может распространяться механически (орудиями труда, на одежде, с транспортом и т.п.), а также воздушно-капельным путем и насекомыми. Болезнь особенно опасна в теплицах и пленочных укрытиях, на плодородных или богатых азотом почвах, в загущенных, плохо проветриваемых посадках.

В июне 2013 года в лабораторию микологии ФГБУ «ВНИИКР» поступили образцы пораженных растений земляники нескольких сортов с производственных посадок открытого грунта из ООО «Острогосксад-питомник» Воронежской области. Сортосов состав растений был смешанным с преобладанием сортов Ханей, Ароса и Вима Кимберли. Представленные образцы различались по времени посадки (2009 и 2013 г.), но имели довольно близкие по характе-



Fig. 2. External view of infected strawberry plants

Рис. 2. Внешний вид пораженных растений земляники

Главное в борьбе с антракнозом — использовать для посадки гарантированно здоровую рассаду.

Рис. 3. Пораженные рожки и корни земляники

Fig. 3. Infected strawberry axillary buds and roots



ру поражения внешние симптомы. Растения имели признаки явного увядания, отмечалось наличие темных вдавленных язв на черешках и стеблях побегов, пятнистостей и побурение отдельных рожков и листьев. При этом были поражены практически все органы земляники.

На листьях пятна (некрозы) были крупные, неопределенной формы, с хорошо заметным фиолетовым оттенком почти по всей поверхности. Также фиолетовый оттенок присутствовал на пораженных цветоносах и чашелистиках.

Рожки в разрезе, в зависимости от степени заболевания, имели цвет от золотисто-желтого до бурого внутри со светлой окантовкой (зоной) по краю. В усохшей и разложившейся мякоти рожка образовались емкости, так называемые «карманы» отмершей ткани, что также является характерным диагностическим признаком. В то же время у некоторых образцов сердцевина рожка очень напоминала признаки вертициллезного увядания корней.

Корни были вялые, словно обугленные. Боковые более тонкие кор-



Рис. 4. Признаки поражения ягод сорта Ханей

Fig. 4. Infection symptoms on berries of the Honeoye variety

ни имели усохший вид и были обломаны. Больные корни по своему виду напоминали «крысиные хвосты», как при поражении *Phytophthora fragariae*.

Наиболее характерные признаки поражения были обнаружены на зрелых ягодах, которые имели вид гниющей массы красновато-коричневого цвета, но сохраняли свою форму. Зерновки выделялись более светлым цветом, но с таким же красновато-коричневым оттенком.

При этом на некоторых ягодах образовались темные, почти черные пятна округлой формы, напоминающие характерную «вдавленность от

Рис. 5. Паутинистый мицелий (A) и конидии (B) на пораженной ягоде

Fig. 5. Web-like mycelium (A) and conidia (B) on an affected berry



большого пальца» с относительно четкой границей и черными зерновками. При благоприятных условиях углубленные пятна покрывают весь плод в течение нескольких дней, и на инфицированных тканях быстро начинают формироваться оранжево-розовые массы спор.

На отдельных спелых ягодах был виден желто-оранжевый экссудат, а другие имели усохший, недоразвитый вид с грязно-буро-красной окраской.

Во влажной камере на пораженных ягодах образовывался белый, паутинистый мицелий. При его микроскопировании были обнаружены клеточные гифы с почкующимися фиалидными конидиогенными клетками, от которых отделялись одноклеточные конидии, размером 12,4–19,0 × 4,0–5,4 мкм антракнозного типа. При поражении плодов фузариозом мицелий бывает плотным и возвышающимся. В данном

случае мицелий гриба отличался от фузариозного.

На экссудирующей ткани пораженной ягоды также были видны ложа с конидиеносцами и конидиогенными клетками.

По предварительным признакам, мы имели дело с антракнозом земляники, однако сложность определения возбудителя состояла в том, что возбудитель имеет сходную симптоматику и сходные морфологические признаки не только с близкородственными видами, такими как *C. gloeosporioides*, *C. fragariae*, но и такими, как *Fusarium* sp., особенно *F. oxysporum*, которые также распространены на землянике.

Для установления этиологии болезни пораженные плоды, части стеблей, черешков промывали в проточной воде, поверхностно стерилизовали в 96% спирте, затем отмывали в стерильной воде и помещали во влажные камеры и на питательные среды (2% картофельно-глюкозный агар, V8 и др.). Был изучен комплекс культурально-морфологических признаков: форма и цвет колоний гриба, динамика роста возбудителя, тип спороношения, форма и размеры конидий. В результате лабораторного анализа практически из всех органов растений земляники был выделен возбудитель антракноза.

На 5–10 сутки роста колоний на среде V8 гриб образовывал рыхлый светло-серый мицелий, который в дальнейшем сохранился лишь по краю колонии, а в центре приобрел темно-серый цвет с розоватым оттенком. После двухнедельного развития колоний проявилось чередование участков светлого и темного мицелия в виде компактных газонов,

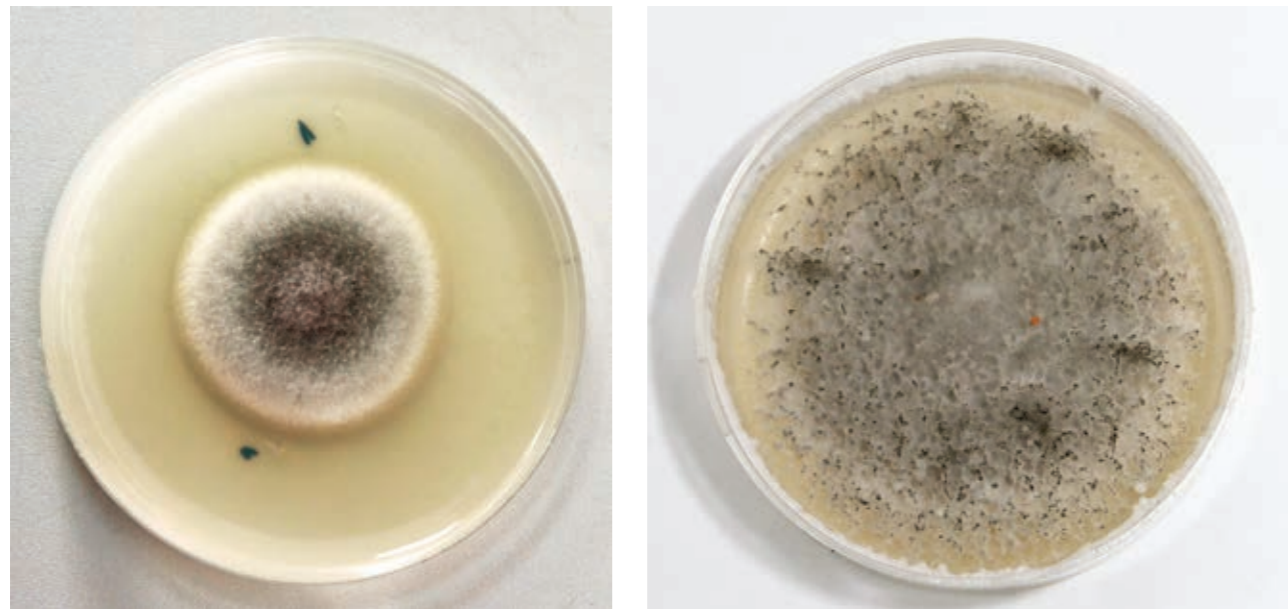


Рис. 6. Колонии гриба на среде V8

Fig. 6. Fungus colonies on the V8 medium

на которых образовались участки спорогенного мицелия со скоплением спор оранжевого цвета, аналогичных выделению экссудата на поверхности пораженных ягод.

На среде КГА колонии с самого начала имели более плотный мицелий, мышино-серого цвета, по мере роста которого в центре чашки постепенно образовалась воронка из мицелия светло-серого цвета с капельками красновато-оранжевого экссудата из спор.

Споролога возбудителя — дисконидной формы кремового или розового цвета, диаметром от 60 до 450 мкм. Склероции и щетинки в культурах отсутствовали. Конидиеносцы удлинённые, бесцветные, простые, одноклеточные, иногда с перегородками, позже окрашенные в нижней части, 20–25 мкм длиной. Конидии бесцветные, от узкоэллиптических до веретеновидных, гладкие, на обоих концах заостренные, одноклеточные, размером 7,7–19 × 2,6–5,4 мкм. Результаты измерений морфологических структур гриба показали, что они соответствуют параметрам *Colletotrichum acutatum*, описанным в литературе [9, 14].

Для уточнения идентификации полученных культур была проведена постановка классической ПЦР с универсальными праймерами, рекомендованными q-bank Fungi (<http://www.q-bank.eu/Fungi>), которые амплифицировали продукт размером

600 п.о. внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS). ДНК из мицелия возбудителя выделяли с помощью набора «М-Сорб-Туб» (ЗАО «Синтол», Москва). При постановке классической ПЦР с праймерами ITS4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC), ITS5 (AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) с образцами ДНК были получены ампликоны размером 600 п.о. фрагмента ITS.

Нуклеотидную последовательность полученных ампликонов расшифровывали на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 («Applied Biosystems Int.»). После сравнения с базой данных ГенБанка (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) было установлено, что полученная последовательность образцов была идентична имеющимся в базе фрагментам региона ITS возбудителя *Colletotrichum acutatum* на 99–100%.

Следует отметить, что посадочный материал земляники поступал в Воронежскую область из Белоруссии в течение нескольких лет. По-видимому, болезнь была занесена с пораженными растениями. Вегетационный период 2013 года характеризовался частыми дождями, повышенной влажностью воздуха и умеренными температурами, что и привело к вспышке заболевания на землянике.

Помимо этого патогена на пораженных растениях были обнаружены возбудители серой и черной гнили (*B. cinerea*, *Rhizopus* spp.), коричневой пятнистости (*Hainesia lythri* (Desm.) Höhn.) — на ягодах, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Cladosporium*

herbarum (Pers.) Lk. — на листьях, побегах, рожках, а также *Verticillium* sp. и *Fusarium* sp. на корнях растений. Поскольку *C. acutatum* выделялся из всех пораженных частей растений, можно предположить, что он и являлся основной причиной болезни и гибели растений.

В заключение хотелось бы обратить внимание производителей и специалистов на это новое и опасное для нашей страны заболевание. Анализ фитосанитарного риска возбудителя антракноза земляники показал, что наиболее вероятными зонами распространения является большая часть районов Северного Кавказа (Краснодарского и Ставропольского краев), а также Воронежской, Липецкой, Ростовской и Тамбовской областей.

Главное в борьбе с антракнозом — использовать для посадки гарантированно здоровую рассаду.

Для массовой терапии рассады перед высадкой и профилактики болезни можно использовать погружение розеток (на 30 мин) в растворы фунгицидов или проводить обработку растений в состоянии зимнего покоя горячей водой (49 °C в течение 5 мин).

Следует поддерживать высокий уровень агротехники: удалять зараженные растения и растительные остатки, использовать капельное орошение вместо дождевания, в качестве мульчи на многолетних посадках земляники садовой применять солому и др.

Установлено, что сорта земляники отличаются по устойчивости

к *C. acutatum* в разные годы или в разных районах возделывания, при заражении различными расами гриба. Наиболее устойчивыми считаются сорта Давер, Идея, Пеган, Пеликан, Свет Чарли; выносливыми, но не стабильно устойчивыми — Адци, Белруби, Горела, Зенга Пентагрюэля, Зенга Фруктарина, Кембридж, Фейворит и др. [3, 4]. Однако полностью устойчивых сортов к этому возбудителю нет.

Для эффективного контроля заболевания болезни на посадках культуры фунгициды нужно применять до начала развития болезни или при появлении первых признаков заболевания — путем обработки растений препаратами Антракол, Метаксил, Квадрис. Следует отметить, что при благоприятных условиях заболевание развивается настолько быстро, что последующие химические обработки лишь частично снимают инфекцию и не являются эффективным средством защиты. Применение химических препаратов осложняется еще тем, что при неоднократном применении одних и тех же препаратов возбудитель быстро приобретает к ним устойчивость. Поэтому для данного заболевания очень важным элементом эффективной системы защиты является прогноз развития заболевания.

Только своевременная и квалифицированная диагностика в сочетании с такими средствами борьбы, как карантинные мероприятия, прогноз, агротехника, химические обработки и сортовая избирательность, помогут защитить ягодные насаждения от этого заболевания. При этом ос-

новной удельный вес приходится на карантинные мероприятия и тщательный отбор здорового посадочного материала.

Литература

1. Головин С.Е. Новые болезни земляники в средней полосе России. Плодоводство и ягодоводство России. М: ВСТИСП, 2014, 38, 1 88–95.
2. Говорова Г.Ф., Говоров Д.Н. Грибные болезни земляники: Монография. — М: ВСТИСП, 2010. С. 84–88.
3. Метлицкий О.З., Холод Н.А., Головин С.Е., Ундрицова И.А. Антракноз садовой земляники // Ж. «Агро XXI век» 2007. — № 4–6. — С. 40–41.
4. Холод Н.А. Современная структура патогеноза земляники и пути ее оптимизации. 2010 / <https://sites.google.com/site/zemljanichnoe/lib/naucnye-publikacii>.
5. Adaskaveg J.E. (2000) Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. The American Phytopathological Society, St. Paul M.N., p. 317–336.
6. Bailey J.A. & Jeger M.J. (1992) *Colletotrichum* Biology, Pathology, Control. CAB International, Wallingford.
7. Damm U., Cannon P.F., Woudenberg J.H., Crous P.W. (2012) The *Colletotrichum acutatum* species complex. Stud. Mycol. 73, 1, 37–11.
8. Denoyes B., Baudry A. (1991) Characterization of species of *Colletotrichum* isolated from strawberry in France: taxonomy and pathogenicity (abstract). In: Strawberry Diseases and Breeding for Varietal Resistance (International Workshop, Bordeaux).

9. EPPO (2014) PQR database. Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization. <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>.

10. Guerber J.C., Correll J.C. (2001) Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*, Mycologia. 93 (1): 216–229.

11. Quarantine pests for Europe (1997) Data sheets on quarantine pests *Colletotrichum acutatum*. CABI EPPO, 691–697.

12. Parikka P., Pääskynkivi E. and Lemmetty A. (2006) *Colletotrichum acutatum*: survival in plant debris and infection on alternate hosts. NJF seminar No 389: Pest, disease and weed management in strawberry; Finland 8–9. Nov. 2006.

13. Phillip S. Wharton & Javier Diéguez-Urbeondo (2004) The biology of *Colletotrichum acutatum*. Anales del Jardín Botánico de Madrid. 61, 1, 3–22. www.rjb.csic.es.

14. Simmonds J.H. (1965) A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. Queensland Journal of Agricultural and Animal Science, 22: 437–459.

15. www.foodmarket.spb.ru. Рынок свежих ягод в мире и России. 2012.

16. www.CABI.org. *Colletotrichum acutatum*. 2014.

Авторы выражают благодарность начальнику научно-методического отдела фитопатологии ФГБУ «ВНИИ-ИКР» к.с/х.н. Ю.Н. Приходько за предоставление образцов пораженных растений земляники.



ANTHRACNOSE

Colletotrichum acutatum Simmonds

is a Dangerous Disease of Strawberry

Olga V. Skripka, Chief of FGBU VNIKR's Mycology Laboratory

Irina P. Dudchenko, FGBU VNIKR's Senior Researcher

Maria B. Kopina, FGBU VNIKR's Senior Researcher

Sergey V. Nikiforov, FGBU VNIKR's Junior Researcher

Over the past years, strawberry has gained in popularity and economic importance worldwide. Its share in global berry production grows annually and amounts to 68% [15]. Present-day breeding of strawberries strives for creating high-productive, remontant varieties capable of guaranteed yielding for a long vegetation period, thus setting at risk the susceptibility of plants to diseases. Acquiring resistance to applied pesticides, new emerging strains and races of plant pathogens spread with plants for planting around the world. Among such recent diseases the black spot or anthracnose is worth mentioning. It is caused by *Colletotrichum acutatum* Simmonds — a fungus belonging to the class Sordariomycetes, order Phyllachorales. The pathogen was first detected on strawberry and papaya in

Australia in 1965. However, as an independent species it was described only in 1968 [14].

The black spot of strawberry is a widespread disease. Currently, *C. acutatum* is reported in the following countries:

Europe: Austria, Belgium, Bosnia and Herzegovina, Bulgaria, Cyprus, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, Hungary, Italy, Latvia, Lithuania, Malta, Netherlands, Norway, Poland, Portugal, Russia, Serbia, Slovenia, Spain, Sweden, Switzerland, United Kingdom.

Asia: China, India, Indonesia, Java, Sumatra, Israel, Japan, Korea Republic, Malaysia, Sabah, Nepal, Sri Lanka, Taiwan, Thailand, Turkey.

