

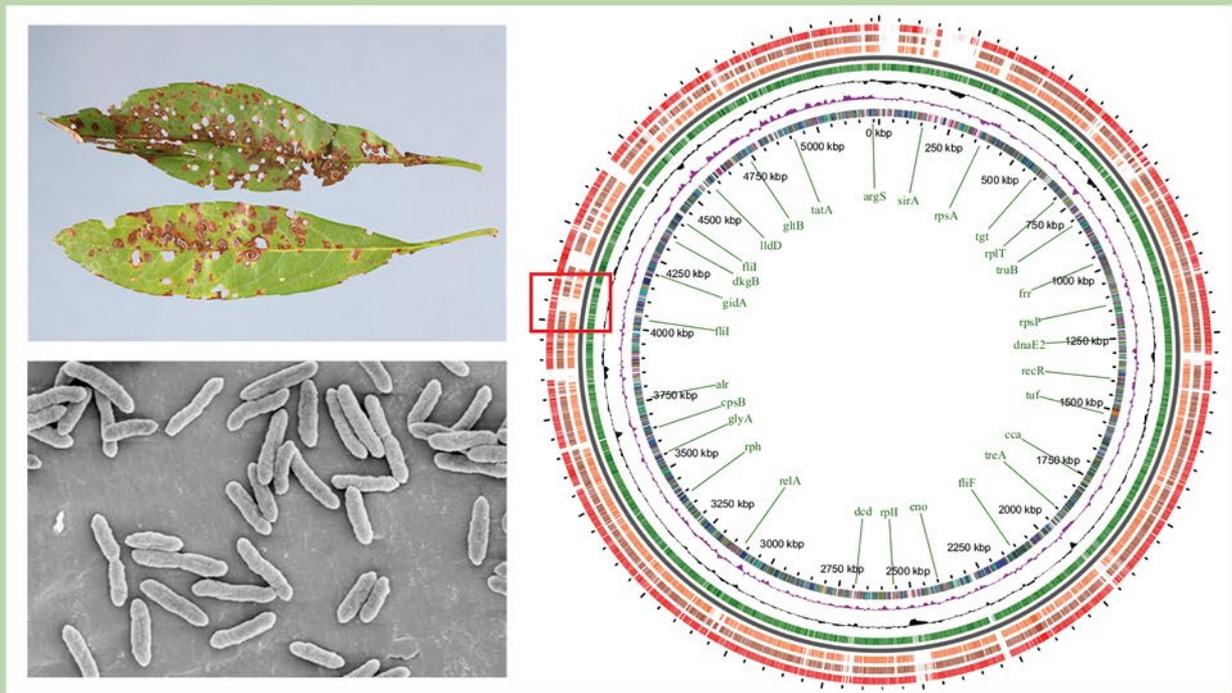


ISSN 1727-1320 (Print),
ISSN 2308-6459 (Online)

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2021 TOM VOLUME 104 ВЫПУСК ISSUE 2



Санкт-Петербург
St. Petersburg, Russia

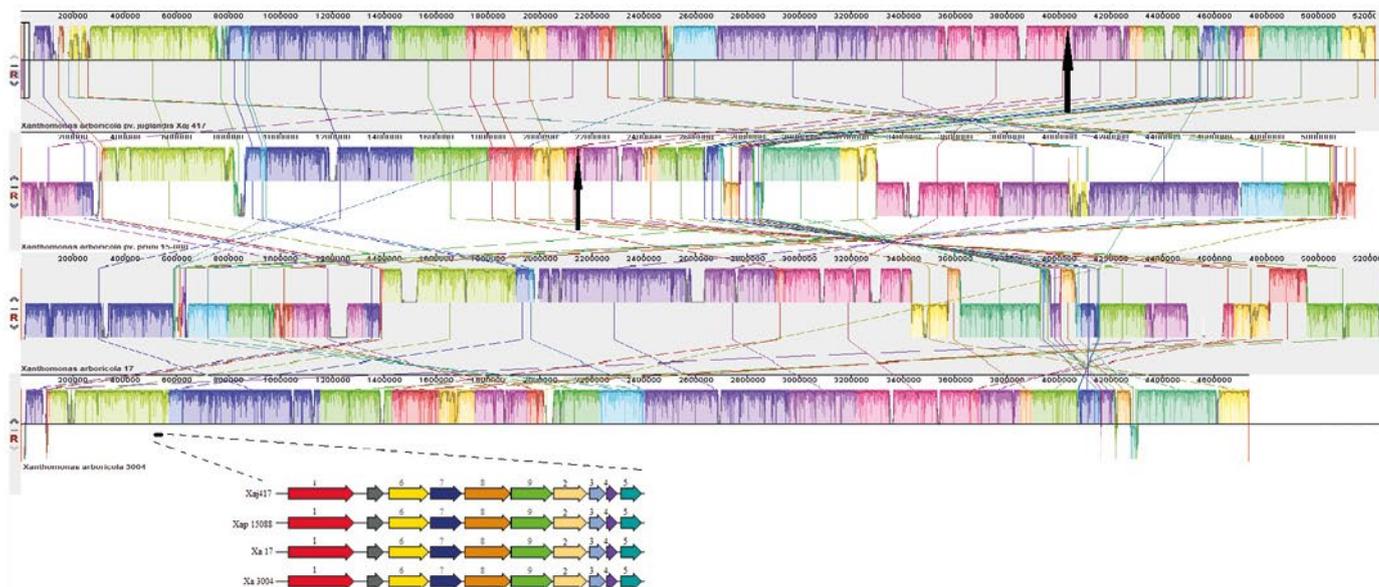


Рисунок 2*. Полногеномное выравнивание геномов штаммов *Xanthomonas arboricola*, доступных в базах данных и *X. arboricola* шт. 3004. Кластер генов T4SS расположен на участке 556631–4186000 н.п. Структура кластера T4SS консервативна, гены обозначены цифрами: 1-*virD4*, 2-*virB1*, 3-*virB2*, 4-*virB3*, 5-*virB4*, 6-*virB8*, 7-*virB9*, 8-*virB10*, 9-*virB10*. Гены *virB5* и *virB6* находятся за пределами кластера и многокопийны. Местоположение кластера генов T3SS показано стрелками. У штаммов *X. arboricola* шт. 17 и *X. arboricola* шт. 3004 кластер T3SS не найден

Figure 2**. Comprehensive genome alignment of *Xanthomonas arboricola* strains available in the databases and *X. arboricola* str. 3004. T4SS gene cluster is located at 556631 to 4186000 bp. The structure of the T4SS cluster is conserved; genes are numbered as follows: 1-*virD4*, 2-*virB1*, 3-*virB2*, 4-*virB3*, 5-*virB4*, 6-*virB8*, 7-*virB9*, 8-*virB10*, 9-*virB10*. *VirB5* and *virB6* genes are located outside the cluster and are multicopy. Location of the T3SS gene cluster is shown with arrows. T3SS genes were not found in *X. arboricola* str. 17 and *X. arboricola* str. 3004

* Иллюстрация к статье Кыровой Е.И., Игнатова А.Н. (с. 91).

** Illustration from Kyrova E.I., Ignatov A.N. (p. 91).

Для оформления обложки использованы изображения листьев, пораженных *Xanthomonas arboricola* (© Dr. Maria Bergsma-Vlami, Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority) и клеток *X. oryzae*, полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии (© Huang et al., 2018, <https://doi.org/10.3390/md16020052>), а также карты генома *X. arboricola* (© Кырова, Игнатов, 2021, <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2021-104-2-14962>, см. стр. 90 текущего выпуска).

For the title page design, the following images were used: leaves infected with *Xanthomonas arboricola* (© Dr. Maria Bergsma-Vlami, Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority) and cells of *X. oryzae*, obtained using scanning electron microscopy (© Huang et al., 2018, <https://doi.org/10.3390/md16020052>), as well as the genome map of *X. arboricola* (© Kyrova, Ignatov, 2021, <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2021-104-2-14962>, see page 90 of the current issue).

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений”
(ФГБНУ ВИЗР)

All-Russian Institute of Plant Protection

ISSN 1727-1320 (Print),
ISSN 2308-6459 (Online)

В Е С Т Н И К
ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2021 ТОМ **104** ВЫПУСК **2**
VOLUME ISSUE

Санкт-Петербург
St. Petersburg, Russia
2021

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Научно-теоретический рецензируемый журнал

Основан в 1939 г.

Издание возобновлено в 1999 г.

Учредитель: Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (ВИЗР)

Зарегистрирован в ГК РФ по печати № 017839 от 03 июля 1998 г.

Главный редактор: В.А. Павлюшин

Зам. гл. редактора: В.И. Долженко, Ю.С. Токарев

Ответственный секретарь: В.К. Моисеева

Технический секретарь: С.Г. Удалов

Технический помощник: А.Г. Конончук

Журнал «Вестник защиты растений» (ISSN: 1727-1320) включен в «Перечень изданий ВАК РФ» по следующим научным специальностям и отраслям науки:

1.5.14 – Энтомология (биологические науки),

1.5.18 – Микология (биологические науки),

4.1.1 – Общее земледелие. Растениеводство (сельскохозяйственные и биологические науки),

4.1.2 – Селекция, семеноводство и биотехнология растений (сельскохозяйственные и биологические науки),

4.1.3 – Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений (сельскохозяйственные и биологические науки),

4.1.4 – Садоводство, овощеводство, виноградарство и лекарственные культуры (сельскохозяйственные и биологические науки)

Индексируется в РИНЦ и CrossRef

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Алёхин А., профессор, США

Афанасенко О.С., дбн, академик РАН, ВИЗР

Белоусов И.А., кбн, ВИЗР

Белякова Н.А., кбн, ВИЗР

Власенко А.Н., дсxn, академик РАН,

СибНИИЗиХ СФНЦА РАН

Власов Д.Ю., дбн, СПбГУ

Ганнибал Ф.Б., кбн, ВИЗР

Гончаров Н.Р., ксxn, ВИЗР

Гричанов И.Я., дбн, ВИЗР

Дзянь Синьфу, профессор, КНР

Долженко В.И., дсxn, академик РАН, ВИЗР

Егоров Е.А., дэн, академик РАН, СКФНЦСиВ

Захаренко В.А., дсxn, академик РАН, МНИИСХ

Игнатов А.Н., дбн, РУДН

Косман Е., профессор, Израиль

Каракотов С.Д., дхн, академик РАН,

ЗАО “Щелково Агрохим”

Лаврищев А.В., дсxn, СПбГАУ

Лаптиева А.Б., дбн, ООО “ИЦЗР”

Левитин М.М., дбн, академик РАН, ВИЗР

Лулева Н.Н., кбн, ВИЗР

Лысов А.К., ктн, ВИЗР

Надыкта В.Д., дтн, академик РАН, ВНИИБЗР

Намятова А.А., кбн, ВИЗР

Новикова И.И., дбн, ВИЗР

Павлюшин В.А., дбн, академик РАН, ВИЗР

Радченко Е.Е., дбн, ВИР

Савченко И.В., дбн, академик РАН, ВИЛАР

Санин С.С., дбн, академик РАН, ВНИИФ

Сидельников Н.И., дсxn, член-корреспондент РАН,

ВИЛАР

Синев С.Ю., дбн, ЗИН

Сорока С.В., ксxn, Белоруссия

Сухорученко Г.И., дсxn, ВИЗР

Ули-Маттила Т., профессор, Финляндия

Токарев Ю.С., дбн, ВИЗР

Упадышев М.Т., дбн, член-корреспондент РАН, ВСТИСП

Фролов А.Н., дбн, ВИЗР

Хлесткина Е.К., дбн, ВИР

Шамшев И.В., кбн, ЗИН

Шпанев А.М., дбн, АФИ

Эспевиг Т., PhD, Норвегия

Ответственные редакторы выпуска:

Афанасенко О.С., Ганнибал Ф.Б., Сухорученко Г.И., Токарев Ю.С.

Россия, 196608, Санкт-Петербург – Пушкин, шоссе Подбельского, 3, ВИЗР

Email: vestnik@vizr.spb.ru

<http://plantprotect.ru>



Содержимое данного выпуска распространяется на условиях Creative Commons Attribution License 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

СОДЕРЖАНИЕ / CONTENT

Полнотекстовые обзоры / Full-text reviews**Санитарно-эпидемиологическое значение и резистентность к инсектицидам природных популяций комнатной мухи *Musca domestica*****Т.А. Давлианидзе, О.Ю. Еремина**Sanitary and epidemiological significance and resistance to insecticides in the housefly *Musca domestica*

Т.А. Davlianidze, O.Yu. Eremina 72

Полнотекстовые статьи / Full-text articles**Подбор генов-мишеней для диагностики штаммов *Xanthomonas arboricola*, патогенных для злаковых и капустных культур****Е.И. Кырова, А.Н. Игнатов**Selection of target genes for PCR diagnostics of *Xanthomonas arboricola* virulent for cereals and brassicas

E.I. Kyrova, A.N. Ignatov 87

Биологическая активность дерново-подзолистой супесчаной почвы при мелиоративном внесении гидрогелей**Т.Н. Данилова, Ю.В. Хомяков, П.Ю. Конончук**

Biological activity of sod-podzolic sand soil amended by hydrogels

T.N. Danilova, Yu.V. Khomyakov, P.Yu. Kononchuk 97

Потеря эффективности генов устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr25* и *Sr6Agi* на территории Нижнего Поволжья**О.А. Баранова, С.Н. Сибикеев, А.Е. Дружин, И.Д. Созина**Loss of effectiveness of stem rust resistance genes *Sr25* and *Sr6Agi* in the Lower Volga region

O.A. Baranova, S.N. Sibikeev, A.E. Druzhin, I.D. Sozina 105

Оценка устойчивости сортов картофеля из коллекции ВИР к *Phytophthora infestans* в лабораторном изучении**Н.М. Зотеева, О.С. Косарева**Assessment of the varieties from the VIR's potato collection for resistance to *Phytophthora infestans* in laboratory assays

N.M. Zoteyeva, O.S. Kosareva 113

Краткие сообщения / Short Communications**Оценка устойчивости сортообразцов коостреца безостого к возбудителю темно-бурой пятнистости на искусственном инфекционном фоне****Н.Ю. Костенко**

Sustainability assessment of the resistance of smooth bromegrass varieties to the causative agent of helminthosporiosis on an artificial infectious background

N.Yu. Kostenko 120

Biodiversity of the *Fusarium* fungi causing root rot of winter cereals in Belarus**N.A. Krupenko, S.F. Buga, A.G. Zhukovskiy, I.N. Odintsova, A.A. Zhukovskaya, T.G. Pilat, V.G. Leshkevich**Видовое разнообразие грибов рода *Fusarium*, вызывающих корневую гниль озимых зерновых культур в Беларуси

Н.А. Крупенько, С.Ф. Буга, А.Г. Жуковский, И.Н. Одинцова, А.А. Жуковская, Т.Г. Пилат, В.Г. Лешкевич 124

Хроника / Chronicle**О прошедшем мероприятии: первый виртуальный съезд общества патологии беспозвоночных 128****Past conference: first virtual meeting of the society for invertebrate pathology 128**

САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ИНСЕКТИЦИДАМ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КОМНАТНОЙ МУХИ *MUSCA DOMESTICA*

Т.А. Давлианидзе*, О.Ю. Еремина

Научно-исследовательский институт дезинфектологии Роспотребнадзора, Москва

* ответственный за переписку, e-mail: tdavlik@bk.ru

Устойчивость насекомых к инсектицидам была и остается серьезной проблемой, влияющей на борьбу с насекомыми во всем мире. Борьба с комнатной мухой *Musca domestica* служит важной частью дезинсекционных мероприятий из-за способности насекомых переносить возбудителей инфекционных болезней человека и животных. Но многие химические вещества, которые показывали свою эффективность против них, перестали давать результаты уже через несколько лет использования. Интенсивное применение инсектицидов в мировой практике привело к формированию природных популяций комнатной мухи, устойчивых ко всем используемым группам препаратов, которые используются для борьбы с ними. Этот вид входит в десятку видов насекомых, которые развили устойчивость к максимальному количеству действующих веществ. В обзоре обобщены и проанализированы данные зарубежных и отечественных авторов по резистентности комнатной мухи к инсектицидам за последние 20 лет. Представлены сведения по устойчивости данного объекта как к традиционным средствам химической защиты, так и к новым химическим веществам. Описаны основные механизмы устойчивости насекомого и факторы ее развития. Приведены схемы ротации инсектицидов в борьбе с личинками и имаго мухи.

Ключевые слова: резистентность, механизм действия, преодоление резистентности, ротация инсектицидов

Поступила в редакцию: 12.04.2021

Принята к печати: 15.06.2021

Медицинское и ветеринарное значение комнатной мухи

Комнатная муха *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) имеет большое медицинское, ветеринарное и санитарно-эпидемиологическое значение, как насекомое, которое механически переносит более 100 видов патогенов человека, домашней птицы и скота (Malik et al, 2007, Butler et al., 2010; Davies et al., 2016; Khamesipour et al., 2018; Wang et al., 2019). При высокой численности муха может загрязнять пищу, портить продукты животноводства и обычно приносит экономический ущерб (Khan, Akram, 2014). Мухи обладают способностью механически переносить патогенов между различными средами, распространяя их в различных экологических нишах, и выступают в качестве одного из наиболее важных переносчиков возбудителей болезней человека во всем мире (Zhang et al., 2018).

Основные бактериальные возбудители, которых переносит комнатная муха, вызывают множество болезней, опасных для человека, включая холеру, сибирскую язву, бактериальную дизентерию, брюшной тиф и т. д. (Issa, 2019). В сельском хозяйстве муха служит основным переносчиком патогенных организмов – возбудителей болезней домашней птицы и крупного рогатого скота. Её жизненный цикл тесно связан с животноводческими и птицеводческими комплексами, так как процесс размножения и развития проходит в фекальных отходах, различных отбросах и на свалках. Так, например, переносчиком возбудителя инфекционной болезни домашней птицы пастереллеза (птичья холера) *Pasteurella multocida* выступает комнатная муха (Iqbal et al., 2014).

Комнатная муха механически переносит возбудителя зоонозного заболевания кампилобактериоза (кишечный

энтерит) *Campylobacter jejuni* (Gill et al., 2017). Эта болезнь широко распространена среди кур и очень опасна для человека, так как в мясе птицы сохраняются бактерии (Bahrdorff et al., 2014). В сельском хозяйстве от колибактериоза ежегодно погибает на птицефабриках около 6% кур, при этом финансовые затраты предприятия составляют около 1.15 млн долларов в год. Некротический энтерит приводит к поражениям в кишечнике птиц и может привести к смертности всего поголовья до 1% в день, а в США потери составляют 2.5 миллиарда долларов в год. Комнатная муха вызывает стресс животных (особенно молодняка), из-за которого снижается как уровень производства яиц и молока, так и производство кормов (Freeman et al., 2019). Ежегодные экономические потери от этого насекомого в США оцениваются в 375 млн долларов (Biale et al., 2017).

При анализе природных популяций комнатной мухи из шести районов в Марокко были выявлены преобладающие виды бактерий, найденные как на поверхности, так и в кишечнике насекомых: *Escherichia coli* (17.9%), *Klebsiella spp.* (14.7%), *Providencia spp.* (9.6%), *Staphylococcus spp.* (15.1%) и *Enterococcus spp.* (11.6%) (Bouamama et al., 2010).

Комнатная муха может переносить возбудителей респираторных инфекций крупного рогатого скота, что наносит большой ущерб многим животноводческим комплексам (Pereira et al., 2019), а также играет важную роль в распространении спор грибов родов *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Moniliella* и *Mucor* (Phoku et al., 2016; Phoku et al., 2017).

Показано, что комнатная муха может переносить возбудителей болезней, связанных с цирковирусом свиней, который с начала 1990-х годов стал серьезной проблемой в свиноводстве всего мира. Основные вспышки этой болезни в Северной Америке и Европе были связаны с появлением штамма цирковируса свиней 2b (PCV2b) (Blunt et al., 2011). Муха может передавать *Arterivirus suis* – вирус, который выступает в качестве возбудителя репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCC), сопровождающийся поражением дыхательной системы и рождением нежизнеспособных поросят (Otake et al., 2004).

На поверхности тела комнатная муха может переносить ооцисты гельминтов: остриц *Enterobius vermicularis*; кишечной угрицы *Strongyloides stercoralis*, власоглава *Trichuris trichiura*, аскариды *Toxocara canis*, широкого лентеца *Diphyllobothrium latum*, карликового цепня *Hymenolepis nana*, цисты и трофозоиты некоторых паразитических протистов, что особенно опасно для домашних животных (Issa, 2019). Комнатная муха выступает в

качестве переносчика и промежуточного хозяина нематод лошадей и некоторых цестод домашней птицы (Iqbal et al., 2014).

Настороженность вызывает развитие резистентности к большому числу антибиотиков, так как устойчивость к противомикробным препаратам признана одной из самых серьезных глобальных угроз здоровью человека (Interagency Coordination Group, 2019). При изучении популяций комнатной мухи в Китае и Бельгии выявлены гены устойчивости к колистину, который используют против грамотрицательных бактерий (*mcr-2* и *mcr-3*) (Zhang et al., 2017).

В связи с активизацией в разных странах мира болезней, возбудителей которых переносит комнатная муха, борьба с этим насекомым имеет особое значение. Препятствием для эффективной борьбы служит формирование резистентных популяций комнатной мухи к инсектицидам из различных классов (групп) химических соединений.

Резистентность к инсектицидам комнатной мухи в мире

Резистентность комнатной мухи к хлороорганическим инсектицидам была обнаружена еще в середине 20 века. С тех пор спектр устойчивости изменился в связи с появлением новых классов (групп) инсектицидов и под влиянием различных способов их применения. Самый распространенный способ борьбы с комнатной мухой – применение инсектицидов в виде отравленных приманок, аэрозолей, концентратов для обработки мест посадки мух и ларвицидов для обработки мест их вылода. В литературе описан целый ряд методов определения чувствительности комнатной мухи к инсектицидам (перечислены в порядке убывания встречаемости): метод скармливания растворов инсектицидов в сахарном сиропе, метод сухих сахарных отравленных приманок, метод контакта с обработанными поверхностями и метод топикального нанесения

микрокапель инсектицида на переднеспинку мух. Показателем резистентности (ПР) служит отношение средне-летальной концентрации (дозы) $СК_{50}$ ($СД_{50}$) природной популяции мух к $СК_{50}$ ($СД_{50}$) чувствительной лабораторной расы. ВОЗ принят документ, в котором определяются величина ПР комнатной мухи и его вербальное описание. Согласно таблице ВОЗ, устойчивость с ПР < 10 характеризуется как низкая; от 10 до 40 – умеренная; от 40 до 160 – высокая, >160 – очень высокая (WHO, 1980).

Борьба с комнатной мухой – сложный вопрос отчасти потому, что у неё сформировались устойчивые популяции ко всем применяемым группам инсектицидов, используемым для борьбы с ними, включая препараты на основе пиретроидов, фосфорорганических соединений и карбаматов (табл. 1) (Li et al., 2012). Имеются сведения об

Таблица 1. Резистентность комнатной мухи к различным группам инсектицидов

Группа инсектицидов	Северная Америка ¹	Южная Америка ^{2,3}	Азия ^{4,5,6,7}	Европа ^{8,9,10}	Максимальный уровень показателя резистентности при селекции в лабораторных условиях	
	Количество изученных популяций					
	30	10	81	57		8
Показатель резистентности						
Хлороорганические соединения	95–>930	–	6–31	2.7–10	>4000	
Фосфорорганические соединения	2–>7100	45–62	0.1–1345	9–100	>3000	
Карбаматы	2–18	–	>1345	100	>1035	
Пиретроиды	5>290	65–117	0.2–852	2–554	4420	
Неоникотиноиды	1.2–33	–	7.7–>10000	–	200	
Фенилпиразолы	–	–	1.2–16	0.5–28	430	
Спиносины	–	–	3.7–9	5–6	247	
Авермектины	–	–	1.0–94	–	150	
Оксадиазины	–	–	3.1–23	–	>750	
Изоксазолины	0.7–10	62	–	–	–	
Пирролы	–	–	0.28	–	–	
Диамиды	–	–	6.0	–	750	
Регуляторы развития насекомых	–	0.24–62	1.5–64	1.6–6	1000	

1 – США (Darbro, Mullens, 2004; Burgess et al., 2020 и др.); 2 – Аргентина (Acevedo et al., 2009); 3 – Бразилия (Pinto, Prado, 2001); 4 – Китай (Ma et al., 2017, Wang et al., 2019 и др.); 5 – Малайзия (Bong, Zairi, 2010); 6 – Турция (Akiner, Çağlar, 2012; Memmi, 2010); 7 – Пакистан (Khan et al., 2015 и др.); 8 – Дания (Kristensen, Jespersen, 2003); 9 – Великобритания (Bell et al., 2010 и др.); 10 – Италия (Pezzi et al., 2011).

Table 1. Resistance of the housefly to different groups of insecticides

Group of insecticides	North America ¹	South America ^{2,3}	Asia ^{4,5,6,7}	Europe ^{8,9,10}	Maximal level of resistance factors for selection under laboratory conditions
	Number of examined populations				
	30	10	81	57	8
Resistance factors					
Organochlorine compounds	95->930	–	6–31	2.7–10	>4000
Organophosphorus compounds	2->7100	45–62	0.1–1345	9–100	>3000
Carbamates	2–18	–	>1345	100	>1035
Pyrethroids	5>290	65–117	0.2–852	2–554	4420
Neonicotinoids	1.2–33	–	7.7->10000	–	200
Phenylpyrazoles	–	–	1.2–16	0.5–28	430
Spinosins	–	–	3.7–9	5–6	247
Avermectins	–	–	1.0–94	–	150
Oxadiazines	–	–	3.1–23	–	>750
Isoxazolines	0.7–10	62	–	–	–
Pyrroles	–	–	0.28	–	–
Diamides	–	–	6.0	–	750
Insect growth regulators	–	0.24–62	1.5–64	1.6–6	1000

1 – USA (Darbro, Mullens, 2004; Burgess et al., 2020); 2 – Argentina (Acevedo et al., 2009); 3 – Brazil (Pinto, Prado, 2001); 4 – China (Ma et al., 2017, Wang et al., 2019); 5 – Malaysia (Bong, Zairi, 2010); 6 – Turkey (Akiner, Çağlar, 2012; Memmi, 2010); 7 – Pakistan (Khan et al., 2015); 8 – Denmark (Kristensen, Jespersen, 2003); 9 – UK (Bell et al., 2010); 10 – Italy (Pezzi et al., 2011).

устойчивости комнатной мухи к 58 инсектицидам, что позволило этому виду занять 4 место в списке 12 видов насекомых, имеющих резистентность к наибольшему количеству различных химических соединений (Sparks, Nauen 2015).

Устойчивость к инсектицидам в популяции комнатной мухи представляет собой основную проблему, с которой сталкиваются многие медицинские и ветеринарные организации во всем мире. В настоящее время выявлено более 330 случаев устойчивости комнатной мухи к инсектицидам всех используемых классов химических соединений (Sparks, Nauen 2015).

Хлорорганические соединения (ХОС). Резистентность к ХОС была установлена через несколько лет после начала их применения (Рославцева, 2006). Следует отметить, что, несмотря на запрет применения этих инсектицидов во всем мире, исследователи продолжают фиксировать наличие резистентности к ним в популяциях комнатной мухи. В Пакистане для γ -изомера ГХЦГ (линдан) и эндосульфана уровни ПР находились в диапазоне 5.6–22.0 (Khan et al., 2013a), а изученные популяции в Малайзии продемонстрировали устойчивость к ДДТ от 6.0 до 31.1 (Bong, Zairi, 2010). В Дании уровень устойчивости к γ -изомеру ГХЦГ в полевых популяциях колебался в пределах 1.8–8.1 \times (Kristensen et al., 2004). В США резистентность к соединениям класса ХОС часто достигает 50 \times и выше (Darbro, Mullens, 2004).

Фосфорорганические соединения (ФОС) и производные карбаминных кислот (карбаматы). При изучении устойчивости комнатной мухи в Аргентине были выявлены высокие значения ПР к ДДВФ (45.4–62.5) (Acevedo et al., 2009). На рубеже веков (1994–2001 гг.) в разных странах мира (Венгрия, Дания, США, Канада, Колумбия и Япония) исследователи фиксировали в основном низкую или умеренную устойчивость к метомилу (ПР менее 10), в то время как для карбарила, пропоксура и некоторых ФОС значения ПР часто достигает 50 и выше (Darbro, Mullens,

2004). При топикальном нанесении растворов метомила и азаметифоса в Великобритании выявлены значения ПР в диапазоне от низкой (2.5 и 2.4, соответственно) до умеренной резистентности (35.4 и 36.9, соответственно) (Learnmount et al., 2002). В то же время, в Дании отмечалась высокая резистентность к метомилу и пропетамофосу (Kristensen et al., 2001). Высокие уровни ПР комнатной мухи к ДДВФ и хлорпирифосу (37.1 и 42.3, соответственно) были обнаружены на территории Северной Италии (Pezzi et al., 2011).

В Пакистане были выявлены значения ПР комнатной мухи в диапазоне от 7.7 до 23.2 для профенофоса и от 2.5 до 7.4 для хлорпирифоса, в пределах 4.4–15.5 для метомила (Khan et al., 2013b). В Турции в зависимости от района исследований значения резистентности комнатной мухи к метомилу варьировали от чувствительных (ПР 0.3) до умеренных (ПР 21.9) и высоких (ПР 60.4) (Memmi, 2010). Мозаичность развития резистентности комнатной мухи наблюдалась и в Малайзии в разных географических точках сбора мух: значения ПР к пропоксуру колебались от 10.3 до 99.0 и от 15.2 до 27.8 (Bong, Zairi, 2010); к малатиону – от 7.8 до 47.0 и от 5.6 до 83.4 (Ong et al., 2015). Изучение устойчивости образцов комнатной мухи, собранных в нескольких городах Индонезии, выявило ПР к пропоксуру со значениями 18.2–38.4 (Intan et al., 2015). В нескольких районах Китая отмечены высокие значения ПР комнатной мухи к пропоксуру (154–1000), в то время как в некоторых районах она была чувствительна к этому инсектициду (Wang et al., 2019). Отселектированная в лабораторных условиях раса (N-PRS) проявила >1035 \times устойчивость к пропоксуру и 1.7-, 12.1-, 4.3-, 57.8- и 57.5-кратную перекрестную устойчивость к бета-циперметрину, дельтаметрину, бифентрину, фоксиму и азаметифосу, соответственно, по сравнению с чувствительной расой (PSS) (You et al., 2020).

Пиретроиды. Синтетические пиретроиды используются для борьбы с насекомыми в течение нескольких

десятилетий. Открытие в середине 1970-х годов перметрина и дельтаметрина и их успешное применение в ветеринарии и сельском хозяйстве привело к тому, что пиретроиды стали одним из доминирующих классов современных инсектицидов в борьбе с вредными насекомыми (Soderlund, 2008). Развитие устойчивости у комнатной мухи к пиретроидам (перметрин, лямбда-цигалотрин, бета-циперметрин и др.) было зарегистрировано в ряде регионов мира уже в начале 80-х годов XX века (Рославцева, 2006).

В ходе многолетней оценки развития устойчивости к пиретроидам у комнатной мухи в 42 районах Китая была установлена мозаичность распределения устойчивых к ним популяций насекомого. Так в 12 районах были установлены значения ПР > 500 к дельтаметрину и в 4 районах >1000 к перметрину (Zhang et al., 2008). Проведенный позднее мониторинг резистентности к этим пиретроидам выявил снижение значений до >100× к дельтаметрину и до <50× к перметрину, но к бета-циперметрину ПР равнялся 364 (Wang et al., 2019).

В Италии были зафиксированы высокие уровни устойчивости к пиретроидам d-фенотрину и эсфенвалерату (ПР 105 и 554 соответственно) (Pezzi et al., 2011). Более чем 100-кратные значения ПР к пиретроидам были обнаружены в нескольких популяциях насекомого из различных ферм в Дании (Kristensen et al., 2001). В США значения ПР к перметрину составили 22.7 и 21.3 в двух популяциях мухи (Kaufman et al., 2010). Значения ПР комнатной мухи к пиретринам в Великобритании варьировали от 1.7 до 24.0 (Learnmount et al., 2002).

С годами резистентность насекомых к инсектицидам сильно меняется в зависимости от экологических условий, интенсивности обработок, соблюдении систем ротации инсектицидов и других факторов. Так применение системы ротации инсектицидов привело к постепенному снижению уровней ПР к циперметрину в популяции комнатной мухи из Анталии (Турция) с 780 в 2004 году до 851 в 2005 году и 300 в 2006 году. Похожая картина наблюдалась еще в 5 городах Турции. Высокие значения устойчивости к дифенотрину были зафиксированы в популяциях мухи из Измира в 2004–2005 гг. (ПР 348 и 440, соответственно) и из Анталии в 2006 г. (ПР 286) (Akiner, Caglar, 2012).

В Пакистане была зарегистрирована высокая резистентность к циперметрину (ПР 30.2–70.0) и низкая или умеренная к дельтаметрину (ПР 5.7–18.3) (Khan et al., 2013a). Устойчивость мухи к лямбда-цигалотрину при селекции в лабораторных условиях достигала 98.3× (Abbas et al., 2016).

Значения ПР комнатной мухи к перметрину в двух районах Малайзии оказались низкими (ПР 0.5–1.9 и 0.6–2.4) (Bong, Zairi, 2010). В то же время, высокий уровень устойчивости к перметрину был зарегистрирован в Индонезии (ПР 133) (Intan et al., 2015).

Неоникотиноиды. Имидаклоприд как коммерческий инсектицид был зарегистрирован в 1991 году. Ранние исследования показывали высокую эффективность имидаклоприда в отношении популяций комнатной мухи, обладающих устойчивостью к инсектицидам из других классов. Первоначальный мониторинг резистентности в популяциях комнатной мухи до введения неоникотиноидов в ротацию выявил лишь незначительные вариации в их реакции на данные инсектициды (Kaufman et al., 2006;

Scott et al., 2013). Однако уже в 1994 г. был обнаружен первый случай развития резистентности к имидаклоприду у комнатной мухи.

В Италии популяция комнатной мухи была чувствительна к имидаклоприду (ПР 1.4) (Pezzi et al., 2011), но в это же время в Турции была определена высокая резистентность к этому инсектициду (ПР 449 – >1000) при контакте мухи с обработанными поверхностями (Memmi, 2010). На наш взгляд, эти цифры сильно завышены, поскольку неоникотиноиды, и особенно имидаклоприд, обладают слабым действием на насекомых при их контакте с обработанными поверхностями. Следует проверить уровни устойчивости мухи при скармливании им отравленных сахарных приманок. В 2008 году при изучении формирования устойчивости комнатной мухи к неоникотиноидам при скармливании отравленных приманок была выявлена перекрестная резистентность между имидаклопридом и другим неоникотиноидом – тиаметоксамом. Так в Пакистане на фоне высокой устойчивости к тиаметоксаму выявили более, чем десятикратные значения ПР к имидаклоприду (Khan, Shad, Akram, 2013a).

Более поздние исследования обнаружили развитие значительной устойчивости к имидаклоприду в популяциях, собранных в разных странах мира, включая Данию (Kristensen, Jespersen, 2008; Markussen, Kristensen, 2010), Пакистан (Khan et al., 2014) и Китай (Li et al., 2012). Например, в Дании диапазон устойчивости к тиаметоксаму в популяциях мух был очень широк: от чувствительности (ПР 6) до высокой резистентности (ПР 76–100) (Kristensen, Jespersen, 2008; Markussen, Kristensen, 2010).

Как показали исследования, в первом десятилетии 21 века в популяциях комнатной мухи из США устойчивость к имидаклоприду была довольно низкая, за исключением одной популяции, резистентность которой характеризуется как умеренная (ПР 23.7) (Kaufman et al., 2010). В 2014 году в США путем селекции в лабораторных условиях была получена раса комнатной мухи KS8S3, обладающая самыми высокими значениями ПР самок к имидаклоприду (>2300) в мире. Следует отметить, что у самцов этой расы значение ПР равнялось только 72. Отселектированная раса обладала перекрестной резистентностью к неоникотиноидам ацетамиприду (ПР 110), динотефурану (ПР 100), тиаметоксаму (ПР 26), нитенпираму (ПР 23) и нитиазину (ПР 3) (Kavi et al., 2014). Возможность быстрого развития резистентности к неоникотиноидам подтвердилось и в полевых условиях. Так в популяции комнатной мухи из Южной Калифорнии наблюдалась умеренная физиологическая и высокая поведенческая устойчивость к имидаклоприду, примененному в виде приманок – выживаемость мухи составила 72% (Gerry, Zhang, 2009). Всего за 5 лет бессменное применение имидаклоприда в виде приманок привело к быстрому формированию высокоустойчивой популяции комнатной мухи к данному инсектициду (Hubbard, Gerry, 2020; Hubbard, Gerry, 2021).

Пиретроид тиаметоксам – относительно новый инсектицид, который эффективно используется против комнатной мухи, однако и к нему отмечено развитие устойчивости во всем мире. Исследования, проведенные в Пакистане в 2015 г., продемонстрировали различный уровень устойчивости к тиаметоксаму в разных популяциях мухи (ПР от 7.7 до 20). Уровни ПР сильно варьировали и для других

неоникотиноидов: ацетамиприда (5.3–16), имидаклоприда (1.0–14) и нитенпирама (1.0–35) (Khan et al., 2015; Abbas et al., 2015a).

Фенилпиразолы. Значения ПР к фипронилу превышали 10-кратный уровень в трех популяциях мух из Пакистана (Khan et al., 2013a). При анализе показателей токсичности фипронила для 11 популяций комнатной мухи в Дании не было обнаружено в них развития устойчивости (ПР 0.9–2.4) (Kristensen et al., 2004). В тоже время при селекции этим инсектицидом комнатной мухи в лаборатории в течение 26 поколений была получена высокорезистентная раса (ПР >430) (Abbas et al., 2016).

Авермектины. Популяции комнатной мухи, собранные в двух районах Пакистана, показали величины ПР к эмамектин бензоату в диапазоне 38.4–94.4 и 13.2–36.3 (Khan et al., 2013b). При этом необходимо отметить быстрое ее развитие к этому инсектициду: селекция комнатной мухи эмамектин бензоатом в течение 5 поколений привела к увеличению уровня ПР с 35.15 до 149.26, т.е. в 6 раз (Akram et al., 2016).

Из-за стремительного роста устойчивости в популяциях комнатной мухи к применяемым инсектицидам, ежегодно проводятся исследования по поиску эффективных инсектицидов из новых химических классов, к которым резистентность еще не успела развиться. Это необходимо для усовершенствования схем их ротации для преодоления резистентности.

Спиносины. На территории Северной Италии и в Пакистане были выявлены различные ПР комнатной мухи к спиносаду (3.9 и 2.9–9.0, соответственно) (Pezzi et al., 2011; Khan et al., 2013b). В упомянутой выше расе комнатной мухи KS8S3, высоко резистентной к неоникотиноидам, не было обнаружено перекрестной устойчивости к спиносаду (ПР 0.77) (Kavi et al., 2014). В результате непрерывной селекции комнатной мухи в течение 27 поколений была получена раса SpRR с ПР 247 к спиносаду в сравнении с чувствительной к нему расой CSS (Shi et al., 2011).