Africa: Congo, Egypt, Ethiopia, Kenya, Mauritius, Nigeria, South Africa, Tanzania, Uganda and Zimbabwe.

North America: Canada, Mexico, USA.

Central America and Caribbean: Belize, Costa Rica, Dominican Republic, Dominica, Jamaica and Saint Lucia.

The black spot of strawberry is a widespread disease.

South America: Argentina, Brazil, Chili, Columbia, Ecuador, Guyana, Uruguay, and Venezuela.

Oceania: Australia, Vanuatu, New Zealand [9, 16].

In Russia, this disease has been reported in Krasnodar Krai, Moscow and Tambov regions [1, 2]. The disease was found on strawberry varieties (Senga Sengana, Polka, Red Gauntlet, Arosa, Marmolada, Clery, etc.) imported from Poland, Finland, and Italy. No information on outbreak occurrence or the pathogen establishment in these regions is available.

C. acutatum is one of the most pathogenic species of the genus *Colletotrichum* Corda infecting a range of agricultural crops in tropical, subtropical and temperate areas. However, it mostly affects its main host plant — strawberry (*Fragaria ananassa* Duch) [6]. The path-

ogen is particularly dangerous during the period of berry ripening.

Depending on the region, the destructive effect of *C. acutatum* on strawberry is considered equivalent to that of gray mold and Phytophthora rots. Yield losses can amount to 30–80%, and death of plants in mother-plantations — to over 33% [4, 5, 8]. For instance, strawberry yield was completely lost on 2 hectares of a farmer's land in Belorechensk region of Krasnodar Krai [3]. The disease is dangerous also due to the fact that after infecting a plant, the pathogen stops its development for a certain period of time; however, the infection can remain latent for several years. Such asymptomatic plants are to be held responsible for the rapid spread of anthracnose. It should be noted that the pathogen can cause considerable harm to other berry (cranberry, blueberry), fruit and ornamental (apple), vegetable and herbaceous crops.

Due to its devastating impact, *Colletotrichum acutatum* is included into the EU list of pests the introduction and spread of which with plant products is prohibited. Moreover, the pathogen is quarantine for Israel and Chili [9, 16]. In Russia, *C. acutatum* is not regulated as a quarantine pest as yet; however, the Pest Risk Analysis (PRA) demonstrated the high risk for berry production in case of its introduction and establishment. Therefore, *C. acutatum* is proposed for inclusion into the quarantine pest lists of Russia and the Customs Union.

C. acutatum survives in the form of a dormant mycelium or conidia in strawberry plant debris, infected shoots or tissues, as well as in weeds. In summer, infected plant parts feature the formation of conidial spores, with mucoid

cadmium orange drops of the pathogen conidia appearing in humid conditions. Upon drying up, brownish orange spore masses turn crust-like. Sporogenous mycelium with spores can also remain in dry material (petioles and berries) both on and under the surface of typical foveate lesions.

When conidia get on a plant surface, they germinate and form appressoria that penetrate into the tissues of a host plant. The fungus hyphae spread in plant cells killing individual cells and parts of plant tissues. The pathogen can occur in plant tissues without developing and become apparent only after harvest. The fungus fruiting bodies (acervuli) are formed in dead tissues. They produce long conidiophores growing snug against one another, with monocellular colorless ellipsoidal conidia budding from them. They are the source of secondary infestation [10, 11, 13].

In *C. acutatum*, the mycelium growth and sporulation can occur in temperatures ranging from +10 °C to +35 °C. Optimal conditions for the fungus development are temperatures between +25 °C and +28 °C and high relative air humidity of 95–100%. If drop or liquid moisture is available, the incubation period lasts from 6 to 12 days. The pathogen remains viable in soil for a year if the climate is temperate. Although in Finland, the fungus is known to have survived two winters in plant debris on soil surface [12].

The biology of the pathogen leaves much to be revealed. For instance, the role of the sexual stage in the population life lacks data because the fungus teleomorph (*Glomerella acutatum* Guerber & Correl) has only been detected in the culture (under laboratory conditions)

and no evidence is available regarding its occurrence in nature [10].

C. acutatum is a very flexible species forming numerous races causing diseases in various crops. The most likely entry pathways include import of infected propagation material, plants and fruit. Besides, *C. acutatum* can be spread mechanically (with tools, on clothes, with vehicles, etc.); it is also airborne and spread by insects. The disease is particularly dangerous in greenhouses and under plastic covers, on fertile and nitrogen-rich soils, in thick and poorly ventilated plantations.

In June 2013, FGBU VNIKR's Mycology Laboratory received samples of infected strawberry plants of several varieties from commercial unprotected production sites of the Limited Liability Company "Ostrogzhskadpitomnik", Voronezh region. The varietal composition of the plants was mixed, the varieties Honeoye, Arosa and Vima Kimberly dominating. The samples provided were planted in different time periods (2009 and 2013) but shared external infection symptoms rather close in character. The plants showed the signs of apparent decline, dark foveate lesions were observed on petioles and shoots; spots and brown discoloration were found on axillary buds and leaves. Moreover, almost all strawberry organs were affected.

Spots (necroses) on leaves were large, adelphomorphous with a clearly visible violet shade covering almost the entire surface. The violet shade was also found on affected peduncles and sepals.

Fig. 7. Exudate (A) and acervulus with conidiophores and conidiogenic cells (B) on a strawberry infected by anthracnose

Рис. 7. Экссудат (А) и ложе с конидиеносцами и конидиогенными клетками (Б) на ягоде земляники, пораженной антракнозом

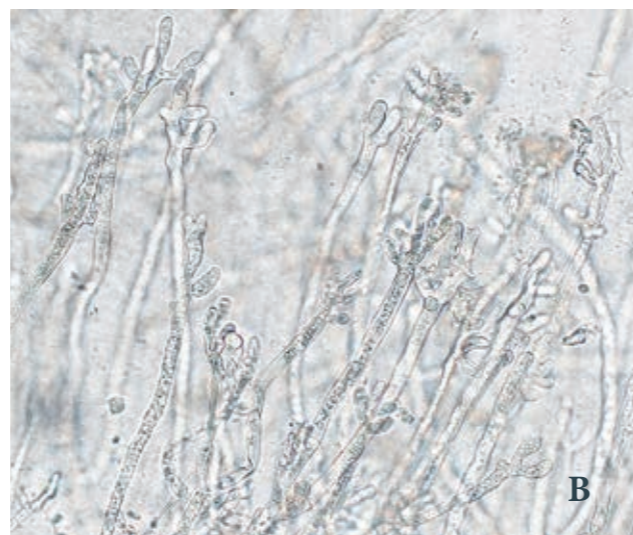


Fig. 8. Affected leaves and peduncles with shriveled strawberries

Рис. 8. Пораженные листья и цветоносы с усохшими ягодами земляники



Рис. 9. Пораженные рожки и корни земляники

Fig. 9. Infected strawberry axillary buds and roots

The most likely entry pathways include import of infected propagation material, plants and fruit.

Рис. 10. Характерный симптом поражения на сорте Вима Кимберли



Рис. 10. Характерный симптом поражения на сорте Вима Кимберли

Depending on the severity of the disease, the axillary buds in the sectional view inside ranged from golden yellow to brownish with a light trim (region) on the edge. Dried and decomposed flesh of the axillary bud featured cavities, the so-called “pockets” of dead tissue, which is also a typical diagnostic characteristic. At the same time, in some samples the core of the axillary bud reminded the symptoms of the verticillium wilt of roots.

The roots were flabby as if burned. Lateral thinner roots looked sphacelated and were broken. The diseased roots looked like “rat tails” as if affected by *Phytophthora fragariae*.

The most typical infection symptoms were found on ripe berries looking like rotting reddish brown mass, with their form preserved. The caryopses attracted attention by their lighter color but with the same reddish brown shade.

Furthermore, some berries showed dark almost circular-shaped black spots reminding typical “thumb spots” relatively precinct and with black caryopses. Under favourable conditions, sunken spots cover the entire fruit within the period of several days and orange and

pink spore masses start developing rapidly on infected tissues.

Some ripe berries were covered with yellowish orange exudates; others were shriveled, underdeveloped and sordid brownish red.

During the incubation in the moist chamber, infected berries became covered with white web-like mycelium. During microscopic examination, cell hyphae were found to carry budding



Рис. 10. Характерный симптом поражения на сорте Вима Кимберли

phialidic conidiogenic cells that released unicellular conidia of the anthracnose type $12.4-19.0 \times 4.0-5.4 \mu\text{m}$ in size. When fruit are affected by *Fusarium* blight, the mycelium is thick and emergent. In this case, the fungus mycelium differed from that of *Fusarium* spp.

The exuding tissue of the infected berry also showed acervulus with conidiophores and conidiogenic cells.

According to our preliminary judgment, the samples were infected by the black spot of strawberry. However, the difficulty in identifying the pathogen is related to the fact that its symptoms and morphological features are similar to those of both closely related species *C. gloeosporioides*, *C. fragariae*, and such species as *Fusarium* sp., particularly *F. oxysporum*, affecting strawberry, as well.

To identify the etiology of the disease, parts of stems and petioles were washed in tap water, surface-sterilized by dipping in 96% alcohol, then rinsed with sterile water and placed into moist chambers on culture media (2% potato glucose agar, V8, etc.). A set of cultural and morphological characteristics was examined — the form and color of the fungus colonies, dynamics of the pathogen growth, spore formation type, form and size of conidia. The laboratory analysis resulted in the anthracnose pathogen being isolated from virtually all organs of the strawberry plants.

The fungus colonies formed fluffy light grey mycelium on the V8 medium on the 5–10th day. Later on, it was found only on the edge of the colony, the center turning dark grey with a pinky shade. After two weeks, the colonies showed the alternation of regions with light and dark mycelium in the form of compact “lawns” where the regions of spore-forming mycelium formed with the aggregation of orange spores similar to the exudate on the surface of infected berries.

From the very beginning, the colonies on the PGA medium had thicker mycelium of a mouse-grey color. While growing, in the center it gradually formed a funnel of light grey mycelium with drops of reddish orange exudate from spores.

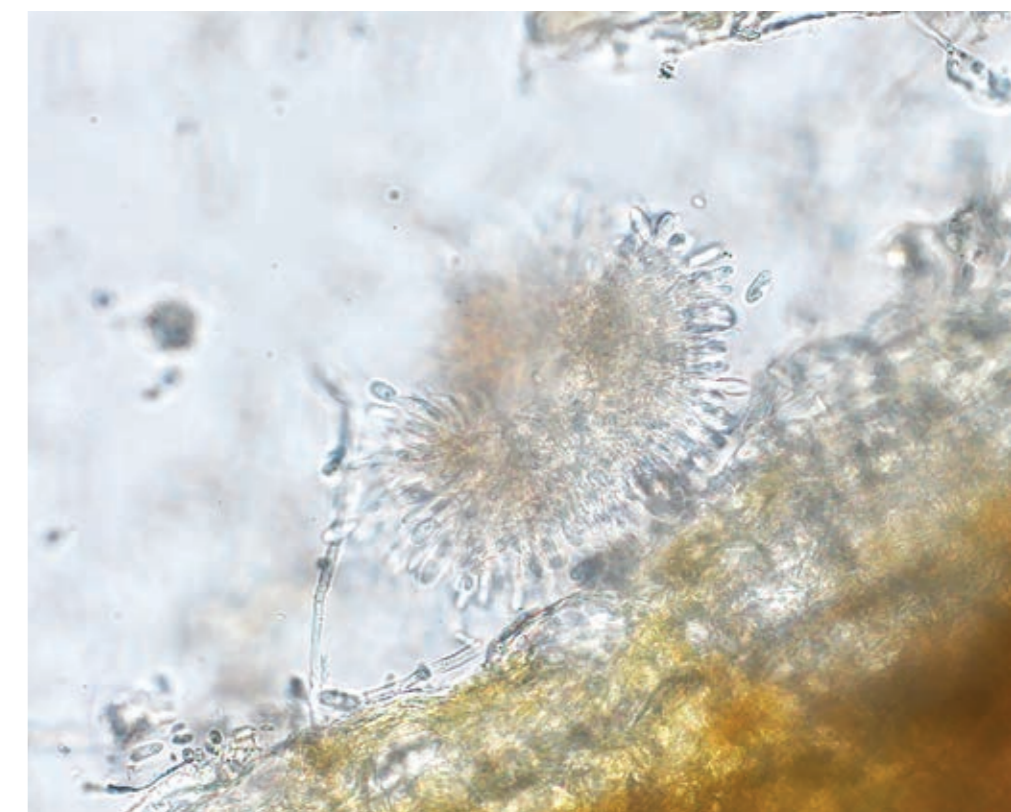
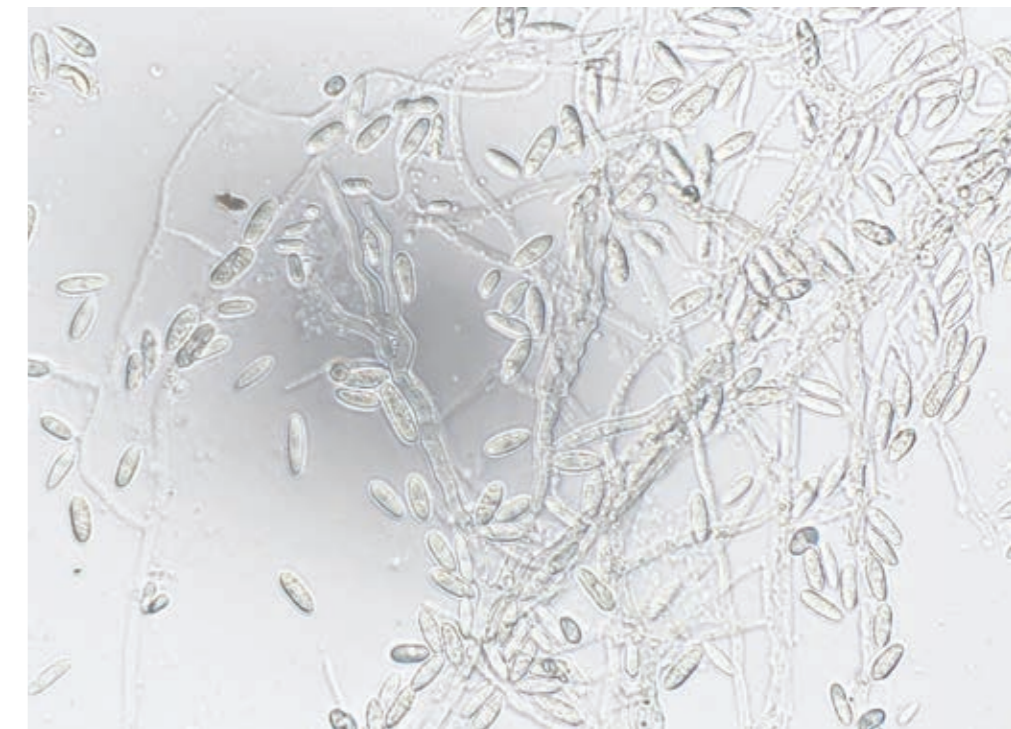
The fungus sporodochium was discal, cream-colored or pink, 60–450 μm in diameter. No sclerotia and bristles were present in the cultures. Conidiophores were elongate, hyaline, ordinary, unicellular, sometimes lobed, later be-

coming colored in the lower part, 20–25 μm in length. Conidia were hyaline, varying from narrow-ellipsoid to spindle-shaped, smooth, spiniform at both ends, unicellular, $7.7-19 \times 2.6-5.4 \mu\text{m}$ in size. The measured morphological

structures of the fungus corresponded to the characteristics of *Colletotrichum acutatum* described in literary sources [9, 14].

Confirmation of the identified cultures was carried out using a conventional PCR with universal primers recommended by Q-bank Fungi (<http://www.q-bank.eu/Fungi>) which amplified the ITS product 600 pb in size. The DNA was extracted from the pathogen myce-

Рис. 11. Мицелий, конидиеносцы и конидии Colletotrichum acutatum



lium using a “M-Sorb-Tube” diagnostic kit (Syntol Corporation, Moscow). The conventional PCR of the DNA samples with ITS4 primers (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) and ITS5 primers (AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) produced 600 pb amplicons of the ITS fragment.

The nucleotide sequence of the amplicons was read using the genetic analyzer ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems Int.). The comparison with the GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) demonstrated that the obtained sequence of the samples was 99–100% identical to the ITS region fragment of *Colletotrichum acutatum* available in the database.

It is worth mentioning that strawberry plants for planting were brought to Voronezh region from Belarus in the course of several years. The disease was apparently introduced with infected plants. The 2013 growing period was marked by frequent rains, air humidity higher than normal and moderate temperatures which triggered the disease outbreak in strawberry.