Оксадиазины. Индосакарб является эффективным инсектицидом широкого спектра действия, в том числе и в отношении комнатной мухи. В Японии и Пакистане были выявлены ее популяции, в которых был определен начальный этап развития устойчивости к данному токсиканту (ПР 0.5–1.9 и 3.0–7.1 соответственно) (Shono et al., 2004; Khan et al., 2013b).

Диамиды. Хлорантранилипрол, агонист рианодиновых рецепторов, представляет собой многообещающее средство борьбы с различными видами насекомых. Для разработки стратегии управления резистентностью были изучены особенности жизненного цикла отселектированной в лабораторных условиях расы комнатной мухи (СТPR-SEL) в сравнении с популяцией UNSEL и их реципрокных скрещиваний. После восьми поколений последовательного отбора хлорантранилипролом у расы СТPR-SEL развился 750-кратный уровень устойчивости по сравнению с чувствительной расой мух и 124-кратный уровень устойчивости в сравнении с популяцией UNSEL. Показано, что раса СТPR-SEL имеет более низкую

относительную приспособленность (0.34), пониженную плодовитость и жизнеспособность яиц и, соответственно, более низкий биотический потенциал и репродуктивную способность по сравнению с популяцией UNSEL. При этом у расы СТPR-SEL отсутствует перекрестная устойчивость к спиносаду, фипронилу и бифентрину, а резистентность к хлорантранилипролу – нестабильна, что способствует введению этих инсектицидов в схемы ротации борьбы с комнатной мухой (Shah, Shad, 2020). Перспективность использования диамидов в борьбе с этим насекомым подтверждена высокой эффективностью еще одного нового инсектицида из этой группы – циантранилипрола (Li et al., 2015).

Изоксазолины. В США в отдельных популяциях комнатной мухи выявлен начальный этап развития устойчивости к флураланеру: уровни ПР колеблются от 0.7 до 10.0, о чем сообщила только одна группа исследователей (Burgess et al., 2020).

Регуляторы развития насекомых (РРН). Первое упоминание о развитии устойчивости комнатной мухи к циромазину (группа триазинов) появилось в 2010 году в Великобритании. У личинок, полученных из популяций мухи, собранных на одной из свиноферм, величины ПР к циромазину составили 2.4–2.9, а после двух обработок дозами инсектицида 1.0–1.5 мг/кг увеличились до 3.9–5.6 (Bell et al., 2010). В Дании была определена высокая устойчивость личинок мухи к дифлубензурону (ингибитор синтеза хитина, ИСХ) и циромазину (ПР 1000 и 200 соответственно) (Kristensen, Jespersen 2003).

Развитие резистентности к ларвицидам в популяциях комнатной мухи было установлено в ряде стран Южной Америки. Так у трех из пяти оцениваемых популяций комнатной мухи из Бразилии ПР к циромазину варьировали от 0.24 до 12.8 (Pinto, Prado, 2001). В Аргентине в популяциях комнатной мухи с птицефабрик были зафиксированы 3.9, 11 и 63 ПР к циромазину (Acevedo et al., 2009).

Пирипроксифен (аналог ювенильного гормона, АЮГ) – регулятор развития насекомых, используется в борьбе с различными видами насекомыми, включая комнатную муху. В Пакистане была оценена токсичность регуляторов развития РРН для личинок комнатной мухи 5 популяций и установлены уровни ПР: к пирипроксифену 25.7, к метоксифенозиду (диацилгидразин) 7.3, к циромазину 7.7 и к люфенурону (ингибитор синтеза хитина, ИСХ) 27 (Shah et al., 2015a, Shah et al., 2017). В опытах других исследователей (Abbas et al., 2015b) были определены: начальный период развития устойчивости к пирипроксифену (0.3–6.6×), к циромазину (0.8–6.5× и 18×), к метоксифенозиду (1.0–7.4× и 14× и высокий к люфенурону (22×). В Турции были получены ПР личинок мухи на уровне 10–13 к ряду РРН (дифлубензурону, метопрену, новалурону, пирипроксифену и трифлумурону) (Cetin et al., 2009). Небольшие ПР к пирипроксифену были выявлены в Израиле и в нескольких штатах США (5) (Biale et al., 2017). Следует отметить, что в лабораторных условиях при селекции личинок комнатной мухи пирипроксифеном в течение 22 поколений удалось добиться 130 ПР (Shah et al., 2015b).

Резистентность комнатной мухи в России

В России данных по резистентности комнатной мухи сравнительно мало. В конце 20 века на базе НИИ

Дезинфектологии Роспотребнадзора проводился мониторинг устойчивости к ряду инсектицидов из различных

групп химических соединений в популяциях комнатных мух в Псковской области, а также в нескольких районах города Москвы. Установлено, что в Псковской области в местах отлова мух химических обработок не проводилось, в связи с чем резистентность к препаратам, практически, отсутствовала: величины ПР к пиретроидам колебались в пределах 0.2–1.6, к органофосфату ДДВФ менее 1.2. Популяция «Тверская», отловленная в центре Москвы, была мало устойчива к фенвалерату (ПР 4.6) и резистентна (ПР 12–22.5) к остальным изученным пиретроидам (тетраметрин, d-фенотрин, перметрин и циперметрин). В популяции комнатной мухи «Крылатское» (Москва) была установлена высокая резистентность к перметрину (ПР 133) (Рославцева, 2006; Вавилова, 1999). Наблюдалось развитие устойчивости в популяции комнатной мухи «Очаково», собранной в Москве, к перметрину (ПР 14), циперметрину (ПР 7.7), альфаметрину (ПР 4.4) и хлорпирифосу (ПР 2.7) и ее чувствительность к дифенотрину, цифлутрину, пропоксуру, фипронилю и аверсектину С (Рославцева, 2006).. В популяциях насекомого из Московской области была установлена его чувствительность к перметрину (2.6×), тетраметрину (3.5×) и фенвалерату (2.0×) (Полякова, 1995). В последующем изучение московских популяций комнатной мухи выявило в них развитие высоких уровней резистентности к ДДВФ (ПР 29–48), к перметрину (ПР 60–400) и циперметрину (ПР 11–37), как наиболее применяемых в те годы в борьбе с ней инсектицидов (Полякова, 1998).

Анализ выборок из популяций комнатной мухи в животноводческих хозяйствах Тюменской области выявил их чувствительность к пиретроидам дельтаметрину, циперметрину, перметрину и эсфенвалерату (ПР 1.1–2.1) (Левченко, 2017). Был также определен высокий показатель резистентности к ацетамиприду (ПР 57) и начальный этап ее развития к ивермектину (5) (Левченко с соавт., 2019). В популяции мухи из птицеводческого хозяйства был выявлен начальный этап развития резистентности к неоникотиноиду ацетамиприду (5×) и чувствительность к инсектицидам из новых классов авермектинов – ивермектину, пирролов – хлорфенапиру и фенилпиразолов – фипронилю

(ПР 1 – <2) (Левченко, Силиванова, 2019; Левченко, 2020). По результатам оценки кишечного действия инсектицидов на личинок комнатной мухи были получены близкие показатели ацетамиприда (ПР 2.5), фипронила (ПР 0.7), ивермектина (ПР 0.8) и хлорфенапира (ПР 1.1) (Левченко с соавт., 2018; Силиванова с соавт., 2020). Сводные данные ПР комнатной мухи к инсектицидам, полученные в России приведены в таблице 2.

Таблица 2. Резистентность комнатной мухи к инсектицидам в России (Полякова, 1995; 1998; Рославцева с соавт., 1998; Вавилова, 1999; Левченко с соавт., 2018; 2019; Левченко, 2020)

Группа инсектицидов	Количество изученных популяций
	23
Показатель резистентности	
ХОС	>30
ФОС и карбаматы	>100–500
Пиретроиды	0.8–400
Неоникотиноиды (ацетамиприд)	1.0–57.5
Фенилпиразолы (фипронил)	1.0–1.3
Авермектины	0.6–10.0
Пирролы (хлорфенапир)	0.6–1.5

Table 2. Resistance of the housefly to insecticides in Russia (Roslavtseva et al., 1998; Vavilova, 1999; Polyakova, 1995; 1998; Levchenko et al., 2018; 2019; Levchenko, 2020)

Insecticide group	Number of examined populations
	23
Resistance factors	
Organochlorine compounds	>30
Organophosphorus compounds and carbamates	>100–500
Pyrethroids	0.8–400
Neonicotinoids (acetamiprid)	1.0–57.5
Phenylpyrazoles (fipronil)	1.0–1.3
Avermectins	0.6–10.0
Pyrroles (chlorphenapyr)	0.6–1.5

Механизмы резистентности

Еще в 70-х годах 20 века при изучении генетики устойчивости к пиретроидам было описано несколько факторов, определяющих развитие резистентности у комнатной мухи. Пониженное проникновение инсектицидов в организм резистентных особей насекомых впервые было установлено в 1960-х годах для пиретринов, фосфорорганических соединений, карбаматов и хлорорганических соединений. Это может происходить в результате проявления нескольких механизмов, включая усиление экспрессии метаболической устойчивости в покровах, повышенное присутствие связывающих белков, липидов и/или склеротизация покровов, заметно более толстая кутикула или сочетание некоторых или всех этих механизмов вместе. Так, изменение толщины кутикулы постельного клопа *Cimex lectularius* на 1.5 микрона приводит к полному отсутствию чувствительности насекомых при контакте с обработанной поверхностью (Lilly et al., 2016). Развитие молекулярных методов показало, что резистентность к

разным инсектицидам сопровождается появлением различных мутаций в геноме насекомых (Meisel Scott, 2018). Высокая резистентность возникает у насекомых за счет большой адаптивности. Анализ профиля транскрипции 12 молекулярных генов-мишеней и двух *kdr*-мутаций у 24 популяций лабораторных рас постельного клопа подтвердил множественность механизмов, детерминирующих развитие резистентности. Изученные 5 механизмов авторами охарактеризованы как 1) P450-зависимые монооксигеназы, 2) эстеразы, 3) белки кутикулы, 4) ABC-транспортёры, 5) *Kdr*-фактор. Показано, что в формировании резистентности постельного клопа к пиретроидам в 71.4% случаев участвовало 5 механизмов, в 19.0% – 4 механизма, в 4.8% – 3 механизма, в 4.8% – 2 механизма. (Zhu et al., 2013).

Цитохром P450-зависимые монооксигеназы составляют одно из крупнейших суперсемейств ферментов всех живых организмов, обладающих большим разнообразием физиологических и биохимических функций. У насекомых

идентифицировано более 1000 цитохромов P450, выделено более 150 подсемейств 40 известных семейств генов P450. Известно, что цитохром P450 играет важную роль в детоксикации экзогенных соединений, в том числе инсектицидов. Повышенные уровни концентрации белка P450 и его активности отвечают за усиленную метаболическую детоксикацию различных токсинов, что приводит к развитию устойчивости к ним насекомых (Liu, Zhu, 2011).

Повышенная метаболическая детоксикация цитохромом P450, эстеразами и/или глутатион-S-трансферазами (GST) служит одним из основных механизмов резистентности к пиретроидам у многих видов насекомых (Zhu et al., 2013). Обычно геном каждого вида насекомого содержит различное количество генов цитохрома P450, варьирующее от десятков до более, чем сотни (Feuereisen 2011). Относительную экспрессию 42 генов цитохрома P450 проверяли в чувствительной расе LA-1 и резистентных к инсектицидам рас CIN-1NS и NY-1 постельного клопа (Zhu et al., 2013). Для четырех генов цитохрома P450 (CYP397A1, CP398A1, CYP6DN1, CYP4-CM1) выявлено значительное повышение экспрессии у резистентных рас по сравнению с чувствительной расой насекомого. Избыточная экспрессия CYP6D1v1 отвечает за устойчивость насекомого к пиретроидам и встречается во всем мире. Роль аллелей устойчивости CYP6D1 варьирует в зависимости от инсектицида. Пиперонилбутоксид (ППБ) служит синергистом, который ингибирует монооксигеназы P450, эффективно устраняя вклад CYP6D1v1 в устойчивость к пиретринам (Scott et al., 2013).

Показано изменение активности различных ферментов в резистентной к имидаклоприду расы комнатной мухи N-IRS: карбоксилэстераз в 1.3–1.5 раза, GST – в 2.4 раза и цитохрома P450 – в 4.6 раза. Три синергиста, диэтилмалеат (ДЭМ, ингибитор GST), S,S,S-трибутилтретиофосфат (ТБТФ, ингибитор эстераз) и ППБ (ингибитор монооксигеназ), выявили значительный синергизм в смеси с имидаклопридом в отношении резистентной расы комнатной мухи N-IRS (КСД 4.55, 4.46 и 3.34, соответственно) по сравнению с таковыми у чувствительной расы (1.30, 2.43 и 1.27, соответственно) (Ma et al., 2017). Исследование влияния ППБ на инсектицидную активность спиносада для комнатной мухи и экспрессии генов CYP6A1, CYP6D1 и CYP6D3 показали частичное участие генов цитохрома P450 в устойчивости к спиносаду (Markussen, Kristensen 2012).

Устойчивость к пиретроидам может быть связана с повышенной активностью детоксицирующих ферментов или изменениями чувствительности участков-мишеней (Morin et al., 2002). Точно так же резистентность к ФОС может быть связана с детоксицирующими ферментами или с изменением чувствительности сайта-мишени (например, ацетилхолинэстеразы) (Khan et al., 2015). Перекрестная резистентность между ФОС и пиретроидами была отмечена у комнатной мухи (Liu, Yue, 2000), капустной моли *Plutella xylostella* (Sayyed et al. 2005), азиатской хлопковой совки *Spodoptera litura* (Saleem et al. 2008) и комара *Aedes albopictus* (Khan et al. 2011). Устойчивость к этим соединениям может быть связана с активностью монооксигеназ, эстераз или их сочетанием (Sayyed et al. 2010). Исследования синергизма ФОС с ингибиторами ферментов ППБ и ТБТФ показали снижение устойчивости к профенофосу

в 2 и 3 раза, соответственно. Это предполагает, что устойчивость к профенофосу у расы Profen-SEL может быть связана с активностью ферментов монооксигеназ и эстераз. При действии смеси ППБ+профенфос на лабораторную чувствительную расу комнатной мухи коэффициент синергического действия (КСД) составил 0.77, а на высокорезистентной расе Profen-SEL (ИП к профенфосу103) КСД = 1.96. Большого синергизма удалось достичь при применении ингибитора эстераз ТБТФ 1.27 и 2.81 соответственно (Sayyed et al. 2010, Khan et al., 2015). Анализ синергизма фипронила с ППБ и ТБТФ также показал, что устойчивость *M. domestica* к фипронилу связана с микросомальными оксидазами и эстеразами (Abbas et al., 2014).

Основным механизмом резистентности к ФОС и карбатам многих видов членистоногих выступает активность нечувствительной к действующим веществам этих групп ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Генетические изменения, зарегистрированные в АХЭ, и их роль в резистентности к инсектицидам были показаны на комнатной мухе (Walsh et al., 2001). Пять точечных мутаций в гене AChE, а именно: Val 180→Leu, Gly 262→Ala, Gly 262→Val, Phe 327→Tyr и Gly 365→Ala (по отдельности или в комбинации) вносит вклад в устойчивость к инсектицидам комнатной мухи (Walsh et al. 2001, Naqqash, et al., 2016). У высокорезистентной к пропоксуре расы мухи N-PRS (>1035×) чувствительность АХЭ к этому инсектициду была примерно в 100 раз ниже по сравнению с таковой чувствительной расы PSS. Кроме того, уровень транскрипции и количество копий ДНК Mдасе были значительно выше у устойчивой расы, чем у чувствительной. Таким образом, мутации в сочетании с повышенной экспрессией генов могут иметь важное значение для устойчивости комнатной мухи к пропоксуре (You et al., 2020).

Карбоксилэстеразы также относятся к основным семействам ферментов, участвующих в детоксикации ксенобиотиков. Считается, что сверхэкспрессия генов карбоксилэстеразы выступает основным компонентом механизмов устойчивости насекомых к инсектицидам. Основываясь на данных генома комнатной мухи, у насекомого было идентифицировано в общей сложности 39 генов карбоксилэстераз различных функциональных классов. Было обнаружено, что одиннадцать из этих генов были сверхэкспрессированы у резистентной расы *M. domestica* по сравнению с чувствительной (Feng et al., 2018). Отмечена повышенная активность эстеразы CICE21331 у резистентной расы постельного клопа (Zhu et al., 2013).

Также эти ферменты отвечают за устойчивость к ФОС. Было выдвинуто предположение, что у комнатной мухи и, возможно, у других насекомых, локус хромосомы II служит главным и единственным, отвечающим за регуляцию метаболизирующих инсектициды ферментов. Предположительно, он взаимодействует со второстепенными генами на других хромосомах, определяя метаболическую устойчивость ко многим типам инсектицидов, индуцируя синтез соответствующих детоксицирующих ферментов (Taskin, Kence, 2004; Pezzi et al., 2011).

У большинства многоклеточных животных GST кодируются семействами генов и используются для детоксикации ксенобиотиков. Показана структура геномных локусов, кодирующих GST у комнатной мухи, которые были вовлечены в устойчивость к инсектицидам. Также надо

отметить, что один из ферментов тета-класса, MdGST-3, чрезмерно продуцируется резистентными мухами и разрушает некоторые инсектициды (Nakamura et al., 2013).

Кутикулярные белки представляют собой основные компоненты кутикулы насекомых, которые служат первой линией защиты от инсектицидов (Wood et al., 2010). Недавние исследования показали, что утолщение кутикулы связано с устойчивостью к пиретроидам у *Anopheles funestus* (Wood et al., 2010). У колорадского жука *Leptinotarsa decimlineata* уровни мРНК были выше у особей, устойчивых к азинфосметилу, чем у чувствительных (Zhang et al., 2008). При исследовании экспрессии 15 генов, кодирующих кутикулярные белки *C. lectularius*, выявлена повышенная экспрессия трех генов (C2, C10 и C13) у устойчивых к пиретроидам рас (Zhu et al., 2013).

ABC-транспортёры (АТФ-зависимые кассетные транспортные белки, *Adenosine-triphosphate Binding Cassette*) составляют один из крупнейших классов транспортёров, которые отвечают за транслокацию многих субстратов, включая ксенобиотики, через мембраны под действием АТФ (Rees et al., 2009, Labbe et al., 2011). Анализ RNA-Seq показал, что 8 из 27 ABC-транспортёров активированы у устойчивых к инсектицидам постельного клопа по сравнению с выборками чувствительных насекомых (Mamidala et al., 2012, Zhu et al., 2013). Повышенная активность генов, кодирующих ABC-транспортёры, обнаружена у многих резистентных к инсектицидам видов членистоногих: комаров *Anopheles stephensi* и *Aedes caspius* (Epis et al., 2014, Porretta et al., 2008), плодовой мушки *Drosophila melanogaster* (Luo et al., 2013), хлопковой совки *Helicoverpa armigera* (Aurade et al., 2010), клеща *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Pohl et al., 2014) и др.

Устойчивость к нокдаун-эффекту у комнатной мухи была впервые описана в 1951 году. Этот признак придает устойчивость к начальному паралитическому эффекту ДДТ, его аналогов, пиретринов и пиретроидов, но не к хлорированным циклодиенам (ГХЦГ) (Soderlund, Knipple 2003; Tian et al., 2011). Точечные мутации, приводящие к структурным изменениям белка потенциал-зависимых натриевых каналов и снижающие токсическое действие, а также повышенная детоксикация, опосредованная сверхэкспрессией цитохрома P450 (CYP6D1), отнесены к двум основным механизмам резистентности к пиретроидам (Seifert, Scott, 2002; Pan et al., 2018; Scott, 2017).