Apart from this pathogen, the affected plants bore pathogens of grey and black rot (*B. cinerea*, *Rhizopus* spp.), brown spot (*Hainesia lythri* (Desm.) Höhn.) — on berries, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Cladosporium herbarum* (Pers.) Lk. — on leaves, shoots, axillary buds; as well as *Verticillium* sp. and *Fusarium* sp. on plant roots. Due to the fact that it was possible to extract *C. acutatum* from all infected

First and foremost, the successful control of anthracnose requires the guaranteed use of healthy plants for planting.

plant parts, we can assume that it was to blame for the disease and death of the plants.

To conclude, we would like to draw the attention of producers and specialists to this new disease dangerous for our country. The Pest Risk Analysis for the black spot of strawberry proved the majority of North Caucasian regions (Krasnodar and Stavropol kraia) as well

as parts of Voronezh, Lipetsk, Rostov and Tambov regions most likely to be the areas of the pathogen potential spread.

First and foremost, the successful control of anthracnose requires the guaranteed use of healthy plants for planting.

The mass therapy of strawberry seedlings before planting and the disease prevention may include dipping (for 30 minutes) individual plants into fungi-

cide solutions or hot water treatments (49 °C for 5 minutes) of plants during winter dormancy.

Good cultural practices should be maintained: infected plants and plant debris should be removed, drip irrigation instead of sprinkling irrigation should be applied, straw should be used as mulch on perennial strawberry plantations, etc.

Strawberry varieties were found to differ in their resistance to various races of *C. acutatum* depending on the year or cultivation area. The most resistant varieties include Daver, Idea, Pegan, Pelican, Sweet Charlie; tolerant, but unstably resistant are Adtsy, Belrubi, Gorella, Senga Pentagrue, Senga Fructarina, Cambridge, Favourite, etc. [3, 4]. However, no variety is completely resistant to this pathogen.

For the management of this disease on strawberry plantations to be efficient, fungicides should be applied before the disease starts to develop or first symptoms appear. Strawberry plants can be treated with the following plant protection products: Antracol, Metalaxyl, and Quadris. It should be noted that in favourable conditions the disease is so fast to develop that further chemical treatments only partially remove the infection and are not effective for protection. Application of chemicals is complicated by the fact that the pathogen rapidly develops resistance to repeatedly used chemicals. This is the reason why forecasting the disease development is a very important component of the protection system.

Only timely and professional diagnostics, along with such control measures as quarantine activities, forecasting, cultural practices, chemical treatments and choice of varieties will help to protect berry plantations from this disease. In this respect, the major role is played by quarantine activities and thorough selection of healthy plants for planting.

References

1. Golovin S.E. New diseases of strawberry in central Russia. Fruit and berry growing in Russia. M: VSTISP, 2014, 38, 1 88-95.
2. Govorova G.F., Govorov D.N. Fungal diseases of strawberry: Monograph. — M: VSTISP, 2010. P. 84-88.
3. Metlitsky O.Z., Kholod N.A., Golovin S.E., Undritsova I.A. Anthracnose of garden strawberry // Agro XXI Century Journal 2007. — № 4-6. — P. 40-41.
4. Kholod N.A. Modern structure of strawberry pathology and options for its optimization. 2010 / <https://sites.google.com/site/zemljanichnoe/lib/naucnye-publikacii>.
5. Adaskaveg J.E. (2000) Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. The American Phytopathological Society. St. Paul M.N., p. 317-336.
6. Bailey J.A. & Jeger M.J. (1992) *Colletotrichum* Biology, Pathology, Control. CAB International. Wallingford.
7. Damm U., Cannon P.F., Woudenberg J.H., Crous P.W. (2012) The *Colletotrichum acutatum* species complex. Stud. Mycol. 73, 1, 37-11.
8. Denoyes B., Baudry A. (1991) Characterization of species of *Colletotrichum* isolated from strawberry in France: taxonomy and pathogenicity (abstract). In: Strawberry Diseases and Breeding for Varietal Resistance (International Workshop, Bordeaux).
9. EPPO (2014) PQR database. Paris, France: European and Mediterranean

Plant Protection Organization. <http://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>.

10. Guerber J.C., Correll J.C. (2001) Characterization of *Glomerella acutata*, the teleomorph of *Colletotrichum acutatum*, Mycologia. 93 (1): 216-229.

11. Quarantine pests for Europe (1997) Data sheets on quarantine pests *Colletotrichum acutatum*. CABI EPPO, 691-697.

12. Parikka P., Pääskynkivi E. and Lemmetty A. (2006) *Colletotrichum acutatum*: survival in plant debris and infection on alternate hosts. NJF seminar No 389: Pest, disease and weed management in strawberry; Finland 8-9. Nov. 2006.

13. Phillip S. Wharton & Javier Diéguez-Urbeondo (2004) The biology of *Colletotrichum acutatum*. Anales del Jardín Botánico de Madrid. 61, 1, 3-22. www.rjb.csic.es.

14. Simmonds J.H. (1965) A study of the species of *Colletotrichum* causing ripe fruit rots in Queensland. Queensland Journal of Agricultural and Animal Science, 22: 437-459.

15. www.foodmarket.spb.ru. Рынок свежих ягод в мире и России. 2012.

16. www.CABI.org. *Colletotrichum acutatum*. 2014.

The authors express their gratitude to Yury N. Prikhodko, candidate of agricultural sciences, head of FGBU VNIKR's Plant Pathology Scientific Methods Department, for the samples of infected strawberry plants.

Fig. 12. A fungus colony on the PGA medium

Рис. 12. Колония гриба на среде КГА



Международный опыт разработки и применения ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРОТОКОЛОВ

О.Н. Дренова, начальник отдела по международным связям и вопросам ВТО ФГБУ «ВНИИКР»

Диагностические протоколы, как стандарты в области фитосанитарной диагностики, разрабатываются с целью всеобщего и многократного применения. Процесс стандартизации носит иерархический характер и осуществляется на международном и национальном уровнях.

В Соглашении ВТО по применению санитарных и фитосанитарных мер (СФС-Соглашение) особо подчеркивается роль международных стандартов (статья 3 «Гармонизация») в создании многосторонней системы правил и дисциплин, регулирующих разработку, принятие и применение санитарных и фито-

Именно стандарты, разрабатываемые в рамках МККЗР, странам — членам ВТО рекомендуется применять в целях защиты растительных ресурсов от вредных организмов без ущерба для осуществляемой международной торговли.

санитарных мер с целью сведения к минимуму их негативного воздействия на торговлю. В этой связи, СФС-Соглашение определяет Международную конвенцию по карантину и защите растений (МККЗР), как международную организацию, устанавливающую стандарты в сфере карантина растений. Именно стандарты, разрабатываемые в рамках МККЗР, странам — членам ВТО рекомендуется применять в целях защиты растительных ресурсов от вредных организмов без ущерба для осуществляемой международной торговли. Ведь благодаря международным стандартам по

фитосанитарным мерам (МСФМ) обеспечивается оправданность фитосанитарных мер и не допускается их использование в качестве барьеров в международной торговле. Таким образом, МСФМ, включающие в себя стандарты, руководящие указания и рекомендации, признаны в качестве основы для применения фитосанитарных мер странами — членами Всемирной торговой организации в рамках Соглашения по применению санитарных и фитосанитарных мер.

С момента создания МККЗР в 1952 г. Секретариат Конвенции курирует разработку МСФМ, включающих

в себя, кроме всего прочего, диагностические протоколы. Международные стандарты по фитосанитарным мерам утверждаются основным органом Конвенции — Комиссией по фитосанитарным мерам (КФМ), сессии которой проходят ежегодно в марте — апреле в штаб-квартире ФАО в г. Риме, Италия. На сегодняшний день утверждено 36 МСФМ, и один из них — МСФМ 27 — напрямую связан с обеспечением выполнения требований по надежной и достоверной диагностике карантинных вредных организмов растений.

МСФМ 27 «Диагностические протоколы для регулируемых вредных

организмов» — это руководство по структуре и содержанию диагностических протоколов согласно требованиям МККЗР. Стандартом устанавливаются минимальные требования к качеству диагностики, поскольку выявление и правильная идентификация вредного организма являются решающими факторами для надлежащего применения фитосанитарных мер (об этом говорится в МСФМ 4 (1995 г.), МСФМ 6 (1997 г.), МСФМ 7 (2011 г.), МСФМ 9 (1998 г.) и МСФМ 20 (2004 г.)). В частности, договаривающиеся стороны МККЗР (страны, подписавшие Конвенцию) нуждаются в адекватных диагностических процедурах для определения статуса вредного организма и для оповещения о вредных организмах в соответствии с МСФМ 8 (1998 г.) и МСФМ 17 (2002 г.), а также для диагностики вредных организмов в импортируемых грузах (МСФМ 13 (2001 г.)).

В соответствии с положениями МККЗР диагностические протоколы, предназначенные для использования лабораториями при выполнении ими диагностики вредных организмов, являющейся частью системы применения фитосанитарных мер, регулярно пересматриваются и дополняются с целью включения в них новейших данных и результатов научных разработок. Существует установленная процедура подготовки, пересмотра и публикации этих протоколов.

В 2004 году в рамках МККЗР была создана Техническая группа экспертов по диагностическим протоколам (ТГЭДП), состоящая из экспертов в области бактериологии, микологии, энтомологии, гельминтологии

и вирусологии. К задачам ТГЭДП относится выбор приоритетных тем для протоколов по диагностике конкретных вредных организмов или групп организмов, определение специалистов, которые будут участвовать в их разработке, а также контроль выполнения работы. Этот процесс выглядит следующим образом. ТГЭДП поручает одному из своих членов руководить разработкой диагностического протокола, адаптируя по необходимости протоколы, которые были уже приняты региональными организациями по карантину и защите растений (РОКЗР), другими международными организациями или националь-

МСФМ 27 «Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов» — это руководство по структуре и содержанию диагностических протоколов согласно требованиям МККЗР.

ными организациями по карантину и защите растений (НОКЗР). Затем группа приглашенных авторов, номинированных НОКЗР в ответ на

Рис. 1. Комитет по стандартам в ноябре 2014 года (фото: Симон Грифффи)



объявление Секретариата МККЗР о наборе экспертов соответствующего профиля, отобранных ТГЭДП и утвержденных Комитетом по стандартам МККЗР, разрабатывает проект диагностического протокола. Проект затем изучается ТГЭДП при содействии Секретариата МККЗР, и если проект диагностического протокола одобряется, то его направляют на рассмотрение Комитету по стандартам МККЗР. В соответствии с установленной процедурой перед утверждением все договаривающиеся стороны (страны — члены) МККЗР имеют возможность ознакомиться с этими проектами и представить свои ком-

ментарии. И только затем Комитет по стандартам представляет Комиссии по фитосанитарным мерам проект стандарта с учетом полученных комментариев. Однако для диагностических протоколов было сделано исключение. С 2012 года Комитет по стандартам МККЗР наделен полно-

С 2012 года Комитет по стандартам МККЗР наделен полномочиями утверждать диагностические протоколы от имени КФМ.

мочиями утверждать диагностические протоколы от имени КФМ.

Диагностические протоколы в соответствии с установленной процедурой пересматриваются один раз в пять лет, если не было представлено заявок на пересмотр от заинтересованных сторон. Кроме того, запрос о пересмотре того или иного диагностического протокола может быть представлен НОКЗР, РОКЗР или вспомогательными органами КФМ посредством обращения в Секретариат МККЗР, который, в свою очередь, направляет его в ТГЭДП. ТГЭДП изучает запрос, определяет те диагностические протоколы, которые требуют пересмотра, и контролирует их пересмотр. Новые методы должны быть, по меньшей мере, эквивалентны методам, приведенным в существующем протоколе, или значительно превосходить последние по таким параметрам, как, например, рентабельность, чувствительность

Таблица 1
Стандарты программы работы Технической группы экспертов по диагностическим протоколам, находящиеся на этапе разработки*

№ п/п	Протокол по диагностике	Уровень приоритетности	Статус
1.	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	1	Рекомендован КС для принятия от имени КФМ
2.	<i>Erwinia amylovora</i>	1	Одобен КС для предоставления комментариев странами-членами
3.	<i>Liberibacter solanacearum</i>	1	Собрана группа авторов
4.	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	1	КС рассматривает официальные возражения
5.	Genus <i>Anastrepha</i>	1	Одобен КС для предоставления комментариев странами-членами
6.	Genus <i>Liriomyza</i>	1	Комментарии экспертов рассматриваются ТГЭДП
7.	Терпритиде: Определение плодовых мух, имеющих экономическое значение, на неполовозрелых стадиях развития с помощью молекулярных методов	1	Отложен
8.	<i>Ditylenchus destructor</i> / <i>D. dipsaci</i>	1	Одобен КС для предоставления комментариев странами-членами
9.	<i>Sorghum halepense</i>	1	Комментарии экспертов рассматриваются ТГЭДП
10.	<i>Striga</i> spp.	1	Разрабатывается
11.	Вироид веретеновидности клубней картофеля	1	Направлен КС с комментариями ТГЭДП для утверждения
12.	Вирус пятнистого увядания томатов / Tomato spotted wilt virus (TSWV), Вирус некротической пятнистости бальзамина / <i>Impatiens necrotic spot virus</i> (INSV) и Вирус серебряной крапчатости арбуза / Watermelon silver mottle virus (WSMoV)	1	Разрабатывается
13.	<i>Xyllella fastidiosa</i>	2	Разрабатывается
14.	<i>Liberibacter</i> spp. / <i>Liberobacter</i> spp.	3	Разрабатывается
15.	<i>Phytophthora ramorum</i>	3	Разрабатывается

или специфичность. Любой запрос на пересмотр диагностического протокола должен быть документально обоснован.

По состоянию на ноябрь 2014 года утверждено шесть приложений к МСФМ 27 «Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов», причем три последних диагностических протокола утверждались по упрощенной процедуре – не КФМ, а Комитетом по стандартам:

1. ДП 1: *Thrips palmi* Karny (2010 г.);
2. ДП 2: Вирус шарки слив / Plum rox virus (2012 г.);

3. ДП 3: *Trogoderma granarium* Everts (2012 г.);

4. ДП 4: *Tilletia indica* Mitra (2014 г.);

5. ДП 5: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa на плодах (2014 г.);

6. ДП 6: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (2014 г.).

В настоящее время в программе работы Технической группы экспертов по диагностическим протоколам (ТГЭДП) значится 31 проект стандартов, находящихся на разных этапах разработки (таблица 1).

В мае 2014 года Комитет по стандартам одобрил для консультаций

среди стран-членов 13 проектов МСФМ, в том числе 4 проекта Приложений в МСФМ 27:

- 2004–009: Приложение к МСФМ 27:2006 – *Erwinia amylovora* (Burrill);

- 2004–015: Приложение к МСФМ 27:2006 – Род *Anastrepha*;

- 2004–017: Приложение к МСФМ 27:2006 – *Ditylenchus dipsaci* и *Ditylenchus destructor*;

- 2004–018: Приложение к МСФМ 27:2006 – Фитоплазмы.

В период консультаций, который в 2014 году длился 150 дней с 1 июля по 30 ноября, НОКЗР стран, подпи-

Таблица 1 (Продолжение)
Стандарты программы работы Технической группы экспертов по диагностическим протоколам, находящиеся на этапе разработки*

№ п/п	Протокол по диагностике	Уровень приоритетности	Статус
16.	<i>Puccinia psidi</i>	2	Разрабатывается
17.	<i>Fusarium moniliformis</i> / <i>moniforme</i> syn. <i>F. circinatum</i>	2	Собрана группа авторов
18.	Комплекс <i>Bactrocera dorsalis</i>	2	Разрабатывается
19.	<i>Conotrachelus nenuphar</i>	2	Собрана группа авторов
20.	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	2	Комментарии экспертов рассматриваются ТГЭДП
21.	<i>Aphelenchoides besseyi</i> , <i>A. ritzemabosi</i> и <i>A. fragariae</i>	1	Комментарии экспертов рассматриваются ТГЭДП
22.	Фитоплазмы (общая информация)	4	Одобен КС для предоставления комментариев странами-членами
23.	Вирус тристецы цитрусовых (<i>Citrus tristeza virus</i>)	3	Комментарии экспертов рассматриваются ТГЭДП
24.	Бегомовирусы, переносимые <i>Bemisia tabaci</i>	2	Разрабатывается
25.	<i>Dendroctonus ponderosae</i> syn. <i>Scolytus scolytus</i>	3	Разрабатывается
26.	<i>Anoplophora</i> spp.	3	Разрабатывается
27.	<i>Anguina</i> spp.	3	Собрана группа авторов
28.	<i>Xanthomonas fragariae</i>	4	Комментарии экспертов рассматриваются ТГЭДП
29.	<i>Gymnosporangium</i> spp. (2004-008)	4	Отложен
30.	<i>Anoplophora</i> spp.	4	Разрабатывается
31.	<i>Xiphinema americanum</i>	4	Комментарии экспертов рассматриваются ТГЭДП

* Информация взята из таблицы «Список тем для стандартов МККЗР», обновленной 29 мая 2014 года и размещенной на сайте МККЗР: https://www.ippc.int/sites/default/files/documents/20140623/listoftopicsforippcstandards_en_2014-06-23_201406231718--377.56%20KB.pdf.