Широкое многолетнее использование ХОС, в том числе ДДТ, подготовило почву для быстрого развития резистентности к пиретроидам, а применение γ -изомера ГХЦГ – к фенилпиразолам. Это вызвано тем, что при развитии устойчивости к ДДТ в K,Na-каналах нервных клеток насекомых появляются мутации *kdr*-типа (*kdr*-фактор, *Knockdown resistance*), а при отборе линданом – в нервно-мышечном синапсе возникают мутации *rdd*-типа (*Resistance to dieldrin*), что обеспечивает широкую перекрестную устойчивость к пиретроидам и фенилпиразолам соответственно. Появление мутации A302S в аллеле Rdl (*Resistance to dieldrin*) в ГАМК-зависимых хлорных каналах показывает связь устойчивости к ХОС диенового синтеза с таковой к фенилпиразолам (Gao et al. 2007).

Впервые устойчивость к нокдауну была идентифицирована у комнатной мухи, и наиболее подробная информация о ней получена с использованием именно этого вида

насекомого (Soderlund, 2008). Существуют несколько мутаций натриевых каналов, которые обеспечивают устойчивость комнатной мухи к пиретроидам: три аллеля – *kdr*, *kdr-his* и *super-kdr*. Аллель *kdr* возникает из-за одной мутации – замены аминокислоты лейцина на фенилаланин (L1014F). Аллель *super-kdr* обусловлен двумя мутациями: M918T (от метионина к треонину) + L1014F и возникает у насекомых, уже имеющих аллель *kdr*. Аллель *kdr-his* возникает из-за одной замены аминокислоты лейцина на гистидин (L1014H). Наличие мутации *super-kdr* приводит к более высоким уровням устойчивости к пиретроидам, чем *kdr*. Множественные механизмы могут взаимодействовать, увеличивая уровни резистентности (табл. 3) (Liu, Pridgeon, 2002; Scott et al., 2013).

Таблица 3. Значения показателя резистентности к пиретроидам комнатной мухи в зависимости от наличия типа мутации *kdr-his*, *kdr*, или *super-kdr* (Scott et al., 2013; Scott, 2017)

Инсектицид	Показатель резистентности в зависимости от типа мутаций в натриевых каналах		
	NChis	<i>Kdr</i>	<i>супер-kdr</i>
Циперметрин	7.8	6.7–16	130–150
Дельтаметрин	4.8	12–34	220–400
Перметрин	5.1	19–21	48–59
Ресметрин	4.9	11–13	37

Table 3. Housefly resistance factor values to pyrethroids depending on the presence of the *kdr-his*, *kdr*, or *super-kdr* mutation type (Scott et al., 2013; Scott, 2017)

Insecticide	Resistance factor depending upon mutation type in sodium channels		
	NChis	<i>Kdr</i>	<i>super-kdr</i>
Cypermethrin	7.8	6.7–16	130–150
Deltamethrin	4.8	12–34	220–400
Permethrin	5.1	19–21	48–59
Resmethrin	4.9	11–13	37

Точечные мутации в натриевых каналах, называемые мутациями *kdr*, уменьшают или устраняют сродство связывания инсектицидов с натриевыми каналами, вызывая устойчивость к инсектицидам (Dong 2007). Две мутации, V419L и L925I, в гене α -субъединицы потенциал-зависимого натриевого канала были идентифицированы как очень важные замены, ответственные за устойчивость к дельтаметрину у постельных клопов (Zhu et al. 2010, Yoon et al. 2008).

Поведенческая резистентность к соединениям различных классов химических веществ рассмотрена рядом авторов. В исследовании К. Хаббарда и А. Джерри (Hubbard, Gerry, 2021) показано, что поведенческая устойчивость комнатной мухи к имидаклоприду была связана с факторами на аутосомах 1 и 4. Хотя в настоящее время неизвестно, какие гены могут быть ответственны за обнаружение инсектицида и результирующую поведенческую реакцию устойчивости, была выдвинута гипотеза, что причиной могут быть изменения в хемосенсорной системе *M. domestica*. Комнатная муха обладает большим количеством различных хеморецепторов, включающим более 87 белков, связывающих запахи, 85 генов, кодирующих 86 рецепторов запаха, 79 генов, кодирующих 103 вкусовых рецептора

и 110 ионотропных рецепторов (Scott et al., 2014). Возможно, что мутации возникли в генах, контролирующих хемосенсорный ответ, которые вызывают или усиливают аверсивный (не связанный с кормлением) ответ на имидаклоприд в поведенчески устойчивых линиях мух. Работы по изучению аверсии к сахарам *D. melanogaster* и рыжего таракана *Blattella germanica* показали, что генетические мутации могут приводить к изменениям хеморецепторов, что приводит к изменению поведения насекомых, включая отвращение к пище и подавление её потребления (Wada-Katsumata et al., 2014, French et al., 2015., Chen et al. 2019). Показано, что аверсия к имидаклоприду у комнатной мухи также находится под генетическим контролем (Hubbard,

Gerry, 2021). Следует отметить, что все изученные линии мух предпочитали питаться сахарозой, смешанной с неоникотиноидом динотефураном, а не сахарозой с имидаклопридом, вероятно, из-за специфической детекции имидаклоприда и отвращения к нему, в то время как динотефуран либо не обнаруживается, либо не вызывает отвращения у этих мух (Hubbard, Gerry, 2020). Динотефуран имеет совершенно иную химическую структуру по сравнению с имидаклопридом (Matsuda et al., 2020), в связи с чем, возможно, используются различные сайты связывания никотинового ацетилхолинового рецептора для этих двух химических веществ (Kiryama et al., 2003).

Преодоление резистентности

Для преодоления перекрестной устойчивости и повышения инсектицидного эффекта могут быть использованы бинарные смеси химических препаратов. Известны многие комбинации фосфорорганических соединений и пиретроидов. За рубежом известны смеси циперметрин–этион, дельтаметрин–триазофос и дельтаметрин–хлорпирифос. Имеется ряд смесевых препаратов ФОС и пиретроидов: 50% хлорпирифоса и 5% циперметрина (Китай), 50% профенофоса и 4% циперметрина, 1% дельтаметрина и 35% триазофоса (Индия) (Ago et al., 2017). В России также имеется ряд смесевых препаратов. Известно средство против комнатной мухи (*Musca domestica*) в форме гранулированной приманки, которая включает в себя имидаклоприд, тиаметоксам и фипронил в количестве от 0.01% до 5% (Левченко и др., 2018). Против комнатной мухи используют концентрированную эмульсию с двумя активными компонентами хлорпирифос 20% и циперметрин 10%.

Наиболее обычны и применяются в быту средства в аэрозольных упаковках с пропеллентом. Они могут содержать 2–4 инсектицидных компонента и синергист ППБ. Большой интерес представляют собой отравленные приманки на основе новых ДВ, в том числе и смесевых. Так, при изучении эффективности для комнатной мухи смеси фипронила и хлорфенапира в составе приманочных средств, в России было выявлено, что препарат обладает высокой инсектицидной эффективностью в отношении комнатной мухи с остаточным действием до 14 дней (Левченко, 2020). Использование смесей инсектицидов имеет широкое применение. Комбинации нескольких химических веществ дает положительные результаты, возможно, потому, что насекомым сложнее развивать несколько адаптивных реакций одновременно (Соколянская, Амирханов, 2006).

Заключение

Борьба с комнатной мухой – важный процесс в профилактике различных болезней человека и животных. Из-за биологических особенностей, а также близкого контакта с человеком и пищей, мухи механически переносят огромное количество возбудителей инвазионных и инфекционных заболеваний, особенно кишечной группы. Комнатная муха заражают пищевые поверхности, распространяя болезнетворные организмы повсюду. Проблема формирования устойчивых к инсектицидам популяций насекомых с каждым годом приобретает все большее значение для медицинской и ветеринарной дезинсекции. Резистентность

В качестве ларвицидов также могут быть использованы средства на основе регуляторов развития насекомых – ингибиторов синтеза хитина или аналогов ювенильного гормона (пирипроксифен, дифлубензурон, метопрен, трифлумурон и др.).

Схема ротации ларвицидов

- фосфорорганические инсектициды: малатион, трихлорфон (хлорофос), фентион, темефос, хлорпирифос и др.
- регуляторы развития насекомых – ювеноиды: пирипроксифен, метопрен; ингибиторы синтеза хитина: дифлубензурон, трифлумурон; триазины – циромазин;
- цианосодержащие пиретроиды,
- смесевые препараты пиррол+ пиретроид (хлорфенапир + альфа-циперметрин))
- смесевые препараты неоникотиноид+пиретроид (тиаметоксам + лямбда-цигалотрин)
- смесевые препараты ФОС + пиретроид (хлорпирифос + циперметрин)
- карбаматы (пропоксур)
- фенилпиразолы (фипронил)

Схема ротации инсектицидных приманок

в борьбе с окрыленными мухами

- фосфорорганические инсектициды (хлорофос);
- неоникотиноиды (тиаметоксам; имидаклоприд; ацетамиприд)
- карбаматы – метомил;
- регуляторы развития насекомых – пирипроксифен, метопрен, циромазин и др.
- пирролы (хлорфенапир)
- оксадиазины (индоксакарб)
- клейких ловушек (липкие ленты, клейкие листы).

к большому количеству применяемых инсектицидов создает ряд сложностей при проведении дезинсекции на объектах медицинского и ветеринарного значения. Поэтому, важно проводить мониторинг устойчивых популяций насекомых, соблюдать санитарии и гигиену в помещениях. Все это необходимо для предотвращения распространения многих инфекционных заболеваний.

Наличие мух на различных объектах говорит о неудовлетворительной санитарной обстановке или о неэффективности проводимых дезинсекционных мероприятий. При проведении химических обработок, необходимо

применять схемы ротации инсектицидов и использовать инсектициды из разных химических классов, чтобы предотвратить развитие резистентности и эффективно бороться с этим насекомым.

Мировая практика развития резистентности демонстрирует увеличение значений ПР к традиционным инсектицидам во всех странах. Динамика формирования и развития резистентности у популяций комнатной мухи говорит о том, что устойчивых популяций с каждым годом становится все больше. Эта проблема всегда остается актуальной. Из различных источников литературы мы можем увидеть, что уровни ПР могут повышаться не в десятки, а

в сотни раз, ареалы резистентных популяций расширяются постоянно. Мировая история использования различных средств показывает, что необходимы новые действующие вещества. В 21 веке были разработаны новые химические соединения, направленные на преодоление резистентности у насекомых. К таким веществам можно отнести диамиды, мета-диамиды и изоксазолины, которые имеют совершенно другой механизм действия, что дает надежду на решение проблемы формирования устойчивых популяций. Эти новые инсектициды показывают важность изучения механизмов в поддержании арсенала безопасных и эффективных инсектицидов.

Библиографический список (References)

- Вавилова ВВ (1999) Эколого-физиологические параметры популяций комнатной мухи как индикатор различных уровней техногенного загрязнения. *Автореф. дисс... к.с.-х.н.* М. 15 с.
- Левченко МА (2020) Оценка эффективности фипронила и хлорфенапира против *Musca domestica* L. на объектах ветеринарного надзора. *Вестник Красноярского Государственного Аграрного Университета* 12:147–151. <https://doi.org/10.36718/1819-4036-2020-12-147-151>
- Левченко МА, Силиванова ЕА, Плашкина ВА, Шумилова ПА (2019) Резистентность природных популяций *Musca domestica* L. к современным инсектицидам. *Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии* 4:407–412. <https://doi.org/10.25725/vet.san.hygiene.ecology.201904011>
- Левченко МА, Силиванова ЕА (2019) Тактика борьбы с *Musca domestica* на объектах ветеринарно-санитарного надзора. *Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями* 20:308–312. <https://doi.org/10.31016/978-5-9902340-8-6.2019.20.308-312>
- Левченко МА (2017) Чувствительность природной популяции *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) к пиретроидным инсектицидам. *Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии* 4:71–75.
- Левченко МА, Силиванова ЕА, Балабанова ГФ, Бикияева РХ (2018) «Способ борьбы с мухами в помещениях ветеринарно-санитарного надзора и инсектицидный состав для его осуществления». Патент на изобретение RUS 2370035
- Полякова ЮБ (1995) Биологические показатели и резистентность к инсектицидам комнатной мухи из районов, подверженных разному химическому загрязнению: *Автореф. дисс....к.б.н.* М. 16 с.
- Полякова ЮБ (1998) Результаты мониторинга чувствительности комнатной мухи к инсектицидам. *РЭТ-инфо* :10–13.
- Рославцева СА Еремина ОЮ, Баканова ЕИ и др. (1998) Исследование механизмов резистентности насекомых к инсектицидам (на примере природных популяций комнатной мухи *Musca domestica*. *Агрохимия* 10:14–23.
- Рославцева СА (2006) Резистентность к инсектоакарицидам членистоногих, имеющих эпидемиологическое и санитарно-гигиеническое значение. М.: Компания Спутник+, 130 с.
- Силиванова ЕА, Шумилова ПА, Левченко МА (2020) Чувствительность к инсектицидам и активность ферментов детоксикации у *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) природной популяции. *Вестник Красноярского Государственного Аграрного Университета*. 12:102–109. <https://doi.org/10.36718/1819-4036-2020-12-102-109>
- Соколянская МП, Амирханов ДВ (2006) Пути преодоления резистентности насекомых к инсектицидам. *Вестник Башкирского государственного аграрного университета* 2:7–12.
- Abbas N, Ijaz M, Shad SA, Binyameen M (2016) Assessment of resistance risk to fipronil and cross resistance to other insecticides in the *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Vet Parasitol* 223:71–76. <https://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.04.026>
- Abbas N, Khan HAA, Shad SA (2014) Cross-resistance, genetics, and realized heritability of resistance to fipronil in the house fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): a potential vector for disease transmission. *Parasitol Res* 113:1343–1352. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3773-4>
- Abbas N, Shad SA Shah RM (2015b) Resistance status of *Musca domestica* L. populations to neonicotinoids and insect growth regulators in Pakistan poultry facilities. *Pakistan J Zool* 47(6):1663–1671.
- Abbas N, Shad SA, Ismail M (2015a) Resistance to conventional and new insecticides in house flies (Diptera: Muscidae) from poultry facilities in Punjab, Pakistan. *J Econ Entomol* 108(2):826–833. <https://doi.org/10.1093/jeetou057>
- Abbas N, Shah RM, Shad SA, Iqbal N, Razaq M (2016) Biological trait analysis and stability of lambda-cyhalothrin resistance in the house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Parasitol Res* 115:2073–2080. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4952-2>
- Acevedo GR, Zapater M, Toloza AC (2009) Insecticide resistance of house fly, *Musca domestica* (L.) from Argentina. *Parasitol Res* 105(2):489–493. <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1425-x>
- Akiner MM, Caglar SS (2012) Monitoring of five different insecticide resistance status in Turkish house fly *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) populations and the relationship between resistance and insecticide usage profile. *Türk Paraz Derg* 36(2):87–92. <https://doi.org/10.5152/tpd.2012.21>
- Akram W, Khan T, Haider MS, Iqbal N, Zubair M (2016) Risk assessment, cross-resistance potential, and biochemical mechanism of resistance to emamectin benzoate in a field strain of house fly (*Musca domestica* Linnaeus). *Chemosphere* 151:133–137. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.077>

- Arora S, Balotra S, Pandey G, Kumar A (2017) Binary combinations of organophosphorus and synthetic pyrethroids are more potent acetylcholinesterase inhibitors than organophosphorus and carbamate mixtures: an in vitro assessment. *Toxicol Lett* 268:8–16. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.12.009>
- Aurade RM, Jayalakshmi SK, Sreeramulu K (2010) P-glycoprotein ATPase from the resistant pest, *Helicoverpa armigera*: purification, characterization and effect of various insecticides on its transport function *Biochim Biophys Acta* 1798:1135–1143. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.02.019>
- Bahrndorff S, Gill C, Lowenberger C, Skovgård H et al (2014). The effects of temperature and innate immunity on transmission of *Campylobacter jejuni* (Campylobacterales: Campylobacteraceae) between life stages of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol* 51(3): 670–677. <https://doi.org/10.1603/ME13220>
- Bell HA, Robinson KA, Weaver RJ (2010) First report of cyromazine resistance in a population of UK house fly (*Musca domestica*) associated with intensive livestock production. *Pest Manag Sci* 66(7): 693–695. <https://doi.org/10.1002/ps.1945>
- Biale H, Geden CJ, Chiel E (2017) Effects of pyriproxyfen on wild populations of the housefly, *Musca domestica*, and compatibility with its principal parasitoids. *Pest Manag Sci* 73(12):2456–2464. <https://doi.org/10.1002/ps.4638>
- Blunt R, McOrist S, McKillen J, McNair I et al (2011). House fly vector for porcine circovirus 2b on commercial pig farms. *Vet Microbiol* 149(3–4):452–455. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.11.019>
- Bong LG, Zairi J (2010) Temporal fluctuations of insecticides resistance in *Musca domestica* Linn (Diptera: Muscidae) in Malaysia. *Trop Biomed* 27(2):317–325.
- Bouamama L, Sorlozano A, Laglaoui A, Lebbadi M et al (2010) Antibiotic resistance patterns of bacterial strains isolated from *Periplaneta americana* and *Musca domestica* in Tangier, Morocco. *J Infect Dev Countries* 4(4):194–201. <https://doi.org/10.3855/jidc.336>
- Burgess ER, Geden CJ, Lohmeyer KH, King B.H. et al (2020) Toxicity of fluralaner, a companion animal insecticide, relative to industry-leading agricultural insecticides against resistant and susceptible strains of filth flies. *Sci Rep* 10:11166. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68121-z>
- Butler JF, Garcia-Maruniak A, Meek F, Maruniak JE (2010) Wild Florida house flies (*Musca domestica*) as carriers of pathogenic bacteria. *Florida Entomologist* 93:218–223. <https://doi.org/10.1653/024.093.0211>
- Cetin H, Erler F, Yanikoglu A (2009) Survey of insect growth regulator (IGR) resistance in house flies (*Musca domestica* L.) from southwestern Turkey. *J Vector Ecol* 34(2):329–337. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2009.00042.x>
- Chen YCD, Ahmad S, Amin K, Dahanukar A (2019) A subset of brain neurons controls regurgitation in adult *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 222:jeb210724. <https://doi.org/10.1242/jeb.210724>
- Darbro JM, Mullens BA (2004) Assessing insecticide resistance and aversion to methomyl-treated toxic baits in *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) populations in southern California. *Pest Manag Sci* 60(9):901–908. <https://doi.org/10.1002/ps.885>
- Davies MP, Anderson M, Hilton AC (2016) The housefly *Musca domestica* as a mechanical vector of *Clostridium difficile*. *J Hosp Infect* 94(3):263–267. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.08.023>
- Dong K (2007) Insect sodium channels and insecticide resistance. *Invert Neurosci* 7:17–30. doi.org/10.1007/s10158-006-0036-9
- Epis S, Porretta D, Mastrantonio V, Comandatore F, Sasser D et al. (2014) ABC transporters are involved in defense against permethrin insecticide in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *Parasites Vectors* 7:349. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-349>
- Feng X, Li M, Liu N (2018) Carboxylesterase genes in pyrethroid resistant house flies, *Musca domestica*. *Insect Biochem Mol Biol* 92:30–39. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.11.007>
- Feyereisen R. (2011) Insect CYP genes and P450 enzymes. In Gilbert LI (ed) *Insect Molecular Biology and Biochemistry*/Oxford: Academic Press. 236–317
- Freeman JC, Ross DH, Scott JG (2019) Insecticide resistance monitoring of house fly populations from the United States. *Pestic Biochem Physiol* 158:61–68. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.04.006>
- French AS, Sellier MJ, Agha MA, Guigue A, Chabaud M-A. et al. (2015) Dual mechanism for bitter avoidance in *Drosophila*. *J Neurosci* 35, 3990–4004. doi: 10.1523/jneurosci.1312-14.2015
- Gao JR, Kozaki T, Leichter CA, Rinkevich FD et al (2007) The A302S mutation in Rdl that confers resistance to cyclodienes and limited cross-resistance to fipronil is undetectable in field populations of house flies from the USA. *Pestic Biochem Physiol* 88(1):66–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.09.001>
- Gerry AC, Zhang D (2009) Behavioral resistance of house flies, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) to imidacloprid. *US Army Med Depart J* 54–59.
- Gill C, Bahrndorff S, Lowenberger C (2017) *Campylobacter jejuni* in *Musca domestica*: an examination of survival and transmission potential in light of the innate immune responses of the house flies. *Insect Sci* 24(4):584–598. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12353>
- Hubbard CB, Gerry AC (2020) Selection, reversion, and characterization of house fly (Diptera: Muscidae) behavioral resistance to the insecticide imidacloprid. *J Med Entomol* 57(6):1843–1851. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa105>
- Hubbard CB, Gerry AC (2021) Genetic evaluation and characterization of behavioral resistance to imidacloprid in the house fly. *Pestic Biochem Physiol* 171:104741. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104741>
- Intan A, Kustiati K, Silvi S, Sri Y et al (2015) Resistance of house flies, *Musca domestica* Linnaeus (Diptera: Muscidae) of four cities in Indonesia to permethrin and propoxur. *J Entomol Indones* 12(3):123–128.
- Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. No Time to Wait: Securing the Future from Drug-Resistant Infections Report to the Secretary-General of the United Nations. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/IACG2019/IACG_final_report_EN.pdf (06.04.2021).
- Iqbal W, Malik MF, Sarwar MK, Azam I, Iram N, Rashda A (2014). Role of housefly (*Musca domestica*, Diptera;

- Muscidae) as a disease vector; a review. *J Entomol Zool Studies* 2(2): 159–163.
- Issa R (2019). *Musca domestica* acts as transport vector hosts. *Bull Nat Res Centre* 43(1):1–5. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0111-0>
- Kaufman PE, Gerry AC, Rutz DA, Scott JG (2006) Monitoring susceptibility of house flies (*Musca domestica* L.) in the United States to imidacloprid. *J Agric Urban Entomol* 23(4):195–200.
- Kaufman PE, Nunez SC, Mann RS, Geden CJ et al (2010) Nicotinoid and pyrethroid insecticide resistance in house flies (Diptera: Muscidae) collected from Florida dairies. *Pest Manag Sci* 66(3):290–294. <https://doi.org/10.1002/ps.1872>
- Kavi LAK, Kaufman PE, Scott JG (2014) Genetics and mechanisms of imidacloprid resistance in house flies. *Pestic Biochem Physiol* 109:64–69. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.01.006>
- Khamesipour F, Lankarani KB, Honarvar B, Kwenti TE (2018) A systematic review of human pathogens carried by the housefly (*Musca domestica* L.). *BMC Public Health* 18(1):1049. <https://doi.org/10.1186/s12889-018-5934-3>
- Khan HAA, Abbas N, Shad SA, Afzal MBS (2014) Genetics and realized heritability of resistance to imidacloprid in a poultry population of house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) from Pakistan. *Pestic Biochem Physiol* 114:38–43. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.07.005>
- Khan HAA, Akram W (2014) The effect of temperature on the toxicity of insecticides against *Musca domestica* L.: implications for the effective management of diarrhea. *PLoS ONE* 9(4): e95636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095636>
- Khan HAA, Akram W Haider MS (2015) Genetics and mechanism of resistance to deltamethrin in the house fly, *Musca domestica* L., from Pakistan. *Ecotoxicology* 24:1213–1220. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1482-0>
- Khan HAA, Akram W, Iqbal J, Naeem-Ullah U (2015) Thiamethoxam resistance in the house fly, *Musca domestica* L.: current status, resistance selection, cross-resistance potential and possible biochemical mechanisms. *PLoS ONE* 10(5): e0125850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125850>
- Khan HAA, Akram W, Shad SA (2013a) Resistance to conventional insecticides in Pakistani populations of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae): a potential ectoparasite of dairy animals. *Ecotoxicology* 22(3):522–527. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1044-2>
- Khan HAA, Akram W, Shehzad K, Shaalan EAS (2011) First report of field evolved resistance to agrochemicals in dengue mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), from Pakistan. *Parasit Vectors* 4:146. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-146>
- Khan HAA, Shad SA, Akram W (2013b) Resistance to new chemical insecticides in the house fly, *Musca domestica* L., from dairies in Punjab, Pakistan. *Parasitol Res* 112(5):2049–2054. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3365-8>
- Kiriyama K, Nishiwaki H, Nakagawa Y, Nishimura K (2003) Insecticidal activity and nicotinic acetylcholine receptor binding of dinotefuran and its analogues in the housefly, *Musca domestica*. *Pest Manag Sci* 59, 1093–1100. <https://doi.org/10.1002/ps.734>
- Kristensen M, Jespersen JB (2003) Larvicide resistance in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) populations in Denmark and establishment of resistant laboratory strains. *J Econ Entomol* 96(4):1300–1306. <https://doi.org/10.1093/jee/96.4.1300>
- Kristensen M, Jespersen JB (2008) Susceptibility to thiamethoxam of *Musca domestica* from Danish livestock farms. *Pest Manag Sci* 64(2):126–132. <https://doi.org/10.1002/ps.1481>
- Kristensen M, Jespersen JB, Knorr M (2004) Cross-resistance potential of fipronil in *Musca domestica*. *Pest Manag Sci* 60(9):894–900. <https://doi.org/10.1002/ps.883>
- Kristensen M, Spencer AG, Jespersen JB (2001) The status and development of insecticide resistance in Danish populations of the housefly *Musca domestica* L. *Pest Manag Sci* 57(1):82–89. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200101\)57:1<82::AID-PS251>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200101)57:1<82::AID-PS251>3.0.CO;2-8)
- Labbe R, Caveney S, Donly C (2011) Genetic analysis of the xenobiotic resistance associated ABC gene subfamilies of the Lepidoptera. *Insect Mol Biol* 20:243–256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01064.x>
- Learmount J, Chapman P, MacNicoll A (2002) Impact of an insecticide resistance strategy for house fly (Diptera: Muscidae) control in intensive animal units in the United Kingdom. *J Econ Entomol* 95(6):1245–1250. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-95.6.1245>
- Li J, Wang Q, Zhang L, Gao X (2012) Characterization of imidacloprid resistance in the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pestic Biochem Physiol* 102(2):109–114. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2011.10.012>
- Li QF, Li X, Hunag JB, Zhang DM et al (2015) Efficacy of cyantraniliprole fly bait against housefly (*Musca domestica* L.) under laboratory conditions. *Parasitol Res* 114(9):3525–3528. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4584-y>
- Lilly DG, Latham SL, Webb CE, Doggett SL (2016) Cuticle thickening in a pyrethroid-resistant strain of the common bed bug, *Cimex lectularius* L. (Hemiptera: Cimicidae). *PLoS ONE* 11(4):e0153302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153302>
- Liu N, Pridgeon JW (2002) Metabolic detoxication and the kdr mutation in pyrethroid resistant house flies, *Musca domestica* (L.). *Pestic Biochem Physiol* 73(3):157–163. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(02\)00101-3](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(02)00101-3)
- Liu N, Yue X (2000) Insecticide resistance and crossresistance in the house fly (Diptera: Muscidae). *J Econ Entomol* 93:1269–1275. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.4.1269>
- Liu N, Zhu F (2011) House fly cytochrome P450s: their role in insecticide resistance and strategies in the isolation and characterization. In: Liu T, Kang L (eds) Recent Advances in Entomological Research. Berlin-Heidelberg: Springer. 246–257. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17815-3_14
- Luo L, Sun YJ, Wu YJ (2013) Abamectin resistance in *Drosophila* is related to increased expression of P-glycoprotein via the dEGFR and dAkt pathways. *Insect Biochem Mol Biol* 43:627–634. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2013.04.006>
- Ma Z, Li J, Zhang Y, Shan C et al (2017) Inheritance mode and mechanisms of resistance to imidacloprid in the house fly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) from China. *PLoS ONE* 12(12):e0189343. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189343>

- Malik A, Singh N, Satya S (2007) House fly (*Musca domestica*): a review of control strategies for a challenging pest. *J Environ Sci Health B* 42(4):453–469. <https://doi.org/10.1080/03601230701316481>
- Mamidala P, Wijeratne AJ, Wijeratne S *et al.* (2012) RNA-Seq and molecular docking reveal multi-level pesticide resistance in the bed bug. *BMC Genomics* 13:6. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-6>
- Markussen MDK, Kristensen M (2010) Cytochrome P450 monooxygenase-mediated neonicotinoid resistance in the house fly *Musca domestica* L. *Pestic Biochem Physiol* 98(1):50–58. <http://doi:10.1016/j.pestbp.2010.04.012>
- Markussen MDK, Kristensen M. (2012) Spinosad resistance in female *Musca domestica* L. from a field-derived population. *Pest Manag Sci* 68:75–82. <https://doi.org/10.1002/ps.2223>
- Matsuda K, Ihara M, Sattelle DB (2020) Neonicotinoid insecticides: molecular targets, resistance, and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 60:241–255. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010818-021747>
- Meisel RP, Scott JG (2018) Using genomic data to study insecticide resistance in the house fly, *Musca domestica*. *Pestic Biochem Physiol* 151:76–81. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.01.001>
- Memmi BK (2010) Mortality and knockdown effects of imidacloprid and methomyl in house fly (*Musca domestica* L., Diptera: Muscidae) populations. *J Vector Ecol* 35(1):144–148. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2010.00040.x>
- Morin S, Williamson MS, Goodson SJ, Brown JK, Tabashnik BE, Dennehy TJ (2002). Mutations in the *Bemisia tabaci* para sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochem Mol Biol* 32:1781–1791. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00137-6](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00137-6)
- Nakamura C, Yajima S, Miyamoto T, Sue M (2013). Structural analysis of an epsilon-class glutathione transferase from housefly, *Musca domestica*. *Biochem Biophys Res Comm* 430(4): 1206–1211. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.077>
- Naqqash MN, Gökçe A, Bakhsh A, Salim M (2016) Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitol Res* 115(4):1363–1373. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4898-9>
- Ong S-Q, Ahmad H, Jaal Z, Rus AC (2015) Comparative effectiveness of insecticides for use against the house fly (Diptera: Muscidae): determination of resistance levels on a Malaysian poultry farm. *J Econ Entomol* 109(1):352–359. <https://doi.org/10.1093/jee/tov326>
- Otake S, Dee SA, Moon RD, Rossow KD *et al.* (2004). Studies on the carriage and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by individual houseflies (*Musca domestica*). *Vet Rec* 154(3):80–85. <https://doi.org/10.1136/vr.154.3.80>
- Pan J, Yang C, Liu Y, Gao Q *et al.* (2018) Novel cytochrome P450 (CYP6D1) and voltage sensitive sodium channel (Vssc) alleles of the house fly (*Musca domestica*) and their roles in pyrethroid resistance. *Pest Manag Sci* 74(4):978–986. <https://doi.org/10.1002/ps.4798>
- Pereira LA, Ferreira VDSB, Leite NS, Souza SMO *et al.* (2019) Larvicidal and adulticidal effects and ultrastructural changes of larvae midgut epithelium of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) fed with *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 52:e20190135. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0135-2019>
- Pezzi M, Lanfredi M, Chicca M, Tedeschi P *et al.* (2011) Preliminary evaluation of insecticide resistance in a strain of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) from an intensive chicken farm of Northern Italy. *J Environ Sci Health* 46(6):480–485. <https://doi.org/10.1080/03601234.2011.583866>
- Phoku JZ, Barnard TG, Potgieter N, Dutton MF (2016) Fungal dissemination by housefly (*Musca domestica* L.) and contamination of food commodities in rural areas of South Africa. *Int J Food Microbiol* 217:177–181. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.028>
- Phoku JZ, Barnard TG, Potgieter N, Dutton MF (2017) Mycotoxigenic potentials of the genera: *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* isolated from houseflies (*Musca domestica* L.). *Acta Trop* 168:29–36. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.12.037>
- Pinto MC, do Prado AP (2001) Resistance of *Musca domestica* L. populations to cyromazine (insect growth regulator) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(5):729–732. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762001000500027>
- Pohl PC, Carvalho DD, Daffre S, Vaz IS, Masuda A (2014) In vitro establishment of ivermectin-resistant *Rhipicephalus microplus* cell line and the contribution of ABC transporters on the resistance mechanism. *Vet Parasitol* 204:316–322. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.042>
- Porretta D, Gargani M, Bellini R, Medici A, Punelli F, Urbanelli S (2008) Defence mechanisms against insecticides temephos and diflubenzuron in the mosquito *Aedes caspius*: the P-glycoprotein efflux pumps. *Med Vet Entomol* 22:48–54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00712.x>
- Rees DC, Johnson E, Lewinson O (2009) ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:218–227. <https://doi.org/10.1038/nrm2646>
- Saleem MA, Ahmad A, Ahmad M, Aslam M., Sayyed AH (2008) Resistance to selected organochlorine, organophosphate, carbamates and pyrethroid, in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. *J Econ Entomol* 101:1667–1675. <https://doi.org/10.1093/jee/101.5.1667>
- Sayyed AH, Pathan AK, Faheem U (2010) Cross-resistance, genetics and stability of resistance to deltamethrin in a population of *Chrysoperla carnea* from Multan, Pakistan. *Pestic Biochem Physiol* 98:325–332. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.07.004>
- Scott JG (2017) Evolution of resistance to pyrethroid insecticides in *Musca domestica*. *Pest Manag Sci* 73(4):716–722. <https://doi.org/10.1002/ps.4328>
- Scott JG, Leichter CA, Rinkevič FD, Harris SA *et al.* (2013) Insecticide resistance in house flies from the United States: resistance levels and frequency of pyrethroid resistance alleles. *Pestic Biochem Physiol* 107(3):377–384. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.10.006>
- Scott JG, Warren WC, Beukeboom LW, Bopp D, Clark AG *et al.* (2014) Genome of the house fly (*Musca domestica* L.), a global vector of diseases with adaptations to a septic environment. *Genome Biol* 15:466. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0466-3>
- Seifert J, Scott JG (2002) The CYP6D1v1 allele is associated with pyrethroid resistance in the house fly, *Musca*

- domestica*. *Pestic Biochem Physiol* 72(1):40–44. <https://doi.org/10.1006/pest.2001.2577>
- Shah RM, Abbas N, Shad SA, Sial AA (2015b) Selection, resistance risk assessment, and reversion toward susceptibility of pyriproxyfen in *Musca domestica* L. *Parasitol Res* 114(2):487–494. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4206-0>
- Shah RM, Abbas N, Shad SA, Varloud M (2015a) Inheritance mode, cross-resistance and realized heritability of pyriproxyfen resistance in a field strain of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Acta Trop* 142:149–155. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.11.016>
- Shah RM, Shad SA (2020) House fly resistance to chlorantraniliprole: cross resistance patterns, stability and associated fitness costs. *Pest Manag Sci* 76(5):1866–1873. <https://doi.org/10.1002/ps.5716>
- Shah RM, Shad SA, Abbas N (2017) Methoxyfenozide resistance of the housefly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae): cross-resistance patterns, stability and associated fitness costs. *Pest Manag Sci* 73(1):254–261. <https://doi.org/10.1002/ps.4296>
- Shi J, Zhang L, Gao X (2011) Characterisation of spinosad resistance in the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pest Manag Sci* 67(3):335–340. <https://doi.org/10.1002/ps.2073>
- Shono T, Zhang L, Scott JG (2004) Indoxacarb resistance in the house fly, *Musca domestica*. *Pestic Biochem Physiol* 80(2):106–112. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2004.06.004>
- Soderlund DM (2008) Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Manag Sci* 64(6):610–616. <https://doi.org/10.1002/ps.1574>
- Soderlund DM, Knipple DC (2003). The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33(6): 563–577. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00023-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00023-7)
- Sparks TC, Nauen R (2015) IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pestic Biochem Physiol* 121:122–128. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.11.014>
- Taskin V, Kence M (2004) The genetic basis of malathion resistance in housefly (*Musca domestica* L.) strains from Turkey. *Russian Journal of Genetics* 40:1215–1222.
- Tian L, Cao C, He L, Li M et al (2011). Autosomal interactions and mechanisms of pyrethroid resistance in house flies, *Musca domestica*. *Int J Biol Sci* 7(6): 902–911.
- Wada-Katsumata A, Silverman J, Schal C (2014) Sugar aversion: A newly-acquired adaptive change in gustatory receptor neurons in the German cockroach. *Comp Physiol Biochem* 31:220–230.
- Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, Kristensen M et al (2001) Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem J* 359(1):175–181. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3590175>
- Wang JN, Hou J, Wu YY, Guo S et al (2019) Resistance of house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), to five insecticides in Zhejiang province, China: the situation in 2017. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 4851914. <https://doi.org/10.1155/2019/4851914>
- WHO (1980) Resistance of vectors of disease to pesticides. Fifth report of the WHO Expert Committee in Vector Biology and Control. *WHO Tech Rep Ser* 655:1–82.
- Wood OR, Hanrahan S, Coetzee M, Koekmoer LL, Brooke BD (2010) Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasites Vectors* 3:67. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-67>
- Yoon KS, Kwon DH, Strycharz JP, Hollingsworth CS, Lee SH, Clark JM (2008) Biochemical and molecular analysis of deltamethrin resistance in the common bed bug (Hemiptera: Cimicidae). *J Med Entomol* 45:1092–1101. <https://doi.org/10.1093/jmedent/45.6.1092>
- You C, Shan C, Xin J, Li J et al (2020) Propoxur resistance associated with insensitivity of acetylcholinesterase (AChE) in the housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Sci Rep* 10:8400. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65242-3>
- Zhang J, Goyer C, Pelletier Y. (2008) Environmental stresses induce the expression of putative glycine-rich insect cuticular protein genes in adult *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Mol Biol* 17:209–216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2008.00796.x>
- Zhang J, Wang J, Chen L, Yassin AK et al (2017) Housefly (*Musca domestica*) and blow fly (*Protophormia terraenovae*) as vectors of bacteria carrying colistin resistance genes. *Appl Environ Microbiol* 84 (1): e01736-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01736-17>
- Zhang L, Shi J, Gao X (2008) Inheritance of beta-cypermethrin resistance in the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pest Manag Sci* 64(2):185–190. <https://doi.org/10.1002/ps.1510>
- Zhang Y, Li J, Ma Z, Shan C, Gao X (2018) Multiple mutations and overexpression of the MdaE7 carboxylesterase gene associated with male-linked malathion resistance in housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Sci Rep* 8:224. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17325-x>
- Zhu F, Wigginton J, Romero A, Moore A et al (2010) Widespread distribution of knockdown resistance mutations in the bed bug, *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae), populations in the United States. *Arch Insect Biochem Physiol* 73:245–257. <https://doi.org/10.1002/arch.20355>
- Zhu F, Gujar H, Gordon J, Haynes KF et al (2013) Bed bugs evolved unique adaptive strategy to resist pyrethroid insecticides. *Sci Rep* 3:1456. <https://doi.org/10.1038/srep01456>

Translation of Russian References

- Vavilova VV (1999) [Ecological and physiological parameters of housefly populations as an indicator of various levels of technogenic pollution]. *Abstr. PhD Thesis*. Moscow. 15 p. (In Russian)
- Levchenko MA (2020) [Evaluation of the effectiveness of fipronil and chlorfenapir against *Musca domestica* L. at the objects of veterinary supervision]. *Vestnik Krasnoyarskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta* 12:147–151 (In Russian)
- Levchenko MA, Silivanova YEA, Plashkina VA, Shumilova PA (2019) [Resistance of natural populations of *Musca*