савших МККЗР, могли направлять в Секретариат МККЗР свои комментарии по проектам международных стандартов через систему комментирования в режиме онлайн (<http://ocs.ippc.int/>).

Кроме МСФМ, статус международных имеют и региональные стандарты по фитосанитарным мерам (РСФМ), разрабатываемые региональными организациями по карантину и защите растений (РОКЗР). Статьей IX МККЗР определен вклад РОКЗР в достижение целей МККЗР. В обязанности РОКЗР входит, в част-

ности, сотрудничество с Секретариатом МККЗР и КФМ в области разработки стандартов. По определению, РОКЗР — это межправительственная организация, действующая в качестве координационного органа наци-

ональных организаций по карантину и защите растений на региональном уровне. На данный момент существует десять РОКЗР, но разработку региональных стандартов осуществляют только некоторые из них, включая

Кроме МСФМ, статус международных имеют и региональные стандарты по фитосанитарным мерам (РСФМ), разрабатываемые региональными организациями по карантину и защите растений (РОКЗР).

Европейскую и Средиземноморскую организацию по карантину и защите растений (ЕОКЗР), к которой Российская Федерация присоединилась в 1956 году.

В соответствии со Статьей V Конвенции Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР) в ее функции входит разработка принципов и норм применения фитосанитарных мер и региональных стандартов, а также консультирование стран — членом в отношении технических мер, необходимых для предотвращения интродукции и распространения регулируемых вредных организмов, в частности, в отношении досмотра, анализа, сертификации, обработок, обследований и ликвидации. Для реализации этих функций под руководством Рабочей группы по фитосанитарным регламентам работают 20 групп экспертов, занимающихся разработкой региональных стандартов. Подготовкой проектов диагностических протоколов занимаются пять групп экспертов: по диагностике и обеспечению качества, по диагностике вирусов и фитоплазм, по энтомологии, по бактериальным болезням, по диагностике нематод. Кроме того, ежегодно проходят совместные совещания ЕОКЗР и Европейского микологического сообщества, на которых разрабатываются проекты протоколов по диагностике грибных возбудителей болезней растений. А с 2015 года начнет работу новая Группа экспертов ЕОКЗР по микологии.

Проект каждого диагностического протокола готовится одним экспертом в соответствии с утвержденным форматом, чтобы обеспечить наличие всей необходимой информации по выявлению и идентификации конкретного вредного организма. Авторам также рекомендуется по мере возможности предоставлять данные по валидации разных тестов, включенных в диагностические протоколы. Проекты протоколов рассматриваются группами экспертов ЕОКЗР соответствующей направленности, а затем направляются в НОКЗР стран-членов для комментариев. Диагностические протоколы, как и все стандарты ЕОКЗР, утверждаются Советом ЕОКЗР, который проходит ежегодно в сентябре, а затем публикуются в Бюллетене ЕОКЗР.

На сегодняшний день утверждено более ста диагностических протоколов ЕОКЗР, все они относятся к серии РМ 7 «Диагностика». Некоторые были отменены по причине принятия соответствующего международного стандарта по фитосанитарным мерам (МСФМ), например, стандарт

Диагностические протоколы, как и все стандарты ЕОКЗР, утверждаются Советом ЕОКЗР, который проходит ежегодно в сентябре, а затем публикуются в Бюллетене ЕОКЗР.

ЕОКЗР РМ 7/3 по диагностике трипса (Приложение к МСФМ 27: ДП 1: *Thrips palmi* Karny было принято в 2010 г.), или ввиду объединения двух стандартов в один, как в случае с РМ 46 и 47 — сейчас это один стандарт РМ 46 «*Mycosphaerella dearnessii* и *Mycosphaerella pini*».

Работа над новыми стандартами ведется постоянно. В настоящее время Группы экспертов ЕОКЗР разрабатывают проекты протоколов по диагностике *Spodoptera* spp., *Anastrepha obliqua*, *Phytophthora lateralis*. Кроме того, разрабатывается руководство по применению ДНК-баркодирования в качестве инструмента для идентификации регулируемых вредных организмов.

Помимо новых диагностических протоколов осуществляется пересмотр утвержденных стандартов. Сейчас ведется работа по обновлению и дополнению следующих диагностических протоколов: РМ 7/7 (1) *Aleurocanthus spiniferus* и РМ 7/8 (1) *Aleurocanthus woglumi*, РМ 7/18 (2) *Monilinia fructicola*, РМ 7/28 (1) *Synchytrium endobioticum*, РМ 7/29 (2) *Tilletia indica*, РМ 7/4 (3) *Bursaphelenchus xylophilus*, РМ 7/39 (1) *Aphelenchoides besseyi*, РМ 7/40 (3) *Globodera rostochiensis* и *G. pallida*, РМ 7/87 (1) *Ditylenchus destructor* и *Ditylenchus dipsaci* (с целью добавления *D. gigas*), РМ 7/95 (1) *Xiphinema americanum sensu lato*, РМ 7/32 (1) Вирус шарки слив / Plum rox potyvirus, РМ 7/33 (1) Вироид веретеновидности клубней картофеля / Potato spindle tuber viroid.

На Сессии Совета ЕОКЗР, состоявшейся в сентябре 2014 года, были утверждены новые стандарты серии РМ 7: *Pseudomonas syringae* pv.

actinidiae; ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’, ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ и ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’; «Руководство по организации межлабораторных сличительных испытаний, проводимых карантинными фитосанитарными лабораториями», а также пересмо-

тренная версия РМ 7/76 «Использование диагностических протоколов ЕОКЗР».

По сравнению с ЕОКЗР другие РОКЗР не столь активно разрабатывают диагностические протоколы. Так, Североамериканская организация по карантину и защите растений (САОКЗР) в рамках своей стандартизирующей деятельности (Устав САОКЗР, Статья 3) подготовила 40 региональных стандартов, из которых только два диагностических протокола: по вирусу тристецы цитрусовых/ Citrus Tristeza Virus (2013 г.) и болезни позеленения цитрусовых/ Citrus Huanglongbing (2012 г.).

Говоря о стандартах Регионального фитосанитарного комитета Южного Конуса (РФКЮК), следует отметить, в сфере фитосанитарной диагностики разработан один стандарт № 7.2 «Гармонизация процедур и методов диагностики вредных организмов», устанавливающий критерии для гармонизации и принятия процедур и диагностических методов идентификации регулируемых вредных организмов аналитическими лабораториями, аккредитованными НОКЗР и утвержденными РФКЮК.

Работа региональных организаций по карантину и защите растений (РОКЗР) по разработке диагностических протоколов с целью региональной гармонизации подходов к карантинной фитосанитарной экспертизе является крайне востребованной. В рамках международной гармонизации многие региональные стандарты становятся основой для международных протоколов, разрабатываемых под руководством Технической группы экспертов по диагностиче-

ским протоколам Международной конвенции по карантину и защите растений (МККЗР).

Несмотря на усилия мирового сообщества, международных и региональных диагностических протоколов, тем не менее, недостаточно, чтобы обеспечить качественное

В течение последних двадцати лет мировое сообщество сделало значительный шаг к созданию гармонизированной международной системы утверждения и пересмотра диагностических протоколов.

функционирование карантинных фитосанитарных лабораторий. Во исполнение своих обязательств согласно статье IV МККЗР (1997 год), в частности в отношении надзора, досмотров импортируемой продукции и экспортной сертификации, национальные организации по карантину и защите растений (НОКЗР) разрабатывают протоколы по диагностике регулируемых вредных организмов.

Деятельность по разработке и применению национальных диагностических протоколов не противоречит требованиям СФС-Соглашения ВТО, поскольку пунктом 3 статьи 3 определяется, что «страны-члены могут вводить или сохранять в силе санитарные или фитосанитарные меры, которые обеспечивают более высокий уровень санитарной или фитосанитарной защиты, чем меры на базе соответствующих международных стандартов, руководств или рекомендаций, если имеется соответствующее научное обоснование, или если страна-член определяет, что этот уровень санитарной или фитосанитарной защиты является надлежащим согласно соответствующим положениям пунктов 1-8 статьи 5». Надежность и достоверность диагностики, проведенной с использованием национального диагностического протокола, обеспечивается существующими в стране официальными процедурами утверждения и пересмотра такого рода документов, а также обеспечением контроля качества в карантинных фитосанитарных лабораториях.

Вне зависимости от исторически сложившихся национальных систем фитосанитарной диагностики все

страны стремятся к стандартизации подходов к диагностическим протоколам. Работа по гармонизации и формализации подходов к диагностике как карантинных, так и некарантинных вредных организмов растений ведется на уровне стран, экономических союзов и междуна-

родных организаций. Примечательно, что Секретариат Международной конвенции по карантину и защите растений с целью оказания содействия странам — членам по обмену опытом в сфере фитосанитарной диагностики на Международном фитосанитарном портале создал страницу (<http://www.phyto sanitary.info/tag/diagnostic-protocols>), где можно найти базу данных диагностических протоколов, которыми национальные организации по карантину и защите растений стран — членом МККЗР или региональные организации по карантину и защите растений решили поделиться со своими коллегами.

В течение последних двадцати лет мировое сообщество сделало значительный шаг к созданию гармонизированной международной системы утверждения и пересмотра диагностических протоколов. Конечно, еще предстоит многое сделать как каждой отдельно взятой стране, так и международным организациям, но все приложенные усилия по приданию официального статуса и унификации подходов к диагностике карантинных вредных организмов растений уже принесли много положительных результатов. Это и международные и региональные диагностические протоколы, и базы данных по карантинным вредным организмам с описанием морфологических и генетических характеристик, и системы установления и обеспечения надежности и достоверности методов диагностики, а также новейшие разработки и технологии, используемые для проведения диагностики в поле или в пунктах пропуска на границе.

Ссылки

1. Соглашение ВТО по применению санитарных и фитосанитарных мер (1994 г.), http://www.wto.org/english/docs_e/legal_e/15-sps.pdf.

2. Международная конвенция по карантину и защите растений, ФАО, Рим, 1997 г., <https://www.ippc.int/about/convention-text>.

3. Международный стандарт по фитосанитарным мерам (МСФМ) № 27 «Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов», ФАО, Рим, 2006 г., <https://www.ippc.int/publications/diagnostic-protocols-regulated-pests>.

4. Международный стандарт по фитосанитарным мерам (МСФМ) № 4 «Требования по установлению свободных зон», ФАО, Рим, 1995 г., <https://www.ippc.int/publications/requirements-establishment-pest-free-areas>.

5. Международный стандарт по фитосанитарным мерам (МСФМ) № 6 «Руководство по надзору», ФАО, Рим, 1997 г., <https://www.ippc.int/publications/guidelines-surveillance>.

6. Международный стандарт по фитосанитарным мерам (МСФМ) № 7 «Система фитосанитарной сертификации», ФАО, Рим, 2011 г., <https://www.ippc.int/publications/phyto sanitary-certification-system>.

7. Международный стандарт по фитосанитарным мерам (МСФМ) № 9 «Руководство по программам ликвидации вредных организмов», ФАО, Рим, 1998 г., <https://www.ippc.int/publications/guidelines-pest-eradication-programmes>.

8. Международный стандарт по фитосанитарным мерам (МСФМ) № 20 «Руководство по фитосанитарной системе регламентации импорта», ФАО, Рим, 2004 г., <https://www.ippc.int/publications/guidelines-phyto sanitary-import-regulatory-system>.

9. «Руководство для авторов диагностических протоколов», МККЗР, ФАО, Рим, 2014 г., <https://www.ippc.int/publications/tp-diagnostic-protocols-instructions-authors-diagnostic-protocols>.

10. Официальная веб-страница Технической группы экспертов по диагностическим протоколам (ТГЭДП), МККЗР, ФАО, Рим, <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/expert-drafting-groups/technical-panels/technical-panel-diagnostic-protocols>.

11. Официальная веб-страница Комитета по стандартам (КС), МККЗР, ФАО, Рим, <https://www.ippc.int/sc>.

12. Доклад о работе девятой сессии Комиссии по фитосанитарным мерам, 31 марта – 4 апреля 2014 г., ФАО, Рим, <https://www.ippc.int/publications/cpm-9-final-report-updated-version-posted-23-september-2014>.

13. Официальный веб-сайт Европейской и Средиземноморской орга-

Рис. 2. Техническая группа экспертов по диагностическим протоколам МККЗР в штаб-квартире ЕОКЗР, Париж, Франция, июнь 2014 г. (фото: Секретариат МККЗР)

низации по карантину и защите растений (ЕОКЗР), <http://www.eppo.int>.

14. Конвенция о создании Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР), Париж, Франция, 1951 г. с поправками от 1995 г., 1962 г., 1968 г., 1973 г., 1982 г., 1988 г., 1999 г., http://www.eppo.int/ABOUT_EPPPO/convention/convention.htm.

15. Официальный веб-сайт Североамериканской организации по карантину и защите растений (САОКЗР), <http://www.narpo.org>.

16. Официальный веб-сайт Регионального фитосанитарного комите-

та Южного Конуса (РФКЮК), <http://www.cosave.org>.

17. J.D. Janse «Стандартизация, валидация и утверждение методов диагностики карантинных видов бактерий: примеры гармонизации в фитосанитарных лабораториях Европы» / Standardization, Validation and Approval of Test Methods for Quarantine Bacteria: Examples of Harmonization in Plant Health Laboratories in Europe, *Phytopathol. Pol.* 35: 19-27, The Polish Phytopathological Society / Польское общество фитопатологов, Poznań / Познань, 2005 г.

International Approaches to Development and Application OF DIAGNOSTIC PROTOCOLS

Aksana Drenova, Head of FGBU VNIKR's International and WTO-related Issues Department

Fig. 2. IPPC Technical Panel on Diagnostic Protocols at EPPPO Headquarters, Paris, France, June 2014 (Courtesy: IPPC Secretariat)



Diagnostic protocols as standards for phytosanitary diagnostics are developed for universal and repeated application. The process of standardization has a hierarchic character and takes place on both international and national levels.

The WTO Agreement on the application of sanitary and phytosanitary measures (SPS Agreement) especially highlights the role of international standards (Article 3. Harmonization) in establishing a multilateral system of rules and disciplines regulating the development, adoption and implementation of sanitary and phytosanitary measures in order to minimize their negative effects on trade. In this regard, the SPS Agreement defines the International Plant Protection Convention (IPPC) as an international standard setting organization in the field of plant protection. And the standards developed within the framework of IPPC are recommended to WTO members for protecting plant resources from plant pests and diseases, with no hindrances to international trade occurring. In fact, these are the international standards for phytosanitary measures (ISPMs) that justify the application of phytosanitary measures and prevent their being used as barriers to international trade. Thus, ISPMs including standards, guidelines and recommendations are an accepted basis for the implementation of phytosanitary measures by WTO member countries under the Agreement on the

application of sanitary and phytosanitary measures.

Since the establishment of the IPPC in 1952, its Secretariat has been coordinating development of ISPMs including diagnostic protocols. International standards for phytosanitary measures are approved by the Convention's governing body — Commission on Phytosanitary Measures (CPM). Its sessions are held annually in March or April, with the FAO headquarters in Rome, Italy, being the venue. Currently, 36 ISPMs are adopted, of which only one — ISPM 27 — is directly related to enabling the satisfaction of requirements for reliable and valid diagnostics of quarantine plant pests.

ISPM 27 *Diagnostic protocols for regulated pests* provides guidance on the structure and content of diagnostic protocols in accordance with the IPPC requirements. The standard establishes minimum requirements for the quality of diagnosis given the fact that detection and correct identification of a pest are the key factors for the appropriate application of phytosanitary measures (as indicated in ISPM 4:1995, ISPM 6:1997, ISPM 7:2011, ICPM 9:1998, and ISPM 20: 2004. Most specifically, the IPPC contracting parties (countries who signed the Convention) need adequate diagnostic procedures for determining the pest status and fulfilling pest reporting obligations under ISPM 8:1998 and ISPM 17:2002, as well

as for detection and identification of pests in imported consignments (ISPM 13:2001).

Diagnostic protocols are intended for use by laboratories in the course of routine pest diagnostics within the framework of the system for implementation of phytosanitary measures. This is one of the reasons for their regular revisions in accordance with the IPPC, so that amendments, updates and research developments are included. An approved procedure is in place for preparation, revision and publication of these protocols.