- domestica* L. to modern insecticides]. *Problemy veterinarnoy sanitarii, gigiyeny i ekologii*. 4: 407–412. (In Russian)
- Levchenko MA, Silivanova YEA (2019) [Tactics of control against *Musca domestica* at the objects of veterinary and sanitary supervision]. *Teoriya i praktika borby s parazitarnymi boleznyami*. 20:308–312. (In Russian)
- Levchenko MA (2017) [Susceptibility of the natural population of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) to pyrethroid insecticides]. *Problemy veterinarnoy sanitarii, gigiyeny i ekologii* 4:71–75. (In Russian)
- Levchenko MA, Silivanova YeA, Balabanova GF, Bikinyayeva RKh (2018) [Method of controlling flies in the premises of veterinary and sanitary inspection and insecticidal composition for its implementation]. Invention patent RUS 2370035 (In Russian)
- Polyakova YuB (1995) [Biological indicators and insecticide resistance of houseflies from areas subject to different chemical pollution]. *PhD Thesis*. Moscow. 16 p. (In Russian)
- Polyakova YuB (1998) [Results of monitoring the susceptibility of houseflies to insecticides]. *RET-info*. No. 2:10–13. (In Russian)
- Roslavtseva SA Eremina OYu, Bakanova EI et al (1998) [Study of the mechanisms of insect resistance to insecticides (on the example of natural populations of houseflies *Musca domestica*). *Agrokimiya* 10:14–23. (In Russian)
- Roslavtseva SA (2006) [Resistance to insectoacaricides of arthropods of epidemiological and sanitary-hygienic importance]. Moscow: Kompaniya Sputnik+, 130 p. (In Russian)
- Silivanova EA, Shumilova PA, Levchenko MA (2020) [Susceptibility to insecticides and activity of detoxification enzymes in *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) natural population]. *Vestnik Krasnoyarskogo Gosudarstvennogo Agrarnogo Universiteta* 12:102–109 (In Russian)
- Sokolyanskaya MP, Amirkhanov DV (2006) [Ways to overcome insect resistance to insecticides]. *Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* 2:7–12 (In Russian)

Plant Protection News, 2021, 104(2), p. 72–86

OECD+WoS: 1.06+IY (Entomology)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2021-104-2-14984>

Full-text review

SANITARY AND EPIDEMIOLOGICAL SIGNIFICANCE AND RESISTANCE TO INSECTICIDES IN THE HOUSEFLY *MUSCA DOMESTICA*

T.A. Davlianidze*, O.Yu. Eremina

Scientific Research Institute of Disinfectology, Moscow, Russia

*corresponding author; e-mail: tdavlik@bk.ru

Insect resistance to insecticides has been and remains a serious problem affecting insect control worldwide. Suppression of the housefly *Musca domestica* is important because of its ability to carry agents of dangerous infectious diseases of humans and animals. However, many of the formulations that have been shown to be effective against them cease to work after just a few years of application. The intensive use of chemical control means in world practice has led to the development of natural populations of the housefly that are resistant to all groups of insecticides intended to control it. The species is one of the top ten insect species that have developed resistance to the maximal number of active substances. This review summarizes and analyzes data published by foreign and Russian authors on the insecticide resistance of the housefly over the past 20 years. Information concerning the resistance of the pest to both traditional insecticides and new chemicals is presented. The main mechanisms of insect resistance and the factors responsible for its development are described. Schemes of rotation of insecticides for controlling larval and adult stages of the fly are given.

Keywords: resistance, mode of action, overcoming resistance, insecticide rotation

Submitted: 12.04.2021

Accepted: 15.06.2021

ПОДБОР ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ШТАММОВ *XANTHOMONAS ARBORICOLA*, ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЗЛАКОВЫХ И КАПУСТНЫХ КУЛЬТУР

Е.И. Кырова^{1*}, А.Н. Игнатов²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

²Российский университет дружбы народов, Москва

* ответственный за переписку, e-mail: ekirova1911@yandex.ru

Группа бактерий рода *Xanthomonas*, вирулентных для пшеницы, ржи, ячменя, томата, подсолнечника и капустных культур, была выделена в России в 2001–2008 гг. Анализ физиологических признаков и мультилокусное секвенирование показали принадлежность бактерий к виду *Xanthomonas arboricola*. Сравнение генома, представительного для данной группы штамма 3004, выделенного из ячменя, но также вирулентного для подсолнечника, китайской капусты и грецкого ореха, продемонстрировало отсутствие следов транспортной системы третьего типа ТЗСС и горизонтальный перенос ряда других генов вирулентности из отдаленно-родственных видов. Было предложено использовать гены транспортной системы четвертого типа Т4СС в качестве мишени для группоспецифического анализа этих патогенных штаммов. После проведения проверки, на основе фрагмента гена *virD4*, были разработаны праймерная пара и зонд для детекции в режиме ПЦР в реальном времени. Продукты амплификации были получены для всех штаммов *Xanthomonas arboricola* и не обнаружены у бактерий других видов ксантомонад и эпифитных бактерий, присутствующих на растениях-хозяевах. Разработанный диагностикум позволяет определять целевую группу *Xanthomonas arboricola* на пораженных растениях при прямом ПЦР или после периода роста на селективной питательной среде (био-ПЦР), и имеет чувствительность выше, чем у традиционного метода выделения бактерий на селективной питательной среде.

Ключевые слова: геномный анализ, гены вирулентности, подсолнечник, ПЦР в реальном времени, семенная инфекция

Поступила в редакцию: 10.03.2021

Принята к печати: 30.05.2021

Введение

Россия находится на третьем месте в мире по производству зерновых злаков (сем. *Poaceae*) и капустных культур (сем. *Brassicaceae*). Только в 2019 году было собрано 99.4 млн тонн зерновых, а также 363.4 тыс. тонн капустных культур (FAO, 2020). Несмотря на высокие валовые показатели, наблюдается потеря значительной части урожая от заболеваний различной этиологии в период вегетации и хранения. В последние годы отмечается увеличение вредоносности бактериальных болезней (Евсеев, Каракозов, 2021; Лазарев и др., 2017).

Бактериозами злаков, вызываемыми комплексом бактерий рода *Xanthomonas*, заражено до 50% площадей зерновых злаков в мире. При ранней эпифитотии потери урожая восприимчивых сортов могут достигать 40% (Кугова, Игнатов, 2019). Сосудистый бактериоз капустных, вызываемый *X. campestris*, широко распространен во всем мире, включая Россию. Известны случаи, когда раннее заражение капустных культур от инфицированных семян вызвало потери 90% потенциального урожая (Williams, 1980).

Начиная с 2000-х годов на территории РФ описано заражение растений обособленной группой штаммов *X. arboricola* (Игнатов и др., 2009; Игнатов и др., 2010). В рамках данного вида известны несколько специализированных и очень вредоносных патовариантов (патоваров): *X. arboricola* pv. *arracaciae*, *X. arboricola* pv. *celebensis*, *X. arboricola* pv. *corylina*, *X. arboricola* pv. *fragariae*,

X. arboricola pv. *guizotiae*, *X. arboricola* pv. *juglandis*, *X. arboricola* pv. *poinsetticola*, *X. arboricola* pv. *populi*, *X. arboricola* pv. *pruni* и *X. arboricola* pv. *zantedeschiae* (Vauterin et al., 1995; Fischer-Le Saux et al., 2015).

Атипичные штаммы *X. arboricola*, не принадлежащие к ранее известным патоварам, способны поражать широкий круг культур: злаки, томаты, подсолнечник, рапс и капусту, в добавление к традиционным растениям-хозяевам этого вида (грецкий орех, фундук, косточковые плодовые, земляника, бананы, тополь и др.) (Игнатов и др., 2010). Факторы, обуславливающие широкий круг поражаемых растений у некоторых групп штаммов до сих пор неизвестны. Об оценке реакции к *X. arboricola* среди различных сортов растений-хозяев в научной литературе не сообщается. Нет также сведений и об эффективных средствах химического и биологического контроля возбудителя.

Единственным эффективным методом снижения вредоносности патогена является своевременное выявление и выбраковка зараженного семенного и посадочного материала. Для выявления фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas* методом ПЦР были предложены в качестве мишеней различные гены, как участвующие в патогенезе и принадлежащие системе секреции III типа (ТЗСС), так и гены «домашнего хозяйства», например β-субъединицы ДНК-гиразы (*gyrB*) (Leite et al., 1994; Пунина, 2009; Егорова, 2014; Hasan et al., 2018).

Как показали предварительные исследования, широко используемые гены-мишени нельзя применять для ПЦР-детекции атипичных штаммов *X. arboricola*. В первую очередь это связано с отсутствием генов T3SS у данной группы (Ignatov et al., 2015; Мокрякова и др., 2010). Вторым ограничивающим фактором является недостаточное разнообразие и давление отбора на ген *gyrB* в эволюции ксантомонад (Кырова, 2014), что может привести к появлению ложных результатов при определении зараженности посевного материала. In silico ПЦР с праймерами, разработанными Егоровой и коллегами показал, что тест-система на основе гена *gyrB* позволяет выявить лишь 46% атипичных штаммов из исследуемой нами коллекции (s1, s2, s3, s4, Br1363, Br1364, Br1365, Br1366, ya3028, ya1265, ya3004, Bo1392, Bo1393, Bo1395).

Анализ генома штамма 3004, представляющего атипичную группу *X. arboricola* (Ignatov et al., 2015) позволил

выявить гены-мишени для детекции таких штаммов. Мы рассмотрели перспективную группу генов-мишеней, принадлежащих к системе секреции IV типа. Гены систем секреции достаточно консервативны, так как участвуют в процессах патогенеза. С другой стороны, они достаточно изменчивы в связи с их ролью во взаимодействии патоген-хозяин. Исходя из этого, можно сказать, что гены группы транспортных систем обладают достаточным уровнем полиморфизма для идентификации на различных уровнях – от вида до штамма. Специфичные ПЦР-праймеры на гены T4SS для фитопатогенных бактерий рода *Agrobacterium* (Haas et al, 1995; Vini et al, 2008) давно рекомендовали себя в качестве практического метода обнаружения и идентификации целевых патогенов. В данной работе мы описываем разработку протокола диагностики атипичных штаммов на основе гена *virD4*.

Материалы и методы

В работе была использована коллекция из 30 атипичных штаммов *X. arboricola*, собранных Игнатовым А.Н. (РУДН) и Пехтерева Э.Ш. (ГНУ-ВНИИ фитопатологии),

а также типовой штамм *X. arboricola* pv. *juglandis* ICMP 35 (табл. 1). В качестве контролей использовали ранее изученные штаммы видов *X. campestris*, *X. vesicatoria*, *X. oryzae*,

Таблица 1. Список штаммов, использованных в работе
Table 1. The list of strains used in the present study

Вид Species	Штамм Strain	Растение-хозяин Host Plant
Целевые штаммы Target strains		
<i>Xanthomonas arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	ICMP 35	<i>Juglandis regia</i>
	s1	<i>Helianthus annuus</i>
	s2	
	s3	
	s4	
	Bo1392	<i>Brassica oleracea</i>
	Bo1393	
	Bo1395	
	Br1343	<i>Brassica napus</i>
	Br1344	
	Br1346	
	Br1347	
	Br1348	
	Br1349	
	Br1350	
	Br1351	
	Br1352	
	Br1353	
	Br1354	
Br1355		
Br1356		
Br1357		
Br1363		
Br1364		
Br1365		
Br1366		
ya1265	<i>Hordeum vulgare</i>	
ya3004		
ya3028		
To1577	<i>Solanum lycopersicum</i>	
To417		

Вид Species	Штамм Strain	Растение-хозяин Host Plant
Прочие фитопатогенные бактерии Other phytopathogenic bacteria		
<i>X. vesicatoria</i>	2360	<i>Solanum lycopersicum</i>
<i>X. axonopodis</i>	HRI924a	<i>Phaseoli vulgaris</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	NCPBB 528T	<i>Brassica oleracea</i>
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	NCPBB 3002	<i>Oryza sativa</i>
<i>X. hortorum</i>	NCPBB 939	<i>Hedera helix</i>
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	H2	<i>Daucus carota</i>
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	PB70	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1845	<i>Helianthus annuus</i>
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	1209	<i>Solanum lycopersicum</i>
Эпифитные и ризосферные бактерии Epiphyte and rhizosphere bacteria		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ko430	<i>Triticum aestivum</i>
<i>Bacillus cereus</i>	Bc462, Bc475	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Sm213, Sm488, Sm1550	<i>Solanum tuberosum</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	Ec467, Ec216	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	B525	-
<i>Serratia plymuthica</i>	Sp490	-
<i>Advenella mimigardefordensis</i>	A517	-
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	E451	-
<i>Serratia proteomaculans</i>	Spr401	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	Pa1239	-
<i>Pantoea vagans</i>	Pv1392	-

X. hortorum, *X. axonopodis* и штаммы других фитопатогенных бактерий (*Pseudomonas* spp., *Clavibacter* spp., *Dickeya* spp., *Pectobacterium* spp.), а также непатогенные эпифитные и ризосферные бактерии из коллекций РУДН, ВИЗР и РГАУ-МСХА – всего 24 штамма нецелевых видов.

Видовая принадлежность всех штаммов была определена секвенированием фрагментов гена *16S rRNA*, а для ксантомонад, дополнительно, мультилокусным секвенированием фрагментов 4 генов, входящих в стандартную схему мультилокусного генотипирования (Young et al., 2008). Все штаммы хранились в замороженном виде при -80°C и использовались для экспериментов после обязательной проверки чистоты и соответствия оригинальной культуре по морфологическим и основным физиологическим признакам рода *Xanthomonas* и вида *X. arboricola*.

Для выделения ДНК бактерии культивировали на питательной среде YDC (глюкоза – 10 г; дрожжевой экстракт – 10 г; CaCO_3 – 20 г; агар – 18 г; дистиллированная вода до 1 литра) при 28°C в течение 24–48 ч (Schaad et al., 2001).

ДНК выделяли из одной петли 48 ч бактериальной культуры или 100 мкл бактериальной суспензии в диапазоне концентраций от 2×10^8 до 2×10^{-1} КОЕ/мл с помощью набора «Фитосорб», кат. № РН-520 (ООО «Синтол», Москва) согласно рекомендациям производителя.

Для подбора гена-мишени использовались геномные последовательности *X. arboricola* штамма (шт.) 3004 (GenBank accession no. GCA_000585435), *X. arboricola* pv. *juglandis* шт. 417 (CP012251.1), *X. arboricola* шт. 17 (CP011256.1), *X. arboricola* pv. *pruni* шт. 15-088 (CP044334.1), *X. campestris* pv. *campestris* шт. ATCC 33913T (AE008922.1), *X. oryzae* pv. *oryzae* шт. ICMP3125 (CP031697.1), *X. vesicatoria* шт. ATCC 35937 (CP018725.1), *X. citri* pv. *citri* шт. 306 (AE008923.1), *X. hortorum* шт. B07-007 (CP016878.1), *X. fragariae* шт. PD885 (LT853882.1), *X. campestris* pv. *vesicatoria* шт. 85-10 (AM039952.1), *X. translucens* pv. *undulosa* шт. ICMP11055 (CP009750.1).

Выравнивание геномов осуществлялось с помощью алгоритма Blast Atlas на сервере GView (<https://server.gview.ca/>) и программного обеспечения Mauve 2.4.0, алгоритма progressiveMauve (Darling et al., 2010). Параметры были выставлены по умолчанию. Выравнивание алгоритмом progressiveMauve выполнялось в двух вариантах. Первый вариант проводился с использованием последовательностей геномов *X. arboricola* для выявления варибельных участков и уникальных последовательностей

– потенциальных генов-мишеней. Вторым вариантом представлял собой межвидовое сравнение для оценки специфичности выбранных регионов.

Число полиморфных позиций, филогенетически информативных позиций и коэффициент консервативности последовательностей рассчитывали в программе DnaSP6 (Rozas et al., 2017).

Праймеры для амплификации фрагментов генов *virB3*, *virB4* и *virB9*, а также праймеры и зонд для амплификации целевого фрагмента гена *virD4* были подобраны к варибельным участкам соответствующих генов с помощью алгоритма Primer BLAST, основанного на Primer 3 (Ye et al., 2012). Последовательности праймеров для гена *virD4*: *virD4_xa_f* (5'-CCG GAC ATC TTG ATC TTG GTT GCG T-3'), *virD4_xa_r* (3'-CTG ACG CTT CTG TTG TTG CGG CT-5') и *virD4_xa_z* (ROX –CAG CGC CTT GAC GTA GCG GTA G -BHQ2) были отобраны по результатам предварительных ПЦР - амплификаций классическим методом, с верификацией продуктов ПЦР - электрофорезом в агарозном геле и секвенированием фрагментов ожидаемой длины (данные не показаны). Длина продукта амплификации фрагмента гена *virD4* с праймерами *virD4_xa_f*/*virD4_xa_r* составляла 121 н.п.

Для постановки реакции была использована «2.5x реакционная смесь для проведения ПЦР-РВ» (кат. № М-428 Синтол, Москва). Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Для подбора наилучшего состава смеси проводили оптимизацию по концентрации MgCl_2 , прямого, обратного праймеров и флуоресцентного зонда. Концентрация остальных компонентов реакционной соответствовала рекомендациям производителя набора.

ПЦР-реакцию проводили на амплификаторе Real-time CFX96 Touch (BIO-RAD) с использованием предварительно оптимизированного температурно-временного профиля: 95°C – 5 мин, и последующие 35 циклов с профилем 95°C – 15 сек, 70°C – 40 сек.

Для определения чувствительности тест-системы готовили разведение суспензии бактериальных клеток в концентрации от 2×10^8 до 2×10^{-1} КОЕ/мл для последующего выделения ДНК и постановки реакции. Концентрацию бактерий проверяли методом высева 10-кратных стандартных разведений на чашки Петри с агаризованной средой YDC, и подсчетом числа колоний через 4 дня инкубации при 28°C .

Результаты

Проведенное нами для поиска гена-мишени множественное выравнивание геномов бактерий вида *X. arboricola* показало достаточно высокую синтению и степень сходства последовательностей для большей части генов. Варибельные участки, преимущественно, приходятся на обрывки контигов, гены метаболизма, межгенные регионы и гены T3SS и T4SS. Было отмечено наличие ряда уникальных последовательностей штамма *X. arboricola* 3004. К ним относились гены секретируемых белков, транспозаз, нуклеаз, протеаз, профаговые последовательности, гены, кодирующие белки VirE, FimV, RhsD, и большое число консервативных гипотетических пептидов. Было также подтверждено отсутствие у шт. 3004 кластера генов T3SS (рис. 1, 2), что делает невозможным их

использование для детекции штаммов, поражающих злаковые и капустные культуры на территории РФ.