In 2004, the IPPC Technical panel on diagnostic protocols (TPDP) was established. It consists of experts in bacteriology, mycology, entomology, nematology and virology. The TPDP's tasks include choosing topic priorities for protocols on specific species or group of species, identifying experts who will be developing them and supervising their work. This is done as follows: the TPDT asks one of its members to lead the development of a diagnostic protocol adjusting, if necessary, protocols that have already been adopted by Regional Plant Protection Organizations (RPPOs), other international organizations or National Plant Protection Organizations (NPPOs). Then, a group of authors nominated by their NPPOs in response to the IPPC call for specialists with specific expertise, selected by the TPDP and approved by the IPPC Standards Committee develops a draft diagnostic protocol. The draft protocol is then considered by the TPDT, with the IPPC Secretariat being involved. If the draft diagnostic protocol is approved, it is submitted to the IPPC Standards Committee (SC) for revision. In accordance with the established procedure, all IPPC contracting

The standards developed within the framework of IPPC are recommended to WTO members for protecting plant resources from plant pests and diseases, with no hindrances to international trade occurring.

parties have the opportunity to review the draft and comment on it before its final approval. Only then, comments taken into account, the Standards Committee submits the draft standard to the Commission on Phytosanitary Measures (CPM). However, diagnostic protocols don't take the bitten track. Since 2012, the IPPC Standards Committee has been enjoying the authority to approve diagnostic protocols on behalf of the CPM.

The established procedure determines the revision of diagnostic protocols to take place once in five years if no stakeholders make any requests to do it ahead of time. Moreover, a request to revise a diagnostic protocol can be submitted by an NPPO, RPPO or CPM subsidiary bodies through contacting the IPPC Secretariat, who, in their turn, forward the request to the TPDP. The TPDP studies the request, identifies diagnostic protocols to be revised and

ISPM 27 Diagnostic protocols for regulated pests provides guidance on the structure and content of diagnostic protocols in accordance with the IPPC requirements.

supervises the revision process. New diagnostic methods to be included into diagnostic protocols should be at least equivalent to the methods described in the existing protocol or considerably exceed the latter in cost efficiency, sensitivity or specificity. Any request for the revision of a diagnostic protocol should be technically justified.

As of November 2014, six Annexes to ISPM 27 *Diagnostic protocols for regulated pests* have been adopted. The last three diagnostic protocols were approved by the Standard Committee on behalf of the CPM in accordance with the simplified procedure:

1. DP 1: *Thrips palmi* Karny (2010);
2. DP 2: Plum pox virus (2012);
3. DP 3: *Trogoderma granarium* Everts (2012);
4. DP 4: *Tilletia indica* Mitra (2014);
5. DP 5: *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa on fruit (2014);
6. DP 6: *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (2014).

At present, the Technical panel on diagnostic protocols (TPDP) has 31 draft standards on its agenda (Table 1).

In May 2014, the Standards Committee approved for member consultations

13 draft ISPMs including 4 draft Annexes to ISPM 27:

- 2004-009: Annex to ISPM 27:2006 — *Erwinia amylovora* (Burrill);
- 2004-015: Annex to ISPM 27:2006 — Genus *Anastrepha*;
- 2004-017: Annex to ISPM 27:2006 — *Ditylenchus dipsaci* and *Ditylenchus destructor*;
- 2004-018: Annex to ISPM 27:2006 — Phytoplasmas.

The member consultation period in 2014 lasted 150 days — from 1 June till 30 November. The NPPOs of the IPPC contracting parties could send their comments on draft international standards to the IPPC Secretariat using the IPPC online comment system (<http://ocs.ippc.int/>).

Beside ISPMs, the international status is also enjoyed by Regional Standards for Phytosanitary Measures (RSPMs) developed by Regional Plant Protection Organizations (RPPOs). IPPC's Article

IX identifies the contribution of RPPOs in achieving the objectives of the Convention. The responsibilities of RPPOs include, but are not limited to cooperation with the IPPC Secretariat and CPM in developing international standards. By definition, a Regional Plant Protection Organization is an intergovernmental organization functioning as the coordination body for National Plant Protection Organizations on the level of the FAO region it covers. Currently, there are ten RPPOs, with only some of them developing regional standards. The European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), joined by the Russian Federation in 1956, is among the latter.

Under Article V of the EPPO Convention, the functions of the Organization include developing principles of good practice in the application of phytosanitary measures and regional standards, as well as advising member countries on technical measures necessary to prevent the introduction and spread of regulated pests, particularly measures for inspection and testing, certification, treatment, survey and eradication. For these functions to be carried out, the

Since 2012, the IPPC Standards Committee has been enjoying the authority to approve diagnostic protocols on behalf of the CPM.

Working Party on Phytosanitary Regulations directs 20 Panels engaged in the process of developing regional standards. Diagnostic protocols fall within the scope of activities of five Panels: on diagnostics and quality assurance, on diagnostics in virology and phytoplasmaology, on diagnostics in entomology, on diagnostics in bacteriology, and on diagnostics in nematology. Moreover, annual meetings held jointly by EPPO and the European Mycological Network provide for the development of draft diagnostic protocols for plant diseases caused by fungal pathogens. And, in 2015, a new EPPO Panel — Panel on Diagnostics in Mycology will have the first meeting.

A draft diagnostic protocol is prepared by one expert following the approved format to include all the required information on detection and identification of a specific pest. Authors are also recommended, whenever possible, to provide data on validation of tests mentioned in diagnostic protocols. Drafts are reviewed by specific EPPO Panels and then send to EPPO member countries for consultations. Diagnostic protocols along with other EPPO standards are approved by the EPPO Council meeting annually in September and subsequently published in the EPPO Bulletin.

Today, over 100 EPPO diagnostic protocols have been approved, they all belong to the series PM 7 *Diagnostics*. Some diagnostic protocols were withdrawn after the adoption of the relevant international standard for phytosanitary measures (ISPM), as is the case with EPPO Standard PM 7/3 *Thrips palmi* (Annex to ISPM 27: DP 1: *Thrips palmi* Karny was adopted in 2010), or after two standards were combined into one, as is the case with PM 46 and 47 — now it is one EPPO Standard PM 46 «*Mycosphaerella dearnessii* and *Mycosphaerella pini*».

New standards are continuously drafted. At present, the EPPO Panels develop draft diagnostic protocols for *Spodoptera*

Table 1. Draft Diagnostic Protocols Being Developed by the TPDP*

Nº	Diagnostic protocol	Priority	Status
1.	<i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i>	1	Draft DP recommended by TPDP to SC for adoption on behalf of the CPM
2.	<i>Erwinia amylovora</i>	1	Draft DP approved by SC for member consultations
3.	<i>Liberibacter solanacearum</i>	1	Authors called
4.	<i>Phyllosticta citricarpa</i>	1	SC reviewing formal objection
5.	Genus <i>Anastrepha</i>	1	Draft DP approved by SC for member consultations
6.	Genus <i>Liriomyza</i>	1	Expert comments on draft DP being reviewed by TPDP
7.	Tephritidae: Identification of immature stages of fruit flies of economic importance by molecular techniques	1	Pending
8.	<i>Ditylenchus destructor</i> / <i>D. dipsaci</i>	1	Draft DP approved by SC for member consultations
9.	<i>Sorghum halepense</i>	1	Expert comments on draft DP being reviewed by TPDP
10.	<i>Striga</i> spp.	1	Draft DP under development
11.	Potato spindle tuber viroid	1	Draft DP with TPDP comments to SC for approval
12.	Tomato spotted wilt virus (TSWV), Impatiens necrotic spot virus (INSV) and Watermelon silver mottle virus (WSMoV)	1	Draft DP under development
13.	<i>Xylella fastidiosa</i>	2	Draft DP under development
14.	<i>Liberibacter</i> spp. / <i>Liberobacter</i> spp.	3	Draft DP under development
15.	<i>Phytophthora ramorum</i>	3	Draft DP under development
16.	<i>Puccinia psidi</i>	2	Draft DP under development
17.	<i>Fusarium moniliformis</i> / <i>moniforme</i> syn. <i>F. circinatum</i>	2	Authors called
18.	<i>Bactrocera dorsalis</i> complex	2	Draft DP under development
19.	<i>Conotrachelus nenuphar</i>	2	Authors called
20.	<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	2	Expert comments on draft DP being reviewed by TPDP
21.	<i>Aphelenchoides besseyi</i> , <i>A. ritzemabosi</i> and <i>A. fragariae</i>	1	Expert comments on draft DP being reviewed by TPDP
22.	Phytoplasmas (general)	4	Draft DP approved by SC for member consultations
23.	Citrus tristeza virus	3	Expert comments on draft DP being reviewed by TPDP
24.	Begomoviruses transmitted by <i>Bemisia tabaci</i>	2	Draft DP under development
25.	<i>Dendroctonus ponderosae</i> syn. <i>Scolytus scolytus</i>	3	Draft DP under development
26.	<i>Anoplophora</i> spp.	3	Draft DP under development
27.	<i>Anguina</i> spp.	3	Authors called
28.	<i>Xanthomonas fragariae</i>	4	Expert comments on draft DP being reviewed by TPDP
29.	<i>Gymnosporangium</i> spp. (2004-008)	4	Pending
30.	<i>Anoplophora</i> spp.	4	Draft DP under development
31.	<i>Xiphinema americanum</i>	4	Expert comments on draft DP being reviewed by TPDP

* The information is extracted from the *List of topics for IPPC standards* last updated on 29 May 2014 and found on the IPPC web-site: https://www.ippc.int/sites/default/files/documents/20140623/listoftopicsforippcstandards_en_2014-06-23_201406231718--377.56%20KB.pdf.

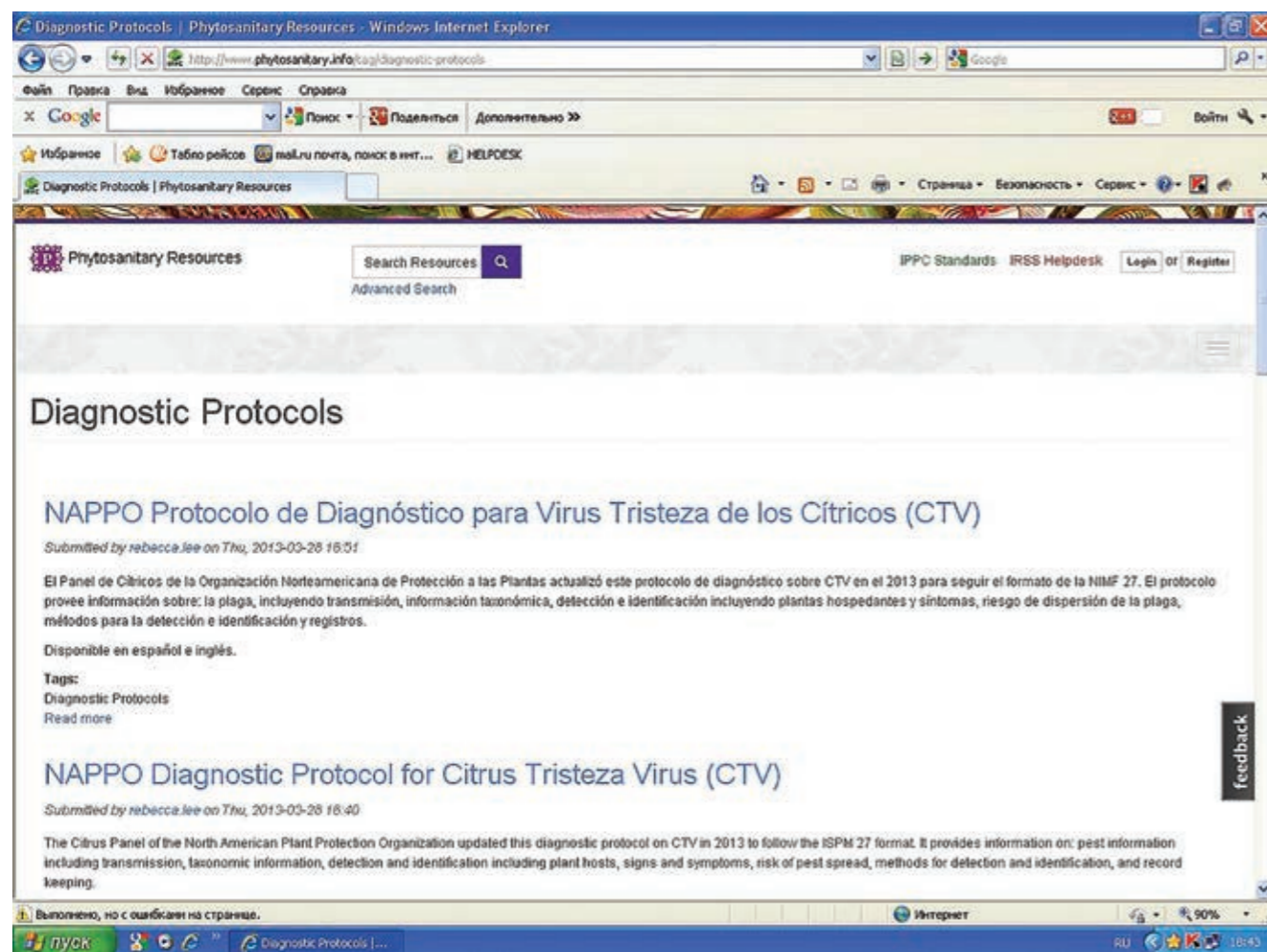


Fig. 3. The page with diagnostic protocols on the International Phytosanitary Portal (Source: <http://www.phytosanitary.info/tag/diagnostic-protocols>)

Рис. 3. Интерфейс страницы Международного фитосанитарного портала с базой данных по диагностическим протоколам (источник: <http://www.phytosanitary.info/tag/diagnostic-protocols>)

spp., *Anastrepha obliqua*, *Phytophthora lateralis*. Besides, guidelines are being developed on using DNA Barcoding for diagnostics of regulated pests.

Apart from drafting new diagnostic protocols, EPPO regularly revises adopted standards. Now, the following diagnostic protocols are being updated and amended: PM 7/7 (1) *Aleurocanthus spiniferus*, PM 7/8 (1) *Aleurocanthus woglumi*, PM 7/18 (2) *Monilinia fructicola*, PM 7/28 (1) *Synchytrium endobioticum*, PM 7/29 (2) *Tilletia indica*, PM 7/4 (3) *Bursaphelenchus xylophilus*, PM 7/39 (1) *Aphelenchoides besseyi*, PM 7/40 (3) *Globodera rostochiensis* and *G. pallida*, PM 7/87 (1) *Ditylenchus destructor* and *Ditylenchus dipsaci* (to add *D. gigas*), PM 7/95 (1) *Xiphinema americanum sensu lato*, PM 7/32 (1) Plum pox potyvirus, and PM 7/33 (1) Potato spindle tuber viroid.

During its session in September 2014, the EPPO Council approved new diagnostic protocols — *Pseudomonas*

syringae pv. *actinidiae*, ‘*Candidatus Liberibacter africanus*’, ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ and ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, and *Guidelines for the organization of interlaboratory comparisons by plant pest diagnostic laboratories*, and the revision of PM 7/76 *Use of EPPO diagnostic protocols*.

Beside ISPMs, the international status is also enjoyed by Regional Standards for Phytosanitary Measures (RSPMs) developed by Regional Plant Protection Organizations (RPPOs).

Other RPPOs are not as efficient as EPPO in producing diagnostic protocols. For instance, the North American Plant Protection Organization (NAPPO) has prepared 40 regional standards within the framework of its standard setting activities (Article 3, NAPPO Constitution), with only two diagnostic protocols devel-

oped — for Citrus Tristeza Virus (2013) and Citrus Huanglongbing (2012).

COSAVE’s standard setting touch upon phytosanitary diagnostics only in Standard 7.2 *Harmonization of analytical procedures and methods for diagnosis of pests* (*Armonización de procedimientos y métodos analíticos para plagas*)

establishing criteria for harmonizing and implementing procedures and diagnostic methods for identification of regulated pests by analytical laboratories accredited by NPPOs and COSAVE.

Efforts taken by Regional Plant Protection Organizations (RPPOs) in developing diagnostic protocols for the

Diagnostic protocols along with other EPPO standards are approved by the EPPO Council meeting annually in September and subsequently published in the EPPO Bulletin.

sake of harmonized regional approach to plant quarantine diagnostics are of vital importance. Within the framework of global harmonization many regional standards serve as the basis for international protocols developed under the leadership of the IPPC Technical panel on diagnostic protocols.

Notwithstanding the global community involvement, the number of international and regional diagnostic protocols is insufficient to meet the need for quality performance of plant health laboratories. In pursuance to fulfill the obligations stipulated in Article IV of the IPPC (1997), in particular with regard to surveillance, inspection of imported goods and export certification, National Plant Protection Organizations (NPPOs) develop their own diagnostic protocols for regulated pests.