На этапе проверки специфичности найденных уникальных по сравнению с другими геномами *X. arboricola* последовательностей шт. 3004, нами была отмечена высокая гомология данных участков хотя бы с одним из геномов других видов ксантомонад, в частности с видами *X. campestris* и *X. hortorum*, гомология соответствующих фрагментов генома штамма 3004 достигала 96%, а с *X. citri* – 99%. Данный факт может указывать на т.н. «мозаичность» генома в пределах рода *Xanthomonas* (Merda et al. 2017), которая накладывает серьезные ограничения на разрабатываемые тест-системы, т.к. ввиду высокой схожести последовательности потенциальных

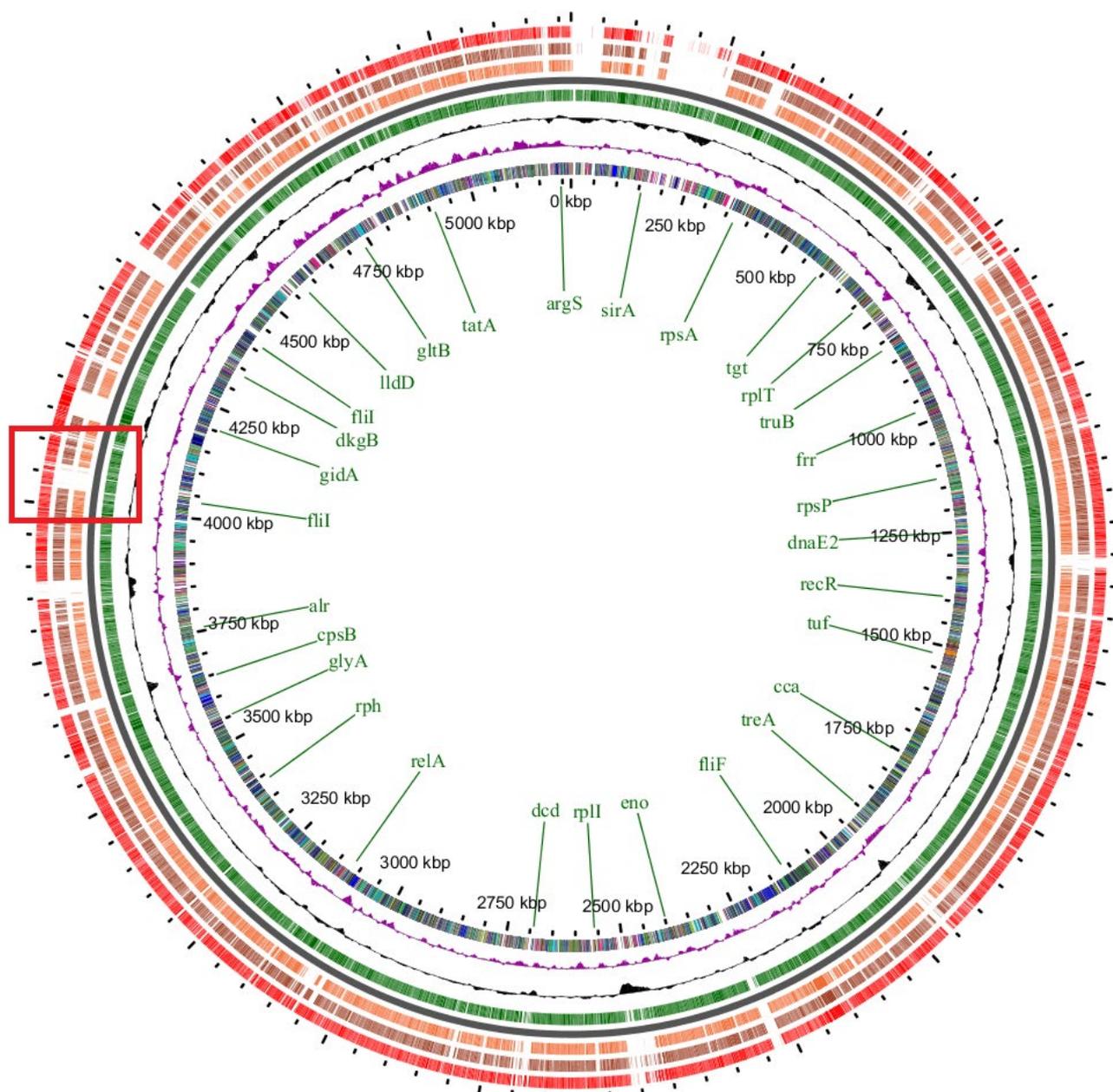


Рисунок 1. Анализ методом BLAST геномов штаммов *Xanthomonas arboricola*. Расположение геномов от центра к периферии в порядке: *X. arboricola* pv. *juglandis* str. 417, *X. arboricola* 3004, *X. arboricola* 17, *X. arboricola* pv. *pruni* str. 15-088. Прямоугольником выделена область кластера генов Т3SS. Кластер генов отсутствует у штаммов *X. arboricola* 17 и *X. arboricola* 3004

Figure 1. BLAST analysis of the genomes of *Xanthomonas arboricola* strains. Genomes are arranged from the center to the periphery in the following order: *X. arboricola* pv. *juglandis* str. 417, *X. arboricola* 3004, *X. arboricola* 17, *X. arboricola* pv. *pruni* str. 15-088. The T3SS gene cluster region is highlighted with a rectangle. The gene cluster is absent in *X. arboricola* 17 and *X. arboricola* 3004 strains

уникальных диагностических фрагментов с последовательностями родственных видов велика вероятность ложных результатов.

Среди найденных переменных участков выделяется по своей функциональной полноте кластер генов T4SS, расположенный на участке 547534–558304 н.п. генома шт. 3004 (рис. 2). Кластер генов T4SS консервативен по строению у различных видов ксантомад (Cesbron et al., 2015). Данные гены описаны в литературе и детально изучены у многих видов бактерий (Juhás et al., 2008). Система T4SS штамма 3004 содержит 10 *vir* генов и 15 генов, отвечающих за сборку пили для секреции *vir* белков. Каждый из генов обладает показателями изменчивости достаточными

для достижения необходимых уровней таксономического разрешения от вида до штамма (табл. 2), за исключением генов *virB6* и *virB5*, являющихся многокопийными.

На основании предварительной оценки ряда праймеров для амплификации генов *virD4*, *virB3*, *virB4*, и *virB9*, были отобраны праймеры для гена *virD4*, отличавшиеся высокой специфичностью и эффективностью ПЦР. В предыдущих исследованиях мы выявили разнородность штаммов *X. arboricola* выделенных как из одной культуры, так и из разных растений-хозяев. Высоко изменчивые гены не подходили для детекции генетически разнородной группы штаммов. При выравнивании последовательностей гена *virD4* у атипичных штаммов с последовательностями

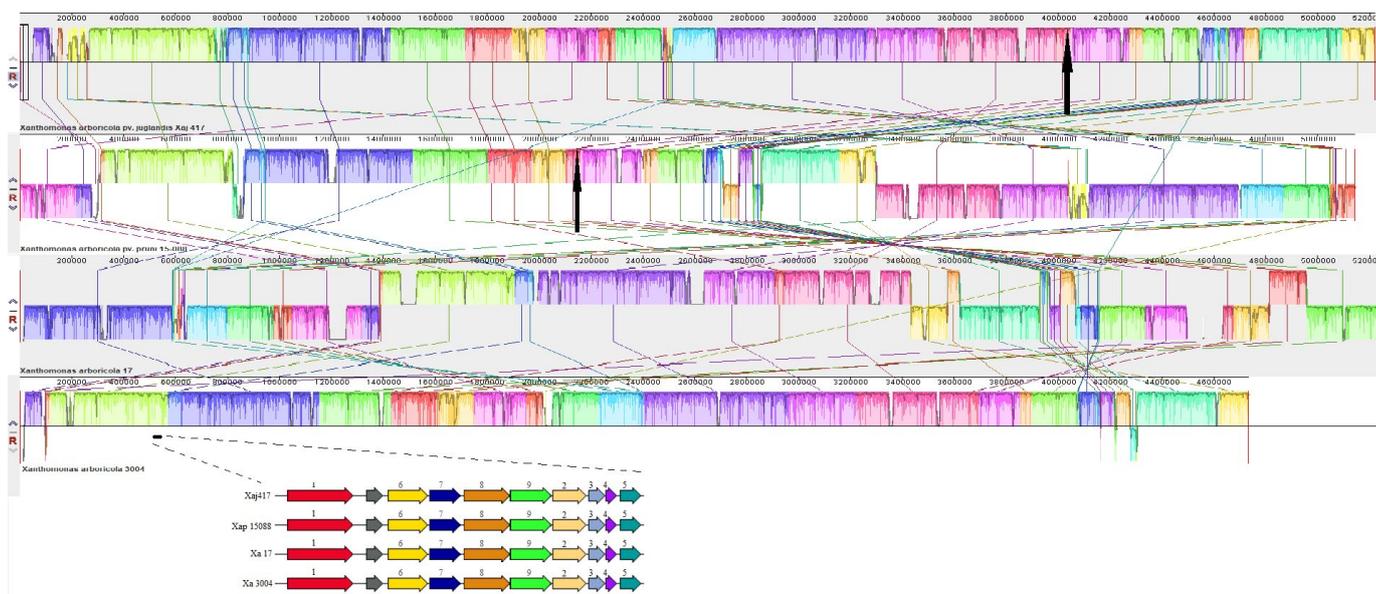


Рисунок 2. Полногеммное выравнивание геномов штаммов *Xanthomonas arboricola*, доступных в базах данных и *X. arboricola* шт. 3004. Кластер генов T4SS расположен на участке 556631–4186000 н.п. Структура кластера T4SS консервативна, гены обозначены цифрами: 1-*virD4*, 2-*virB1*, 3-*virB2*, 4-*virB3*, 5-*virB4*, 6-*virB8*, 7-*virB9*, 8-*virB10*, 9-*virB10*. Гены *virB5* и *virB6* находятся за пределами кластера и многокопийны. Местоположение кластера генов T3SS показано стрелками. У штаммов *X. arboricola* шт. 17 и *X. arboricola* шт. 3004 кластер T3SS не найден

Figure 2. Comprehensive genome alignment of *Xanthomonas arboricola* strains available in the databases and *X. arboricola* str. 3004. T4SS gene cluster is located at 556631 to 4186000 bp. The structure of the T4SS cluster is conserved; genes are numbered as follows: 1-*virD4*, 2-*virB1*, 3-*virB2*, 4-*virB3*, 5-*virB4*, 6-*virB8*, 7-*virB9*, 8-*virB10*, 9-*virB10*. *VirB5* and *virB6* genes are located outside the cluster and are multicopy. Location of the T3SS gene cluster is shown with arrows. T3SS genes were not found in *X. arboricola* str. 17 and *X. arboricola* str. 3004.

Таблица 2. Полиморфизм нуклеотидных последовательностей генов T4SS *Xanthomonas arboricola* и других представителей семейства Xanthomonadaceae

Показатель	Полиморфизм генов <i>vir</i> на уровне вида/рода								
	<i>virD4</i>	<i>virB1</i>	<i>virB2</i>	<i>virB3</i>	<i>virB4</i>	<i>virB8</i>	<i>virB9</i>	<i>virB10</i>	<i>virB11</i>
Число полиморфных позиций	145/518	369/347	139/262	89/104	645/930	196/554	213/419	322/518	282/722
Число филогенетически информативных позиций	90/496	239/484	103/126	57/91	257/868	73/451	61/248	21/490	111/661
Коэффициент консервативности последовательностей	0.913/ 0.676	0.560/ 0.422	0.422/ 0.321	0.603/ 0.574	0.735/ 0.613	0.727/ 0.165	0.704/ 0.453	0.711/ 0.455	0.728/ 0.276

Table 2. Polymorphism of the nucleotide sequences of T4SS genes in *Xanthomonas arboricola* and other members of the Xanthomonadaceae family

Indicator	Polymorphism of the <i>vir</i> genes at the species/genus level								
	<i>virD4</i>	<i>virB1</i>	<i>virB2</i>	<i>virB3</i>	<i>virB4</i>	<i>virB8</i>	<i>virB9</i>	<i>virB10</i>	<i>virB11</i>
Number of polymorphic sites	145/518	369/347	139/262	89/104	645/930	196/554	213/419	322/518	282/722
Number of phylogenetically informative sites	90/496	239/484	103/126	57/91	257/868	73/451	61/248	21/490	111/661
Sequence conservation coefficient	0.913/ 0.676	0.560/ 0.422	0.422/ 0.321	0.603/ 0.574	0.735/ 0.613	0.727/ 0.165	0.704/ 0.453	0.711/ 0.455	0.728/ 0.276

Xanthomonas spp., найденными в Генбанке, было отмечено, что этот ген сочетает в себе достаточную консервативность внутри вида и вариабельность между разными видами бактерий. Высокая внутривидовая консервативность, по-видимому, связана с его биологической функцией в патогенезе. Мутации в данном гене могут привести к полной потере функциональности T4SS (Souza et al., 2015). Данная особенность является достоинством при разработке

системы детекции видов с высокой частотой генетической изменчивости. Из-за своей предполагаемой роли в патогенезе, данный ген с меньшей долей вероятности будет вовлечён в эволюционные процессы.

После подбора последовательностей праймера и зонда нами были оптимизированы такие параметры для постановки реакции как температура отжига, концентрация праймеров и зонда, концентрация MgCl₂.

Подбор температуры отжига праймеров осуществляли с помощью градиента температур от 60 °С до 70 °С с шагом в 2 °С. Несмотря на более низкое значение порогового цикла Cq при температурах отжига от 60 °С до 68 °С включительно, при проведении анализа регистрировалось образование неспецифических продуктов амплификации.

Подбор оптимальной концентрации праймеров и зонда осуществляли в диапазоне от 9 до 4 pmol для каждого из компонентов. Экспериментально установлено следующее оптимальное соотношение концентраций: 9 pmol зонда и 7 pmol каждого праймера.

Количество MgCl₂ определялось в диапазоне от 0.5 µl до 1.5 µl с шагом в 0.25. Оптимальное количество было определено нами как 1 µl 25 mM раствора на 25мкл реакционной смеси. Несмотря на то, что наименьшее Ct регистрировалось при добавлении в реакционную смесь 0.5 µl MgCl₂, кривые имели не типичную, линейную форму (кривая-выброс). Такие результаты не могут быть учтены. При добавлении в реакционную смесь MgCl₂ более 1 µl наблюдалось ингибирование реакции после 6–8 циклов, следующих за пересечением пороговой линии.

Таким образом реакционная смесь имела следующий состав на конечный объем 25 µl: 10мкл 2.5x реакционного буфера, по 7 pmol каждого праймера, 9 pmol зонда, 1 µl 25 mM раствора MgCl₂.

Для оценки специфичности реакции были использованы виды бактерий, приведенные в таблице 4. Система отличается высокой специфичностью и не выявляет другие виды *Xanthomonas*, а также бактерии других родов (табл. 4, рис. 3).

Полученные результаты демонстрируют, что чувствительность разработанной системы-детекции потенциально может достигать 20 КОЕ/мл (табл. 5)

Следует отметить, что при 10-кратном повторении эксперимента по оценке чувствительности, в 2-х из 10-и повторений отмечалась нестабильность реакции, проявившаяся в отсутствии детекции при концентрации 2×10¹ КОЕ/мл. Таким образом, чувствительность можно оценить как 2×10² КОЕ/мл. В качестве одного из путей повышения чувствительности реакции возможно использование БИО-PCR анализа.

Таблица 4. Оценка специфичности разработанной тест-системы на основе гена *virD4* of *Xanthomonas arboricola*
Table 4. Assessment of specificity of the test system based on *virD4* gene in *Xanthomonas arboricola*

Вид Species	Число штаммов Number of Strains	Среднее значение порогового цикла Cq Mean quantitation cycle Cq
Фитопатогенные виды Phytopathogenic species		
<i>X. arboricola</i>	31	20.7
<i>X. campestris</i>	1	N/A
<i>X. vesicatoria</i>	1	N/A
<i>X. oryzae</i>	1	N/A
<i>X. hortorum</i>	1	N/A
<i>X. axonopodis</i>	1	N/A
<i>C. michiganensis</i> sbsp. <i>sepedonicus</i> .	1	N/A
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	1	N/A
<i>Dickeya chrysanthemi</i>	1	N/A
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>	1	N/A
Эрпифитные и ризосферные виды Epiphyte and rhizosphere species		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	N/A
<i>Bacillus cereus</i>	2	N/A
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	3	N/A
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	N/A
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	1	N/A
<i>Serratia plymuthica</i>	1	N/A
<i>Advenella mimigardefordensis</i>	1	N/A
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1	N/A
<i>Serratia proteomaculans</i>	1	N/A
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	N/A
<i>Pantoea vagans</i>	1	N/A

N/A – пороговый уровень не перейден до 35 цикла реакции.

N/A – threshold level is not reached before 35th reaction cycle.

Таблица 5. Оценка чувствительности и воспроизводимости разработанной тест-системы для детекции *Xanthomonas arboricola*

Концентрация суспензии клеток патогена	2×10 ⁸	2×10 ⁷	2×10 ⁶	2×10 ⁵	2×10 ⁴	2×10 ³	2×10 ²	2×10 ¹	2×10 ⁰	2×10 ⁻¹
Среднее значение порогового цикла Cq	15.20	16.77	17.56	23.29	26.04	27.37	28.89	31.78	N/A	N/A
Стандартное отклонение	1.24	0.2	0.33	0.49	0.5	0.41	0.63	13.44	N/A	N/A

Table 5. Sensitivity and repeatability of the developed test system for *Xanthomonas arboricola* detection

Concentration of the cell suspension of the pathogen	2×10 ⁸	2×10 ⁷	2×10 ⁶	2×10 ⁵	2×10 ⁴	2×10 ³	2×10 ²	2×10 ¹	2×10 ⁰	2×10 ⁻¹
Mean quantitation cycle Cq	15.20	16.77	17.56	23.29	26.04	27.37	28.89	31.78	N/A	N/A
Standard deviation	1.24	0.2	0.33	0.49	0.5	0.41	0.63	13.44	N/A	N/A

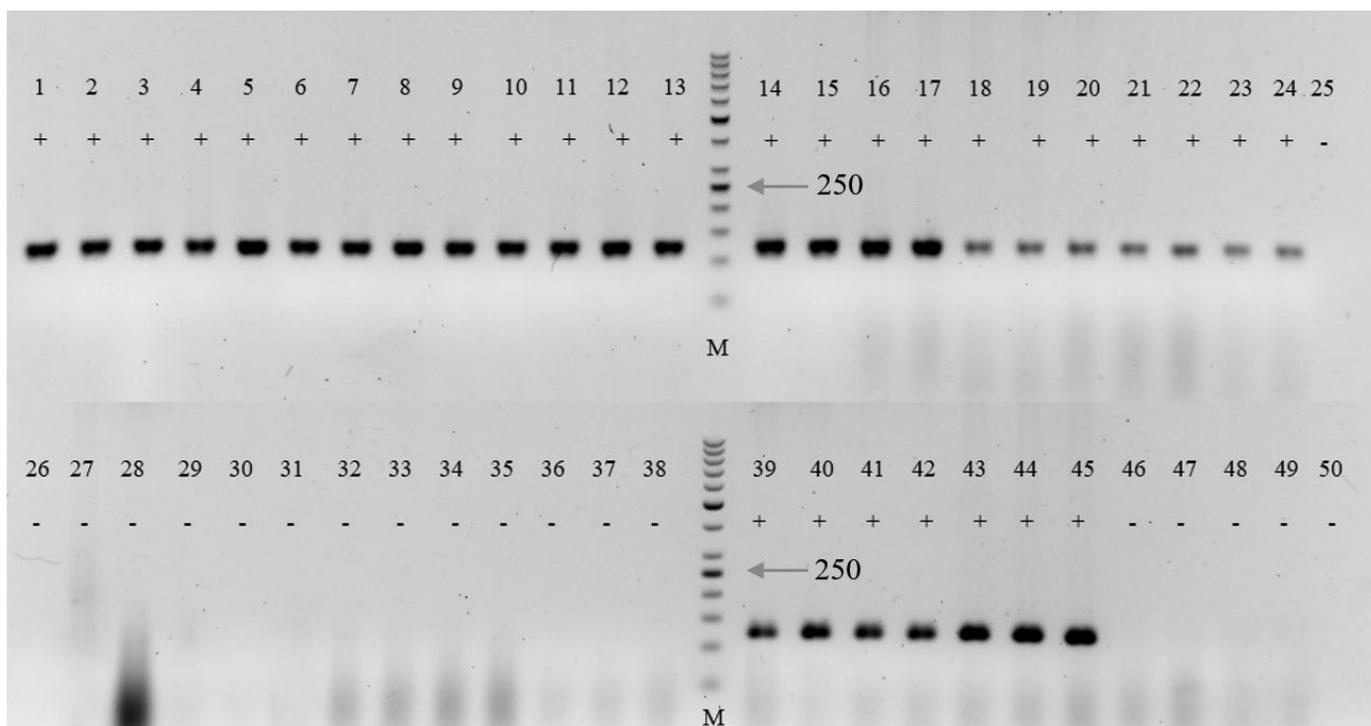


Рисунок 3. Детекция штаммов *Xanthomonas arboricola*, патогенных для злаковых и капустных культур. Размер диагностического фрагмента 121 н.п.. М – маркер молекулярного веса 50bp «Fermentas», 1 – ICMP 35, 2 – s1, 3 – s2, 4 – s3, 5 – s4, 6 – Bo1392, 7 – Bo1393, 8 – Bo1395, 9 – Br1343, 10 – Br1344, 11 – Br1345, 12 – Br1346, 13 – Br1347, 14 – Br1348, 15 – Br1349, 16 – Br1350, 17 – Br1351, 18 – Br1352, 19 – Br1353, 20 – Br1354, 21 – Br1355, 22 – Br1356, 23 – Br1357, 24 – Br1363, 25 – Br1364, 26 – *X. campestris*, 27 – *X. vesicatoria*, 28 – *X. oryzae*, 29 – *X. hortorum*, 30 – *X. axonopodis*, 31 – *Clavibacter* spp., 32 – *Pectobacterium* spp., 33 – *Dickeya* spp., 34 – *Pseudomonas* spp., 35 – *Klebsiella* spp., 36 – *Bacillus* spp., 37 – *Stenotrophomonas* spp., 38 – *Enterobacter* spp., 39 – Br1365, 40 – Br1366, 41 – ya1265, 42 – ya3004, 43 – ya3028, 44 – To1577, 45 – To417, 46 – *Bradyrhizobium* spp., 47 – *Serratia* spp., 48 – *Advenella* spp., 49 – *Pantoea* spp., 50 – отрицательный контроль