Implementation of national diagnostic protocols is in line with the provisions of the WTO SPS-Agreement. Article 3.3 of this Agreement states that “members may introduce or maintain sanitary or phytosanitary measures which result in a higher level of sanitary or phytosanitary protection than would be achieved by measures based on the relevant international standards, guidelines or recommendations, if there is a scientific justification, or as a consequence of the level of sanitary or phytosanitary protection a Member determines to be appropriate in accordance with the relevant provisions of paragraphs 1 through 8 of Article 5”. Reliability and accuracy of diagnostics using national diagnostic protocols is ensured by the country’s official procedures in place for approval and revision of such documents as well as by quality control at plant health laboratories.

Regardless of traditional national plant health diagnostic systems, all countries favour standardized approaches to diagnostic protocols. Efforts to harmonize and formalize diagnostics of both quarantine and

non-quarantine plant pests are taken by countries, economic unions and international organizations. It is worth mentioning that, in order to assist countries to exchange their experience in plant health diagnostics, the Secretariat of the International Plant Protection Convention launched a web-page at the International Phytosanitary Portal (<http://www.phytosanitary.info/tag/diagnostic-protocols>) featuring the database on diagnostic protocols shared by Regional and National Plant Protection Organizations.

Over the past twenty years, the world community made a huge step to setting up a harmonized international system for approval and revision of diagnostic protocols. Undoubtedly, a lot is still to be done by each and every country and international organization; however, all endeavors to formalize and unify approaches to plant health diagnostics have already brought forth quite a number of positive results. The accomplishments include international and regional diagnostic protocols, databases on quarantine pests with morphological and genetic details, diagnostic method validation systems, and up-to-date developments and technologies used for conducting onsite diagnostics in fields and at border entry points.

References

1. WTO Agreement on the application of sanitary and phytosanitary measures (1994), http://www.wto.org/english/docs_e/legal_e/15-sps.pdf.
2. International Plant Protection Convention, FAO, Rome, 1997, <https://www.ippc.int/about/convention-text>.
3. International Standard for Phytosanitary Measures (ISPM) 27. *Diagnostic protocols for regulated pests*. FAO, Rome, 2006, <https://www.ippc.int/publications/diagnostic-protocols-regulated-pests>.
4. International Standard for Phytosanitary Measures (ISPM) 4. *Requirements for the establishment of pest free areas*. FAO, Rome, 1995, <https://www.ippc.int/publications/requirements-establishment-pest-free-areas>.
5. International Standard for Phytosanitary Measures (ISPM) 6. *Guidelines for surveillance*. FAO, Rome, 1997, <https://www.ippc.int/publications/guidelines-surveillance>.
6. International Standard for Phytosanitary Measures (ISPM) 7. *Export certification system*. FAO, Rome, 2011,

<https://www.ippc.int/publications/phytosanitary-certification-system>.

7. International Standard for Phytosanitary Measures (ISPM) 9. *Guidelines for pest eradication programmes*. FAO, Rome, 1998, <https://www.ippc.int/publications/guidelines-pest-eradication-programmes>;

8. International Standard for Phytosanitary Measures (ISPM) 20. *Guidelines for a phytosanitary import regulatory system*. FAO, Rome, 2004, <https://www.ippc.int/publications/guidelines-phytosanitary-import-regulatory-system>.

9. *Instructions to authors. Diagnostic protocols for regulated pests*. IPPC, FAO, Rome, 2014, <https://www.ippc.int/publications/tp-diagnostic-protocols-instructions-authors-diagnostic-protocols>.

10. The official web-page of the Technical panel on diagnostic protocols (TPDP), IPPC, FAO, Rome, <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/expert-drafting-groups/technical-panels/technical-panel-diagnostic-protocols>.

11. The official web-page of the Standards Committee (SC), IPPC, FAO, Rome, <https://www.ippc.int/sc>.

12. CPM-9 Final Report, 31 March – 4 April 2014, FAO, Rome, <https://www.ippc.int/publications/cpm-9-final-report-updated-version-posted-23-september-2014>.

13. The official web-site of the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), <http://www.eppo.int>.

14. Convention for the establishment of the European and Mediterranean Plant Protection Organization, Paris, France, 1951 as amended in 1995, 1962, 1968, 1973, 1982, 1988, and 1999, http://www.eppo.int/ABOUT_EPPO/convention/convention.htm.

15. The official web-site of the North-American Plant Protection Organization (NAPPO), <http://www.nap-po.org>.

16. The official web-site of Comite Regional de Sanidad Vegetal del Cono Sur (COSAVE), <http://www.cosave.org>.

17. J.D. Janse. Standardization, Validation and Approval of Test Methods for Quarantine Bacteria: Examples of Harmonization in Plant Health Laboratories in Europe, *Phytopathol. Pol.* 35: 19–27, The Polish Phytopathological Society, Poznań, 2005.

ИССЛЕДОВАНИЕ УСЛОВИЙ ПОДГОТОВКИ И ХРАНЕНИЯ ОБРАЗЦОВ

для проведения межлабораторных сличительных испытаний по выявлению и идентификации возбудителя бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum*

Е.С. Мазурин, заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР»

И.О. Камаев, начальник научно-экспериментального отдела ФГБУ «ВНИИКР»

М.Г. Кабдулова, научный сотрудник научно-экспериментального отдела ФГБУ «ВНИИКР»

М.Б. Копина, старший научный сотрудник лаборатории микологии ИЭЦ ФГБУ «ВНИИКР»

Г.Н. Матяшова, младший научный сотрудник научно-экспериментального отдела ФГБУ «ВНИИКР»

Межлабораторные сличительные испытания (МСИ) позволяют дать объективную и независимую оценку компетентности лабораторий на основе проведения испытаний одних и тех же объектов по определенному набору контролируемых показателей в соответствии с заранее установленными условиями [6]. Регулярное участие в МСИ является необходимым требованием для аккредитации любых испытательных лабораторий [1].

Для диагностических центров системы карантина растений в первую очередь имеет значение точность определения видовой принадлежности карантинных вредных организмов, что может быть проверено в ходе МСИ с использованием контрольных образцов. Контрольные образцы представляют собой точно идентифицированный целый организм (например, насекомые, семена растений) или его части (экстракты бактериальных культур, мицелий грибов и др.), лишенные жизнеспособности. Последнее позволяет отправлять образцы в лаборатории без фитосанитарных ограничений. Если подготовка энтомологического материала не вызывает особых сложностей, то для исследования бактерий необходимо проведение комплекса мероприятий, включающего лишение жизнеспособности клеток, их

подготовку и хранение для последующего выявления и идентификации.

Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi et al., 1996 относится к числу карантинных вредных организмов для многих стран, включая и Россию. Данный патоген может причинять значительный экономический ущерб, снижая урожай картофеля на 40% и вызывая более 50% потерь клубней при хранении [3]. Интродукция *R. solanacearum* в новые регионы чаще всего происходит с семенным и продовольственным картофелем, зараженным бактериальной инфекцией, в том числе и в латентном состоянии, что требует применения надежных методов диагностики патогена.

Трудности выделения и исследования биологических свойств изолятов *R. solanacearum*, а также быстрая потеря этим микроорганизмом патогенных свойств осложняют работу специалистов по выявлению этого возбудителя. Среди методов идентификации возбудителя бурой бактериальной гнили наиболее точными, оперативными и чувствительными являются молекулярно-генетические методы, например полимеразная цепная реакция (ПЦР). К настоящему времени не существует требова-

ний или стандартов, в которых перечислялись бы условия подготовки и хранения контрольных образцов *R. solanacearum* для проведения МСИ в специализированных лабораториях. Кроме этого, контрольные образцы должны быть стабильными, обеспечивая сохранение свойств матрицы ДНК и исследуемого объекта в течение времени, необходимого для доставки проб и проведения исследований.

Все вышеперечисленное определило цель настоящей работы — исследование условий подготовки, хранения и отправки контрольных образцов для проведения межлабораторных сличительных испытаний по выявлению и идентификации возбудителя бурой гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* с помощью молекулярных методов. Важнейшими факторами, влияющими на качество контрольных образцов, являются метод лишения жизнеспособности клеток возбудителя, добавление экстракта растения-хозяина, концентрация клеток возбудителя, температура и длительность хранения.

Материалы и методы

В работе использовали штамм *Ralstonia solanacearum* VNIICR FRs14 из коллекции ФГБУ «ВНИИКР». Возбудителя бурой гнили картофеля вы-

ращивали на селективной питательной среде SMSA [8]. Пробоподготовку клубней картофеля проводили согласно СТО ВНИИКР 4.009-2011.

Количественную оценку содержания бактериальных клеток *R. solanacearum* проводили с помощью метода серийных разведений. Для этого суспендировали петлю суточной культуры возбудителя в 1000 мкл 0,01 М стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS) и готовили серию 10-кратных разведений, последовательно перенося 100 мкл предыдущего разведения к 900 мкл PBS. Далее в двукратной повторности проводили посев 100 мкл суспензии из каждой пробирки на среду SMSA в чашки Петри для подсчета числа колониеобразующих единиц (КОЕ).

Растительный экстракт с известным содержанием КОЕ патогена готовили аналогично: перенося 100 мкл бактериальной суспензии к 900 мкл экстракта клубней картофеля.

Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi et al., 1996 относится к числу карантинных вредных организмов для многих стран, включая и Россию. Данный патоген может причинять значительный экономический ущерб, снижая урожай картофеля на 40% и вызывая более 50% потерь клубней при хранении [3].

Подсчет КОЕ для каждого разведения культуры *Ralstonia solanacearum* проводили на 6-й день после посева двумя способами: визуально и с помощью автоматического счетчика

колоний Scan 300. Количество КОЕ культуры исследуемого штамма *R. solanacearum* в серии 10-кратных разведений варьировало в 1 мл от 3×10^7 до 3×10^1 .

Рис. 1. Симптомы поражения картофеля, зараженного бурой гнилью *Ralstonia solanacearum*: а) внешний вид пораженного растения; б) поражение клубня; в) поражение проводящей системы стебля картофеля (eppo.org, extention.ru, agroaltas.ru)

Fig. 1. Symptoms of potato brown rot: а) a damaged plant; б) a damaged tuber; в) damage caused to the potato stem vascular tissue (eppo.org, extention.ru, agroaltas.ru)



Исследование возможности лишения жизнеспособности клеток патогена с сохранением целевой ДНК для диагностики методом ПЦР «в реальном времени» проводили с помощью вакуумной сушки на центрифужном испарителе Eppendorf Concentrator Plus в течение двух часов при 60 °С. Определяли также возможное влияние картофельного экстракта на результаты опыта. Для этого использовали 100 мкл чистой культуры *R. solanacearum* с различной концентрацией клеток в 1х фосфатном буфере (PB) и суспензии картофельного экстракта с чистой культурой *R. solanacearum* с той же концентрацией клеток. Для этого готовили серию разведений *R. solanacearum*. Из каждого разведения отбирали 100 мкл в двукратной повторности: на прямой посев и для вакуумной сушки. После высушивания к образцу добавляли 100 мкл стерильной воды, выдерживали в течение 30 минут при температуре +4 °С и проводили посев. Результаты жизнеспособности патогена определяли на 4-й день после посева.

Для определения влияния вакуумной сушки на результаты ПЦР «в реальном времени» при диагностике *R. solanacearum* из каждого серийного разведения отбирали 100 мкл для выделения ДНК и 100 мкл на проведение вакуумной сушки, с последующим выделением ДНК. Экстракцию ДНК проводили из всех образцов (без и после вакуумной сушки, без и с картофельным экстрактом) на автоматической станции выделения нуклеиновых кислот TECAN, Freedom Evo с использованием магнитных частиц («М-Сорб ТУБ Автомат», ЗАО «Синтол», Москва).

Реакционная смесь для постановки ПЦР «в реальном времени» состояла из: 1X Master Mix («Диалат», Москва); 10 пкМ каждого из праймеров (B2F/B2R); зонда, меченного флуоресцентным красителем ROX (3,75 пМ B2P); 2,0 мкл ДНК образца и стерильной воды до 25 мкл.

ПЦР «в реальном времени» проводили на амплификаторе BioRad IQ5 при следующих температурно-временных параметрах амплификации: 10 мин при 95 °С; 40 циклов: 15 с при 95 °С, 1 мин при 60 °С. Интегральным результатом ПЦР «в реальном времени» является значение порогового цикла, обозначаемое как C_t [5].

Таблица 1. Чувствительность метода ПЦР «в реальном времени» для образцов чистой культуры *R. solanacearum* после вакуумной сушки и без нее

Количество КОЕ в 1 мл	Значение C_t		ΔC_t
	Вакуумная сушка	Без вакуумной сушки	
3×10^7	24,2	23,1	1,1
3×10^6	27,4	25,9	1,5
3×10^5	31,3	29,4	1,9
3×10^4	33,1	32,3	0,8
3×10^3	36,3	34,8	1,5
3×10^2	36,6	35,1	1,5
3×10^1	36,9	35,3	1,6
3×10^0	37,0	36,9	0,1

Показана возможность выявления и идентификации возбудителя бурой гнили картофеля, лишённого жизнеспособности после вакуумной сушки, с применением молекулярных методов.

Дальнейший эксперимент проводили с образцами разведений культуры в известной концентрации, смешанными с картофельным экстрактом. Для получения суспензии

R. solanacearum с экстрактом картофеля в известной концентрации из первого разведения приготовленной суспензии возбудителя (3×10^7 клеток в 1 мл 0,01 М стерильного PBS)

Рис. 2. Внешний вид колоний *R. solanacearum*, выращенной на среде SMSA (коллекция ФГБУ «ВНИИКР», фото Г.Н. Дудченко)

Fig. 2. Colonies of *R. solanacearum* cultured in SMSA (FGBU VNIICR's collection, photo by G.N. Dudchenko)

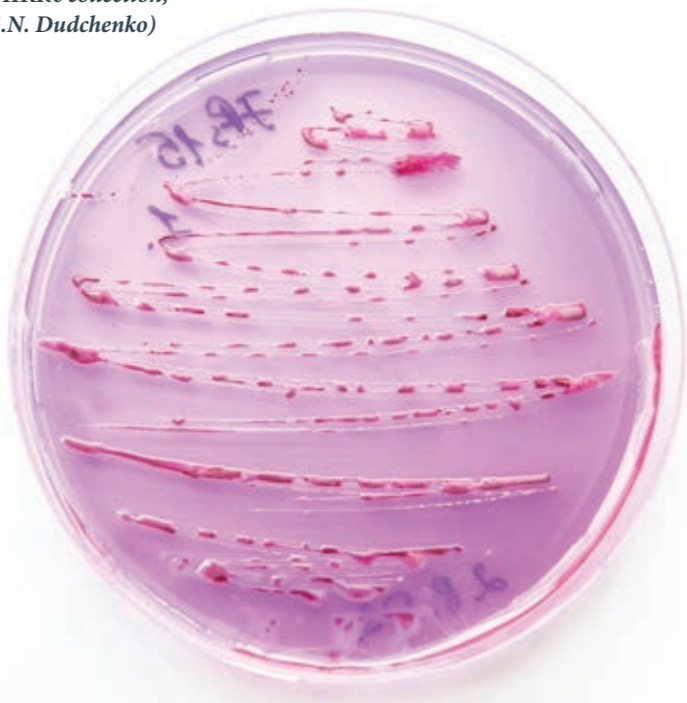


Таблица 2. Влияние вакуумной сушки на чувствительность метода ПЦР «в реальном времени» при диагностике *R. solanacearum* в экстракте картофеля

Количество КОЕ в 1 мл	Значение C_t		ΔC_t
	Вакуумная сушка	Без вакуумной сушки	
3×10^7	24,4	23,7	0,7
3×10^6	29,0	26,4	2,6
3×10^5	31,8	30,0	1,8
3×10^4	34,3	33,0	1,3
3×10^3	36,5	35,3	1,2
3×10^2	36,9	35,5	1,4
3×10^1	37,1	35,6	1,5
3×10^0	37,8	37,4	0,4

отбирали 330 мкл и добавляли 670 мкл экстракта картофеля. Таким образом был получен экстракт картофеля, зараженный *R. solanacearum* в концентрации 10^7 КОЕ/мл. Далее готовили серию 10-кратных разведений в экстракте картофеля, последовательно перенося 100 мкл предыдущего разведения к 900 мкл картофельного экстракта.

Изучали влияние следующих факторов на чувствительность метода ПЦР «в реальном времени» при диагностике *R. solanacearum*: содержание колониобразующих единиц в исследуемом образце с картофельным экстрактом; влияние температуры хранения: +4 °С; +28 °С; -20 °С; влияние продолжительности хранения: 7 дней; 15 дней; 30 дней; 180 дней.

Результаты исследования метода лишения жизнеспособности клеток фитопатогена

На первом этапе исследований были получены результаты, касающиеся влияния вакуумной сушки на жизнеспособность возбудителя бурой гнили картофеля. Посев образцов всех разведений культуры *R. solanacearum* после вакуумной сушки показал, что в этом случае рост колоний возбудителя не наблюдался (рис. 3), в отличие от образцов, не подвергнутых вакуумной сушке. Таким образом, было установлено, что после вакуумной сушки культура возбудителя теряет свою жизнеспособность.

На втором этапе исследований определяли возможное влияние вакуумной сушки на результаты ПЦР «в реальном времени». Исследуемые образцы, полученные из суспензии после вакуумной сушки и без нее, показали положительный результат при проведении ПЦР «в реальном времени» с зондом, специфичным для *R. solanacearum* (табл. 1).

Как было установлено, значение порогового цикла увеличивается с уменьшением содержания КОЕ,

Рис. 3. Влияние вакуумной сушки на жизнеспособность *R. solanacearum*, выращенной на среде SMSA

Fig. 3. Influence of vacuum drying on the viability of *R. solanacearum* cultured in SMSA

Количество КОЕ в 1 мл	Вакуумная сушка	Без вакуумной сушки (прямой посев)
3×10^4		
3×10^3		
3×10^2		
3×10^1		
Рост колоний возбудителя	Не наблюдался	Наблюдался

Таблица 3. Чувствительность метода ПЦР «в реальном времени» при диагностике *R. solanacearum* в экстракте картофеля с проведением и без проведения вакуумной сушки в зависимости от разведения культуры, температуры и времени хранения

Температура хранения образца, °С	Разведения (в 100 мкл)	Значение C_t					
		7 дней		15 дней		30 дней	
		без вакуум. сушки	вакуум. сушка	без вакуум. сушки	вакуум. сушка	без вакуум. сушки	вакуум. сушка
+4 °С	10 ⁶	23,3	24,3	24,6	24,6	24,7	25,6
	10 ⁵	26,6	27,8	27,9	28,0	28,0	29,1
	10 ⁴	29,6	31,0	30,8	31,1	31,0	32,3
	10 ³	32,6	33,7	34,4	35,7	34,6	36,0
	10 ²	-	35,5	-	36,7	-	37,1
	10 ¹	-	-	-	-	-	-
+28 °С	10 ⁶	23,2	26,0	23,6	27,2	23,9	27,6
	10 ⁵	26,6	29,9	27,1	30,8	27,3	31,1
	10 ⁴	29,2	32,4	30,3	34,3	31,0	34,4
	10 ³	32,1	35,7	32,3	36,1	33,7	-
	10 ²	36,6	36,4	36,7	37,6	36,7	-
	10 ¹	-	-	-	-	-	-
-20 °С	10 ⁶	23,4	23,5	24,0	23,8	24,1	24,4
	10 ⁵	26,5	26,7	27,4	27,8	27,4	28,5
	10 ⁴	29,8	30,7	30,1	31,1	30,6	31,2
	10 ³	33,5	33,9	33,7	34,5	33,9	34,8
	10 ²	36,4	36,9	36,4	38,5	37,4	38,9
	10 ¹	36,1	37,0	-	-	-	-

У образцов с картофельным экстрактом после вакуумной сушки значения пороговых циклов были выше, чем у образцов без вакуумной сушки.

при этом у образцов без вакуумной сушки регистрируются более ранние значения данного показателя. Таким образом, показана возможность выявления и идентификации возбудителя бурой гнили картофеля, лишённого жизнеспособности после вакуумной сушки, с применением молекулярных методов. Это, в свою очередь, свидетельствует о сохранности ДНК патогена после лишения его жизнеспособности. Применение вакуумной сушки приводило к увеличению значения C_t от 0,1 до 1,9, что не может существенно повлиять на результаты диагностики.

Влияние фактора «экстракт картофеля» на эффективность определения фитопатогена

Было показано, что метод ПЦР «в реальном времени» позволял обнаружить ДНК возбудителя во всех исследуемых разведениях культуры, внесённой в экстракт картофеля (табл. 2). Аналогичные результаты были получены для чистой культуры *R. solanacearum*, суспензированной в 1х РВ. У образцов с картофельным экстрактом после вакуумной сушки значения пороговых циклов были выше, чем у образцов без вакуумной сушки. Аналогичная тенденция

наблюдалась и для образцов чистой культуры патогена в 1х РВ. По-видимому, в процессе вакуумной сушки происходила частичная деградация ДНК, что привело к увеличению значения C_t от 0,4 до 2,6. В целом картофельный экстракт не может существенно повлиять на результаты диагностики исследуемого патогена методом ПЦР «в реальном времени».

Факторы хранения контрольных образцов

Оценку влияния факторов разведения, температуры и времени хранения на чувствительность диагностики возбудителя бурой гнили картофеля методом ПЦР «в реальном времени» проводили с добавлением и без добавления этапа вакуумной сушки (табл. 3). Было установлено, что данный метод позволял обнаружить ДНК *R. solanacearum* при

концентрации от 10⁶ до 10² клеток возбудителя в 100 мкл экстракта картофеля. Однако при концентрации клеток *R. solanacearum*, равной 10¹, данным методом возбудитель выявлен не был. Выявлено, что с уменьшением концентрации возбудителя в суспензии наблюдалось увеличение значений порогового цикла C_t . Это указывает на снижение содержания целевой ДНК в пробе по мере возрастания периода ее экспозиции.

Хранение при температуре, равной +4 °С, позволяло обнаружить ДНК возбудителя в концентрации не менее 10³ КОЕ методом ПЦР «в реальном времени» с исследуемыми образцами после вакуумной сушки, у образцов без вакуумной сушки — в концентрации не менее 10². Таким образом, было установлено, что вакуумная сушка влияет на количество целевой ДНК патогена в пробе: различия в пороговых циклах варьировали от 0 до 1,4 (в среднем 0,9). Хранение образцов после сушки в течение 30 дней при температуре +4 °С приводило к возрастанию показателя порогового цикла в среднем на 1,6.

Метод ПЦР «в реальном времени» образцов при температуре хранения +28 °С позволял идентифицировать ДНК возбудителя *R. solanacearum* во всех исследуемых суспензиях с различными концентрациями клеток в картофельном экстракте спустя 7 дней экспозиции. Спустя 30 дней в образцах после вакуумной сушки в концентрации, равной 10¹, возбудитель не был выявлен. Тогда как в образцах без вакуумной сушки при той же концентрации возбудитель выявлен не был на 14-е сутки хранения, а на 30-е сутки патоген был обнаружен только лишь при высоких концентрациях, начиная с 10⁴.

Хранение образцов после вакуумной сушки при температуре +28 °С приводило к увеличению значения порогового цикла C_t в пределах 2,8–4,0 по сравнению с образцами, не подвергнутыми сушке. Было показано, что при температуре хранения +28 °С вакуумная сушка оказывала существенное влияние на результаты диагностики возбудителя бурой гнили картофеля. При этом хранение образцов после сушки в течение 30 дней при данной температуре

приводило к увеличению значения порогового цикла до 1,6. Кроме того, с увеличением срока хранения образцов выявить целевую ДНК при концентрациях, меньших 10⁴, не представлялось возможным.

При температуре хранения –20 °С ДНК возбудителя *R. solanacearum* обнаруживали в исследуемых образцах концентрацией 10² и выше с помощью метода ПЦР «в реальном времени». При увеличении длительности хранения образцов целевую ДНК выявляли при концентрации клеток возбудителя не менее 10² в 100 мкл картофельного экстракта. Применение вакуумной сушки у образцов с картофельным экстрактом приводило к увеличению значения порогового цикла C_t от 0,1 до 1,1. Образцы после вакуумной сушки, хранящиеся в течение 30 дней при –20 °С, дают увеличение порогового цикла в среднем на 1,2, что незначительно снижает чувствительность используемого метода диагностики.

На следующем этапе исследовали длительное (6 мес.) хранение контрольных образцов при температуре –20 °С. Было установлено, что метод ПЦР «в реальном времени» позволяет достоверно выявить наличие ДНК возбудителя бурой гнили картофеля при концентрации 10³ и выше. Однако длительное хранение образцов сказывается на снижении чувствительности метода диагностики, как видно из рис. 4.

Заключение

Вакуумная сушка полностью лишала клетки возбудителя бурой бактериальной гнили картофеля жизнеспособности, что позволяет использовать данный метод для подготовки контрольных образцов и их пересылки для проведения МСИ без фитосанитарных ограничений.

Проведение этапа вакуумной сушки чистой культуры *Ralstonia solanacearum* в картофельном экстракте и фосфатно-солевом буфере незначительно повышало значения порогового цикла при постановке ПЦР «в реальном времени» (по сравнению с отсутствием этого этапа).

Контрольные образцы *Ralstonia solanacearum* для МСИ, предназначенные для транспортировки,

должны представлять собой высушенный под вакуумом при 60 °С картофельный экстракт с содержанием клеток данного фитопатогена в концентрации от 10³ до 10⁶ в 100 мкл экстракта. Допускается хранение образцов при температуре +28 °С не более 30 дней.

Литература

- ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.
- Диагностика бактериальной бурой гнили картофеля и меры борьбы с ней / Методические указания // ВНИИ фитопатологии РАСХН. — Москва, 1994. — 39 с.
- Завриев С.К., Рязанцев Д.Ю., Кошкина Т.Е., Абрамов Д.Д. Эффективный и экономичный метод чувствительной диагностики и идентификации патогенов картофеля // Картофелеводство России: актуальные проблемы науки и практики. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2007. С. 100–103.
- Правила организации проведения межлабораторных сличительных испытаний и профессионального тестирования специалистов учреждений, осуществляющих лабораторные исследования в области ветеринарии. М.: Федеральное государственное учреждение Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория, 2010.
- Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. ПЦР в реальном времени. М.: «БИНОМ. Лаборатория знаний», 2009. 223 с.
- СТО ВНИИКР 4.009-2011 «Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Методы выявления и идентификации», 2011.
- ISO/IEC 17025: 2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- Pastrik K., Maiss E. (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. Journal of Phytopathology, № 148. P. 619-626.
- Lelliott R.A., Stead D.E. (1987) Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Oxford: Blackwell scientific Publications Ltd., 216 p.

STUDY ON SAMPLE PREPARATION AND STORAGE for Interlaboratory Comparisons

for Detection and Identification of *Ralstonia solanacearum* Causing the Potato Brown Rot

Evgeny S. Mazurin, FGBU VNIKR's Deputy Director

Ilya O. Kamaev, Head of FGBU VNIKR's Research and Testing Department

Margarita G. Kabdulova, Researcher at FGBU VNIKR's Research and Testing Department

Maria B. Kopina, Senior Researcher at FGBU VNIKR's Mycology Laboratory

Galina N. Matyashova, Junior Researcher FGBU VNIKR's Research and Testing Department

Interlaboratory comparisons (IC) allow to perform unbiased and independent evaluation of laboratories' competence based on their performance in conducting tests on the same items against a set of controlled parameters in accordance with predetermined conditions [6]. Regular participation in the IC is a mandatory requirement for accreditation of any testing laboratories [1].

Accurate species identification of quarantine pests is of primary importance to plant health laboratories. The accuracy of identification is verified through IC using control samples. A control sample is accurately identified devitalized whole organisms (such as insects, plant seeds) or their parts (bacterial cell extracts, fungus mycelia, etc.). Devitalized samples can be shipped to laboratories without any phytosanitary restrictions. If preparation of entomological specimens presents no difficulties, bacteria are studied through a range of activities including devitalization of cells, their preparation and storage for subsequent detection and identification.

Ralstonia solanacearum (Smith, 1896) Yabuuchi et al., 1996, the causal agent of potato brown rot, is a quarantine pest in many countries, including Russia. The pathogen is capable of causing significant economic damage,

reducing crop yields by up to 40% and destroying over 50% of tubers during storage [3]. *R. solanacearum* is usually introduced into new areas with seed and ware potatoes; the bacterial infection can be either active or latent which calls for reliable methods of the pest diagnosis.

R. solanacearum is difficult to isolate and the biological characteristics of its isolates are hard to study which along with rapid loss of pathogenicity of the bacterium complexifies its detection. The most accurate, rapid and sensitive methods used for identification of the pathogen causing potato brown rot are molecular-genetic methods, such as polymerase chain reaction (PCR).

Currently, there are no requirements or standards for preparation and storage of *R. solanacearum* control samples for IC at specialized laboratories. Moreover, control samples should be stable to preserve the properties of the DNA matrix and tested object during shipment and testing.

All the above mentioned predetermined the aim of this paper which is to investigate conditions for preparation, storage and shipment of control samples for IC for detection and identification of *Ralstonia solanacearum* using molecular methods. The major factors affecting the quality of control samples

are the devitalization method for the pathogen cells, addition of a host plant extract, concentration of the pathogen cells, storage temperature and duration.

Materials and methods

In our study we used *Ralstonia solanacearum* VNIKR FRs14, a strain from the All-Russian Plant Quarantine Center's (FGBU VNIKR) collection. The pathogen was cultured in the SMSA growth medium [8]. Potato tubers were prepared in accordance with the FGBU VNIKR Technical Standard 4.009-2011.

The quantitative assessment of the bacterial cells was performed using a serial dilution method. To that end, a loop infected with the 24-hour bacterial culture was suspended in 1000 µL of 0.01 M sterile phosphate buffered saline (PBS); a series of ten-fold dilutions were performed by gradually transferring 100 µL of the previous dilution result into 900 µL of the PBS. Then, 100 µL of suspension from every tube was plated on Petri dishes with the SMSA growth medium in two replications to count the number of colony-forming units (CFUs).

A plant extract with a known quantity of CFUs of the pathogen was prepared in the similar fashion: 100 µL of the bacterial suspension was transferred into 900 µL of the potato tuber extract.

The number of the CFUs in every Petri dish was counted on the 6th day after plating in two ways: visually and using Scan 300 — an automatic colony counter. The number of the CFUs of the tested *R. solanacearum* strain in a series of ten-fold dilutions varied from 3×10^7 до 3×10^1 per 1 ml.

The possibility of devitalizing the bacterial cells while preserving the target DNA used in real-time PCR-based diagnosis was investigated by vacuum drying on Eppendorf Concentrator Plus, a centrifugal vacuum concentrator, at 60 °C for two hours. Potential effects of the potato extract on the test results were also assessed. With this in view, we used 100 µL of a pure *R. solanacearum* culture of various cell concentrations in 1x of a phosphate buffer (PB) and potato extract suspensions with pure *R. solanacearum* culture of the same cell concentrations. To that end, a series of *R. solanacearum* dilution was performed; 100 µL of every dilution result was taken in two replications — for direct plating and vacuum drying, 100 µL of sterile water was added to the dehydrated sample; the sample was first kept at +4 °C for 30 minutes and then plated. The viability of the pathogen was checked on the 4th day after plating.

To determine the impact of vacuum drying on the results of real-time PCR-based diagnosis of *R. solanacearum*, from every dilution result we took 100 µL for DNA extraction and 100 µL for vacuum drying with subsequent DNA extraction. DNA was extracted from each sample (both vacuum-dehydrated and non-vacuum-dried, and both with and without potato extract) using an automated nucleic acid extractor Freedom EVO by Tecan utilizing magnetic particles (M-Sorb TUB Avtomat, ZAO Sintol, Moscow).

The reaction mixture for real-time PCR analysis was as follows: 1X Master Mix (Dialat, Moscow); 10 pmole of each primer (B2F/B2R); a probe marked with ROX fluorescent stain (3.75 pmole B2P); 2.0 µL of a DNA sample and up to 25 µL of sterile water.

Real-time PCR analysis was conducted on a BioRad IQ5 amplifier under the following temperature/time parameters for amplification: 10 min at 95 °C; 40 cycles: 15 seconds at 95 °C; 1 min at 60 °C. The overall real-time PCR result is presented by the value denoted as the threshold cycle C_t [5].

Table 1. Real time PCR sensitivity for samples of *R. solanacearum* pure culture after and before vacuum drying

Number of CFUS in 1 ml	C_t values		ΔC_t
	Vacuum drying	No vacuum drying	
3×10^7	24,2	23,1	1,1
3×10^6	27,4	25,9	1,5
3×10^5	31,3	29,4	1,9
3×10^4	33,1	32,3	0,8
3×10^3	36,3	34,8	1,5
3×10^2	36,6	35,1	1,5
3×10^1	36,9	35,3	1,6
3×10^0	37,0	36,9	0,1

Table 2. Real time PCR sensitivity for *R. solanacearum* diagnosis in potato extract

Number of CFUS in 1 ml	C_t values		ΔC_t
	Vacuum drying	No vacuum drying	
3×10^7	24,4	23,7	0,7
3×10^6	29,0	26,4	2,6
3×10^5	31,8	30,0	1,8
3×10^4	34,3	33,0	1,3
3×10^3	36,5	35,3	1,2
3×10^2	36,9	35,5	1,4
3×10^1	37,1	35,6	1,5
3×10^0	37,8	37,4	0,4

Further, an experiment was carried out using samples of deluded culture of a known concentration mixed with potato extract. To obtain *R. solanacearum* suspension with potato extract of a known concentration, 330 µL of the first result of the suspension dilution (3×10^7 cell in 1 ml 0.01 M of sterile

PBS) was transferred into 670 µL of potato extract. In this way we obtained potato extract infected with *R. solanacearum* at 10^7 CFUs/ml. Then, a series of ten-fold dilutions in potato extract was performed by gradually transferring 100 µL of the previous dilution result into 900 µL of potato extract.

***Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi et al., 1996, the causal agent of potato brown rot, is a quarantine pest in many countries, including Russia. The pathogen is capable of causing significant economic damage, reducing crop yields by up to 40% and destroying over 50% of tubers during storage [3].**

We studied the influence of the following factors on the sensitivity of the real time PCR-based *R. solanacearum* diagnosis: the number of colony forming units in the tested sample with potato extract; storage temperature: +4 °C; +28 °C; -20 °C; duration of storage: 7 days; 15 days; 30 days; 180 days.

Results

Studies of the pathogen cell revitalization methods

The first stage of the research produced results related to the influence of vacuum drying on the pathogen viability. Culturing all *R. solanacearum*

dilution products after vacuum drying showed no growth of the pathogen colonies (Fig. 3) in contrast to the non-vacuum-dried samples. Thus, we found that vacuum drying caused loss of viability in the pathogen culture.

During the second stage, the possible influence of vacuum drying on real time PCR results was determined. The tested samples obtained from the suspension both before and after vacuum drying showed positive results in a real-time PCR assay using a probe specific for *R. solanacearum* (Table 1).

We found that the threshold cycle values increased when the number of

CFUs decreased; while for the samples that had not been subjected to vacuum drying earlier values were recorded. Thus, the possibility of detection and identification of the devitalized potato brown rot causative agent after vacuum drying using molecular methods was demonstrated. This proves that DNA of the pathogen is preserved after its devitalization. The use of vacuum drying produced increased C_t values between 0.1 and 1.9 which cannot significantly affect the results of the diagnosis.

The influence of potato extract factor on the efficacy of the pathogen identification

The real time PCR assay was shown to enable the detection of the pathogen DNA in all tested culture-dilution results added to potato extract (Table 2). The same results were obtained for pure *R. solanacearum* culture suspended in

The possibility of detection and identification of the devitalized potato brown rot causative agent after vacuum drying using molecular methods was demonstrated.

Table 3. Sensitivity of the real-time PCR-based diagnosis of *R. solanacearum* in potato extract both with and without vacuum drying depending on the culture dilution, temperature and storage duration

Sample storage temperature, °C	Dilution (in 100 µL)	C_t values					
		7 days		15 days		30 days	
		no vacuum drying	vacuum drying	no vacuum drying	vacuum drying	no vacuum drying	vacuum drying
+4 °C	10 ⁶	23,3	24,3	24,6	24,6	24,7	25,6
	10 ⁵	26,6	27,8	27,9	28,0	28,0	29,1
	10 ⁴	29,6	31,0	30,8	31,1	31,0	32,3
	10 ³	32,6	33,7	34,4	35,7	34,6	36,0
	10 ²	-	35,5	-	36,7	-	37,1
	10 ¹	-	-	-	-	-	-
+28 °C	10 ⁶	23,2	26,0	23,6	27,2	23,9	27,6
	10 ⁵	26,6	29,9	27,1	30,8	27,3	31,1
	10 ⁴	29,2	32,4	30,3	34,3	31,0	34,4
	10 ³	32,1	35,7	32,3	36,1	33,7	-
	10 ²	36,6	36,4	36,7	37,6	36,7	-
	10 ¹	-	-	-	-	-	-
-20 °C	10 ⁶	23,4	23,5	24,0	23,8	24,1	24,4
	10 ⁵	26,5	26,7	27,4	27,8	27,4	28,5
	10 ⁴	29,8	30,7	30,1	31,1	30,6	31,2
	10 ³	33,5	33,9	33,7	34,5	33,9	34,8
	10 ²	36,4	36,9	36,4	38,5	37,4	38,9
	10 ¹	36,1	37,0	-	-	-	-

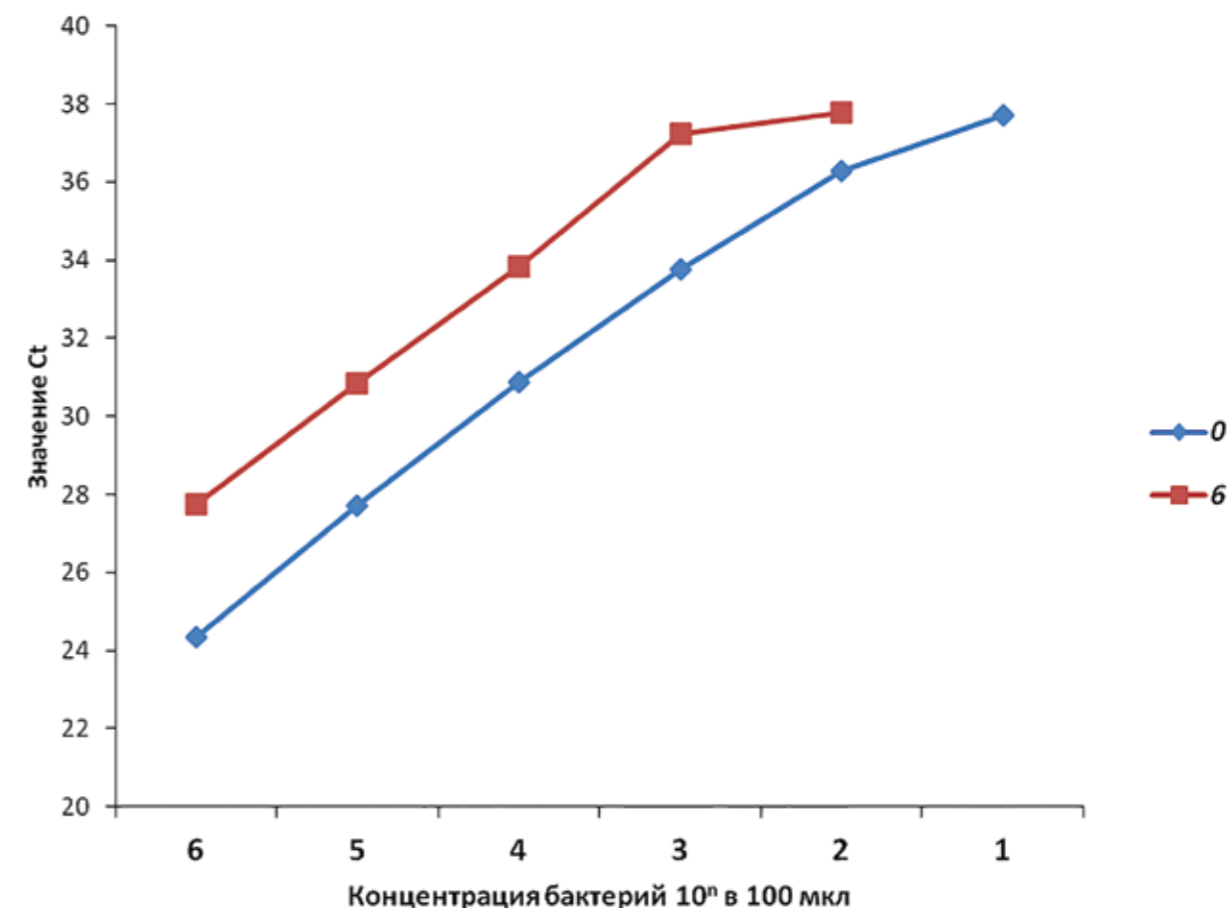


Fig. 4. Influence of the pathogen concentration and storage duration (6 months) on the sensitivity of real-time PCR at -20 °C

Рис. 4. Влияние концентрации возбудителя бурой гнили картофеля и длительности хранения образцов (6 мес.) на чувствительность ПЦР «в реальном времени» при температуре -20 °C

Samples with potato extract that had been subjected to vacuum drying showed higher threshold cycle values than others.

1x PB. Samples with potato extract that had been subjected to vacuum drying showed higher threshold cycle values than others. This tendency was also observed in pure culture samples in 1x PB. Apparently, during vacuum drying, DNA became partially degraded which led to increased C_t values between 0.4 and 2.6. Overall, potato extract cannot significantly influence the results of real time PCR-based diagnosis of the pathogen.

The factors of storage of control samples

The influence of dilution, temperature and storage duration on the sensitivity of the real-time PCR-based diagnosis of the pathogen was evaluated by both adding the vacuum drying stage and without it (Table 3). We found that this method enabled *R. solanacearum* DNA detection at the cell concentrations between 10⁶ and 10² in 100 µL of potato extract. However, at the concen-

tration of 10¹, this method could not detect the pathogen. We also found that at decreased pathogen concentrations in the suspension the threshold cycle values (C_t) increased. This indicates that the content level of the target DNA decreases with the increased period of exposition.

Storage at +4 °C allowed to detect DNA of the pathogen at the minimum concentration of 10³ CFUs in vacuum-dried samples by real-time PCR assay and at the minimum concentration of 10² CFUs in non-vacuum-dehydrated samples.

Thus, it was found that vacuum drying influenced the content level of the target DNA in samples: the threshold cycle values varied between 0 and 1.4 (with the average of 0.9). Storing the vacuum-dried samples at +4 °C for 30 days led to the increase of C_t values by an average of 1.6.

The real-time PCR assay of samples stored at +28 °C enabled *R. solanacear-*

um identification in all tested suspensions of various cell concentrations in potato extract after 7-day exposition. After 30 days, in the vacuum-dried samples, the pathogen was not detected at the concentration of 10¹; while in non-vacuum-dried samples of the same cell concentration the pathogen could not be detected on the 14th day of storage, and on the 30th day, the pathogen could be detected only at the concentration of 10⁴ and above.

The vacuum-dried samples stored at +28 °C showed higher C_t values, between 2.4 and 4.0, as compared with the non-vacuum-dried samples. Vacuum drying was demonstrated to have a significant impact on the pest diagnosis at the storage temperature of +28 °C. Moreover, 30-days storage at +28 °C increased the C_t values to 1.6. Also, increased du-

ration of storage made it impossible to detect the target DNA at the concentrations below 10^4 .

At the storage temperature of $-20\text{ }^\circ\text{C}$, *R. solanacearum* DNA was detected in tested samples at the cell concentration of 10^2 and above by real-time PCR assay. When the storage duration was increased, the target DNA could be detected at the minimum concentration of 10^2 per $100\text{ }\mu\text{L}$ of potato extract. Vacuum drying of the samples with potato extract resulted in higher C_t values — between 0.1 and 1.1. The vacuum-dried samples stored at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for 30 days showed higher C_t values by the average of 1.2 which slightly lessens the sensitivity of the diagnostic method.

The next stage investigated the prolonged storage (6 months) of the control samples at $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Real-time PCR assay was shown to reliably detect DNA of the pathogen at the concentrations of 10^3 and above. However, prolonged storage caused decreased sensitivity of the method as shown in Figure 4.

Conclusion

Vacuum drying completely devitalized the cell of the potato brown rot causative agent which makes it possible

to use this method in preparation of control samples and their shipment for IC without any phytosanitary restrictions.

Vacuum drying of *Ralstonia solanacearum* culture in potato extract and phosphate buffered saline caused slight increase of the threshold cycle values during the real-time PCR assay (compared with those obtained without a vacuum drying stage).

Control samples of *Ralstonia solanacearum* for IC should be transported as potato extract subjected to vacuum-dehydration at $60\text{ }^\circ\text{C}$ with the cell concentrations between 10^3 and 10^6 per $100\text{ }\mu\text{L}$ of the extract. The samples may be stored at $+28\text{ }^\circ\text{C}$ for no longer than 30 days.

References

1. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO/IEC 17025:2009.
2. Diagnosis of the potato brown rot and measures for its control/ Procedural guidelines // All-Russian Research Institute of Phytopathology, RAAS. — Moscow, 1994. pp. 39.
3. S.K. Zavriev, D.U. Ryazantsev, T.E. Koshkina, D.D. Abramov. Effective and

efficient method of sensitive detection and identification of potato pathogens// Russian Potato-Farming: Relevant Research and Practice-Related Issues. M.: FGNU Rosinformagrotekh, 2007. pp. 100–103.

4. Guidelines on performing inter-laboratory comparisons and proficiency tests for specialists working in veterinary research laboratories. M.: Central Veterinary Laboratory for Research and Methodology, 2010.

5. D.V. Rebrikov, G.A. Samatov, D.U. Trofimov. Real-time PCR. M.: “BINOM. Laboratory of Knowledge”, 2009. P. 223.

6. VNIKR Technical Standard 4.009-2011 “The Potato Brown Rot Causative, *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Detection and Identification Methods”. 2011.

7. ISO/IEC 17025: 2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.

8. Pastrik K., Maiss E. (2000) Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. Journal of Phytopathology, № 148. P. 619-626.

9. Lelliott R.A., Stead D.E. (1987) Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Oxford: Blackwell scientific Publications Ltd., 216 p.



ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

Журнал «Карантин растений. Наука и практика» приглашает авторов для публикации своих научных работ

Редакция журнала «Карантин растений. Наука и практика» рада предложить Вам возможность публикации Ваших статей на страницах журнала. Наша цель — привлечение внимания к наиболее актуальным проблемам карантина растений специалистов сельского хозяйства и всех заинтересованных в этом людей.

В журнале рассматриваются основные направления развития науки и передового опыта в области карантина и защиты растений, публикуется важная информация о новых методах и средствах, применяемых как в России, так и за рубежом, а также о фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации.

Мы доносим до широкого круга читателей объективную научно-просветительскую и аналитическую информацию: мнения ведущих специалистов по наиболее принципиальным вопросам карантина растений, данные о значимых новейших зарубежных и отечественных исследованиях, материалы тематических конференций.

Редакция журнала «Карантин растений. Наука и практика» приглашает к сотрудничеству как выдающихся деятелей науки, так и молодых ученых, специалистов-практиков, работающих в области фитосанитарии, для обмена опытом, обеспечения устойчивого фитосанитарного благополучия и для новых научных дискуссий.

ЗАДАЧИ ЖУРНАЛА



Изучение основных тенденций развития науки в области карантина растений



Анализ широкого круга передовых технологий в области мониторинга и лабораторных исследований по карантину растений



Обсуждение актуальных вопросов карантина растений

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫМ СТАТЬЯМ

К публикации принимаются статьи на двух языках: русском и английском, содержащие результаты собственных научных исследований, объемом до 10-12 страниц — но не менее 5 (при одинарном интервале и размере шрифта 12). Оптимальный объем статьи: до 20 тыс. знаков (включая пробелы).

СТРУКТУРА ПРЕДОСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ*

1. Название статьи.
2. Имя, отчество, фамилия автора.
3. Место работы автора, должность, ученая степень, адрес электронной почты.
4. Резюме (краткое точное изложение содержания статьи, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): около 7–8 строк (300–500 знаков с пробелами).
5. Ключевые слова (5–6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи.
6. Материалы и методы.
7. Результаты и обсуждения.
8. Выводы и заключение.
9. Список литературы (т. е. список всей использованной литературы, ссылки на которую даются в самом тексте статьи): Правила составления ГОСТ Р 7.05-2008.
10. Иллюстрированные материалы (фото, картинки) допускаются хорошей контрастности, с разрешением не ниже 300 точек на дюйм (300 dpi), оригиналы прикладываются к статье отдельными файлами в формате tiff или jpeg (Рисунки, не соответствующие требованиям, будут исключены из статей, поскольку достойное их воспроизведение типографским способом невозможно).
11. Рецензия на статью (доктор наук) и решение экспертной комиссии учреждения.


*В таком же порядке и структуре предоставляется англоязычный перевод статьи.

Работа должна быть предоставлена в редакторе WORD, формат DOC, шрифт Times New Roman, размер шрифта — 12, межстрочный интервал — одинарный, размер полей по 2 см, отступ в начале абзаца 1 см, форматирование по ширине. Рисунки, таблицы, схемы, графики и пр. должны быть обязательно пронумерованы, иметь источники и «вмещаться» в печатное поле страницы. Название таблицы — над таблицей; название рисунка/графика — под рисунком/графиком.

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

Адрес: 105122, г. Москва, Щелковское шоссе, д. 13, офис 402
Контактное лицо: Бадагулова Юлиана Георгиевна

2014 ГОД — 10 ЛЕТ РОССЕЛЬХОЗНАДЗОРУ
Телефон: +7 915 477 78 36



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



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



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



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

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

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

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

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

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

- Имеет 23 филиала на территории Российской Федерации

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

Тел./факс: (499) 271-38-24

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