Figure 3. Detection of *Xanthomonas arboricola* strains pathogenic to cereals and cabbage crops. The size of the diagnostic fragment is 121 n.p. M – molecular weight marker 50bp “Fermentas”, 1 – ICMP 35, 2 – s1, 3 – s2, 4 – s3, 5 – s4, 6 – Bo1392, 7 – Bo1393, 8 – Bo1395, 9 – Br1343, 10 – Br1344, 11 – Br1345, 12 – Br1346, 13 – Br1347, 14 – Br1348, 15 – Br1349, 16 – Br1350, 17 – Br1351, 18 – Br1352, 19 – Br1353, 20 – Br1354, 21 – Br1355, 22 – Br1356, 23 – Br1357, 24 – Br1363, 25 – Br1364, 26 – *X. campestris*, 27 – *X. vesicatoria*, 28 – *X. oryzae*, 29 – *X. hortorum*, 30 – *X. axonopodis*, 31 – *Clavibacter* spp., 32 – *Pectobacterium* spp., 33 – *Dickeya* spp., 34 – *Pseudomonas* spp., 35 – *Klebsiella* spp., 36 – *Bacillus* spp., 37 – *Stenotrophomonas* spp., 38 – *Enterobacter* spp., 39 – Br1365, 40 – Br1366, 41 – ya1265, 42 – ya3004, 43 – ya3028, 44 – To1577, 45 – To417, 46 – *Bradyrhizobium* spp., 47 – *Serratia* spp., 48 – *Advenella* spp., 49 – *Pantoea* spp., 50 – negative control

Обсуждение

На сегодняшний день существует не менее 50 протоколов определения бактерий рода *Xanthomonas*, основанных на методах классической ПЦР, RT-ПЦР и ВЮ-ПЦР (Егорова, 2015). Все системы детекции на основе метода ПЦР способны различать организмы на следующих уровнях: род, вид, патовариант и штамм. Вариабельность целевого гена является основой для его выбора. Первые системы детекции, основанные на последовательностях 16s рРНК, не позволяли идентифицировать бактерии на уровне ниже вида в связи с низкой скоростью изменчивости данного гена (Moore et al., 1997). Затем было предложено использование последовательностей межгенного транскрибируемого региона 16S-23S рРНК. Данный регион показывал значительную изменчивость в результате дрейфа генов (Garcia-Martínez et al., 1996; Tokajian et al., 2016). Он изменяется до 10 раз быстрее гена 16S рРНК, что позволило использовать его для видовой идентификации бактерий (Rosato et al., 2002). В 1996 году было

предложено использовать для видовой идентификации гены «домашнего хозяйства». Широкое применение на практике в качестве гена-мишени получил ген *gyrB*. Последовательности данного гена были использованы в качестве филогенетического маркера, а также в качестве диагностического маркера на уровне рода и вида (Yamamoto et al., 1996; Yamamoto et al., 1999). Использование тест-систем на основе последовательностей гена *gyrB* позволило идентифицировать такие виды, как *X. fragariae*, *X. oryzae*, *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. translucens*, *X. axonopodis*, *X. citri* и *X. alfalfa* (Parkinson et al., 2007). Для выявления различных патовариантов *X. campestris* и некоторых других видов рода *Xanthomonas* также используются гены ТЗSS (Leite et al., 1994; Zaccardelli et al., 2007; Hasan et al., 2018). Для детекции *X. arboricola* pv. *pruni* были разработаны тест-системы на различные участки *hrp* генов (Park et al., 2010; Palacio-Bielsa et al., 2015). Кроме того, для выявления *X. arboricola* используют ряд генов-мишеней,

идентифицированных с помощью *in silico* подходов (ХА11, ХА16 и ХА18), и АВС-транспортеры (Palacio-Bielsa et al, 2011, Fernandes et al, 2017).

Атипичные штаммы *X. arboricola* представляют из себя сложную группу для диагностики, что связано с их генетическими особенностями. Аннотация генома шт. 3004 подтвердила отсутствие генов ТЗSS, выявленное ранее при постановке реакции ПЦР с праймерами на консервативные участки данных генов и генов белков эффекторов. При множественном выравнивании с помощью алгоритма progressiveMauve генома шт. 3004 с 11-ю полностью секвенированными и аннотированными последовательностями геномов бактерий рода *Xanthomonas* наблюдалась высокая гомология многих участков генома шт. 3004 с таким же участком хотя бы у одного из 11 штаммов. Высокая гомология отдельных участков может способствовать появлению ложноположительного результата. Кроме того, штаммы группы *X. arboricola* 3004 достаточно генетически разнородны, что может быть связано с активными процессами приспособления к новому кругу растений-хозяев. При использовании мультилокусного генотипирования с использованием генов *gyrB*, *dnaK*, *rpoD*, *purA*, *nrdB*, *prpC*, *fabB*. согласно протоколам, разработанным Янгом и коллегами (Young et al., 2008), практически все штаммы четко не типизируются до патоварианта и вида, несмотря

на типичные для *X. arboricola* биохимические свойства (Кырова и др., 2014). Использование высоковариабельных генов для такой группы штаммов также приводит к появлению ложных результатов.

В качестве перспективных генов-мишеней для идентификации данной группы мы отмечаем гены системы секреции IV типа (Т4SS). На сегодняшний день в базах данных белковых и нуклеотидных последовательностей депонировано более тысячи последовательностей Т4SS бактерий рода *Xanthomonas*. Все они проявляют достаточно ограниченную гомологию друг с другом внутри видов (Souza et al., 2015). Ограниченная гомология таких генов была также отмечена и при анализе множественного выравнивания геномов бактерий рода *Xanthomonas*.

Разработанная нами тест-система на основе гена *virD4* Т4SS показала высокую специфичность и чувствительность. Мы также предполагаем, что выбранный при разработке тест-системы участок возможно использовать для систем-детекции на уровне вида и у других представителей рода *Xanthomonas*. Для детекции отдельных патовариантов *X. arboricola* мы предлагаем использовать гены *virB3*, *virB4* и *virB9*, показавшие при множественном выравнивании более высокий уровень вариабельности. Возможность их использования для атипичных штаммов *X. arboricola* требует дополнительного изучения.

Библиографический список (References)

- Евсеев ВВ, Каракотов СД (2021) Бактериозы зерновых культур в лесостепной зоне Зауралья, Южного Урала и Северного Казахстана. *Защита и карантин растений* (1):13–17
- Егорова МС, Игнатов АН, Мазурин ЕС (2014) Диагностика нового бактериального патогена злаковых культур *Xanthomonas arboricola* методом ПЦР «в реальном времени». *Защита картофеля* (2):39–42
- Егорова МС (2015) Видовое разнообразие и методы диагностики фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas*, поражающих растения семейства Мятликовые (*Poaceae*): Дисс. ... к.б.н. Москва. 132 с.
- Игнатов АН, Пунина НВ, Матвеева ЕВ, Корнев КП и др (2009) Новые возбудители бактериозов и прогноз их распространения в России. *Защита и карантин растений* (4):38–40
- Игнатов АН, Пунина НВ, Матвеева ЕВ, Пехтерева ЭШ и др (2010) *Xanthomonas arboricola* – бактериальный патоген сельскохозяйственных культур в России. *Защита и карантин растений* (4):41–43
- Кырова ЕИ, Виноградова СВ, Игнатов АН (2014) Мультилокусное гентипирование *Xanthomonas arboricola* российской популяции. *Защита картофеля* (2):91–94
- Лазарев АМ, Мысник ЕН, Игнатов АН (2017) Ареал и зона вредоносности сосудистого бактериоза капусты. *Вестник защиты растений* 1(91):52–55
- Мокрякова МВ, Абдеева ИА, Пирузян ЭС, Шаад НВ и др (2010) Разнообразие генов-эффекторов у бактерий рода *Xanthomonas*. *Микробиология* 79(1):63–71
- Пунина НВ (2009) Оценка генетического разнообразия фитопатогенных бактерий рода *Xanthomonas* и разработка молекулярных маркеров для их диагностики. Дисс. ... к.б.н. Москва. 188 с.
- Bini F, Kuczmog A, Putnoky P, Otten L et al (2008) Novel pathogen-specific primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. *Vitis* 47(3):181–189
- Cesbron S, Briand M, Essakhi S, Gironde S et al (2015) Comparative genomics of pathogenic and nonpathogenic strains of *Xanthomonas arboricola* unveil molecular and evolutionary events linked to pathoadaptation. *Front Plant Sci* 6:1126. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01126>
- Darling AE, Mau B, Perna NT (2010) progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PloS ONE* 5(6):e11147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>
- Fernandes C, Albuquerque P, Sousa R, Cruz L et al (2017) Multiple DNA markers for identification of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* isolates and its direct detection in plant samples. *Plant Dis* 101(6):858–865. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1481-RE>
- Fischer-Le Saux M, Bonneau S, Essakhi S, Manceau C et al (2015) Aggressive emerging pathovars of *Xanthomonas arboricola* represent widespread epidemic clones that are distinct from poorly pathogenic strains, as revealed by multilocus sequence typing. *Appl Environ Microbiol* (81):4651–4688. <https://doi.org/10.1128/AEM.00050-15>
- Garcia-Martinez J, Martinez-Murcia A, Anton AI, Rodriguez-Valera F (1996) Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the rRNA operons of some *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K-12. *J Bacteriol Res* 178(21):6374–6377. <https://doi.org/10.1128/jb.178.21.6374-6377.1996>
- Haas JH, Moore LW, Ream W, Manulis S (1995) Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. *Appl Environ Microbiol* 61(8):2879–2884.
- Hasan SZ, Hossain F, Zaoti ZF, Hasan F et al (2018) PCR amplification of DNA sequence related to the *hrpD* gene of

- Xanthomonas cucurbitae* in leaf spot disease of pumpkin and their antagonism by soil bacteria. *Arch Phytopathol Pflanzenschutz* 51(5–6):252–266. <https://doi.org/10.1080/03235408.2018.1460923>
- Ignatov AN, Кырова EI, Vinogradova SV, Kamionskaya et al (2015) Draft genome sequence of *Xanthomonas arboricola* strain 3004, a causal agent of bacterial disease on barley. *Genome Announc* 3(1):e01572-14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01572-14>
- Juhas M, Crook DW, Hood DW (2008) Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiol* 10(12):2377–2386. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01187.x>
- Кырова EI, Ignatov AN (2019) Diagnostics of phytopathogens of genus *Xanthomonas* infecting *Poaceae* plants. *Innovative in Agriculture*. 14–17
- Leite RP, Minsavage GV, Bonas U, Stall RE (1994) Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the *hrp* genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Appl Environ Microbiol* 60(4):1068–1077.
- Merda D, Briand M, Bosis E, Rousseau C et al (2017) Ancestral acquisitions, gene flow and multiple evolutionary trajectories of the type three secretion system and effectors in *Xanthomonas* plant pathogens. *Mol Ecol* 26(21):5939–5952. <https://doi.org/10.1111/mec.14343>
- Moore ER, Krüger AS, Hauben L, Seal SE et al (1997) 16S rRNA gene sequence analyses and inter-and intragenic relationships of *Xanthomonas* species and *Stenotrophomonas maltophilia*. *FEMS Microbiol Lett* 151(2):145–153. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12563.x>
- Palacio-Bielsa A, Cubero J, Cambra MA, Collados R et al (2011) Development of an efficient real-time quantitative PCR protocol for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in *Prunus* species. *Appl Environ Microbiol* 77(1):89–97. <https://doi.org/10.1128/AEM.01593-10>
- Palacio-Bielsa A, López-Soriano P, Bühlmann A, van Doorn J et al (2015) Evaluation of a real-time PCR and a loop-mediated isothermal amplification for detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in plant tissue samples. *J Microbiol Methods* 112:36–39. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2015.03.005>
- Park SY, Lee YS, Koh YJ, Hur JS et al (2010) Detection of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* by PCR using primers based on DNA sequences related to the *hrp* genes. *Sci J Microbiol* 48(5):554–558.
- Parkinson N, Aritua V, Heeney J, Cowie C et al (2007). Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species by comparison of partial gyrase B gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 57(12):2881–2887. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65220-0>
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S et al (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol Biol Evol* 34:3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria (No. Ed. 3). American Phytopathological Society (APS Press). 373p
- Souza DP, Oka GU, Alvarez-Martinez CE, Bisson-Filho AW et al (2015) Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nat Commun* 6(1):1–9.
- Tokajian S, Issa N, Salloum T, Ibrahim J et al (2016) 16S rRNA gene intergenic spacer region variability helps resolve closely related sphingomonads. *Front Microbiol* 7:149. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00149>
- Vauterin L, Hoste B, Kersters K, Swings J (1995) Reclassification of *Xanthomonas*. *Int J Syst Evol Microbiol* 45(3):472–489. <https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-472>
- Williams PH (1980) Black rot: a continuing threat to world crucifers. *Plant Dis* 64(8):736–742.
- Yamamoto S, Bouvet PJ, Harayama S (1999) Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *Int J Syst Evol Microbiol* 49(1):87–95. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-87>
- Yamamoto S, Harayama S (1996) Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *Int J Syst Evol Microbiol* 46(2):506–511. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-2-506>
- Young JM, Park DC, Shearman HM, Fargier E (2008) A multilocus sequence analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst Appl Microbiol* 31(5):366–377. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.004>
- Zaccardelli M, Campanile F, Spasiano A, Merighi M (2007) Detection and identification of the crucifer pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, by PCR amplification of the conserved Hrp/type III secretion system gene *hrcC*. *Eur J Plant Pathol* 118(3):299–306. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9115-y>

Translation of Russian References

- Evseev VV, Karakotov SD (2021) [Bacterial diseases of cereal crops in the woodsteppe area of the Trans-Urals, Southern Urals and Northern Kazakhstan]. *Zashchita i karantin rasteniy* (1):13–17 (In Russian)
- Egorova MS, Ignatov AN, Mazurin ES (2014) [Real-time PCR detection of *Xanthomonas arboricola*, a new bacterial pathogen of cereal crops]. *Zashchita kartofelya* (2):39–42 (In Russian)
- Egorova MS (2015) [Species diversity and diagnostic methods of phytopathogenic bacteria of the genus *Xanthomonas* affecting plants of the *Poaceae* family] Moscow: Russian State Agrarian University, 132 p. (In Russian)
- Ignatov AN, Punina NV, Matveeva EV, Kornev KP et al (2009) [Novel bacterial pathogens and prediction of their spread in Russia]. *Zashchita i karantin rasteniy* (4):38–40 (In Russian)
- Ignatov AN, Punina NV, Matveeva EV, Pekhtereva ES et al (2010) [*Xanthomonas arboricola* – bacterial pathogen of crops in Russia]. *Zashchita i karantin rasteniy* (4):41–43 (In Russian)
- Кырова EI, Vinogradova SV, Ignatov AN (2014) [Multi-locus genotyping the Russian population of *Xanthomonas arboricola*]. *Zashchita kartofelya* (2):91–94 (In Russian)
- Lazarev AM, Mysnik EN, Ignatov AN (2017) [Spread and area of harmfulness of black of cabbage]. *Vestnik zashchity rasteniy* 1(91):52–55 (In Russian)

Mokryakova MV, Abdeeva IA, Piruzyan ES, Shaad NV et al (2010) [Diversity of effector genes in the genus *Xanthomonas*]. *Mikrobiologiya* 79(1):63–71 (In Russian)

Punina NV (2009) [Evaluation of genetic diversity of phytopathogenic bacteria of the genus *Xanthomonas* and development of molecular markers for their diagnostic]. Moscow. 188 p. (In Russian)

Plant Protection News, 2021, 104(2), p. 87–96

OECD+WoS: 4.01+AM (Agronomy)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2021-104-2-14962>

Full-text article

SELECTION OF TARGET GENES FOR PCR DIAGNOSTICS OF *XANTHOMONAS ARBORICOLA* VIRULENT FOR CEREALS AND BRASSICAS

E.I. Kyrova^{1*}, A.N. Ignatov²

¹All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

²Russian University of People's Friendship, Moscow, Russia

*corresponding author, e-mail: ekirova1911@yandex.ru

Plant pathogenic xanthomonads virulent to wheat, rye, barley, tomato, sunflower, and brassicas were isolated in Russia in 2001–2008. Physiological tests and multilocus sequence typing analysis confirmed their position within the *Xanthomonas arboricola* species. The obtained draft genome sequence of representative strain 3004 from barley plants, which is also virulent to sunflower, brassicas, and chestnut, demonstrated an absence of the Type 3 Secretion System T3SS and an evidence for the lateral gene transfer of some other virulence genes from distantly related bacteria. It was concluded that T4SS genes can be used as the target for group-specific PCR analysis of the emerging pathogen. It was proposed to use *virD4*, *virB3*, *virB4*, and *virB9* genes to design a detection system. After preliminary experiments with classic PCR for the chosen genes, primers and TaqMan(R) probe were designed to specifically amplify a 121 bp fragment of the *VirD4* gene. Amplification products were obtained for all target *Xanthomonas arboricola* strains and were not detected in other *Xanthomonas* species, or in other pathogenic or epiphytic bacteria occurring on these host plants. The assay readily detected *Xanthomonas arboricola* infection in diseased plants and from bacterial colonies isolated on semi-selective media, and was more sensitive and specific than traditional plating methods.

Keywords: genome analysis, virulence genes, sunflower, real time PCR, seedborne infection

Submitted: 10.03.2021

Accepted: 30.05.2021

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДЕРНОВО-ПОДЗОЛИСТОЙ СУПЕСЧАНОЙ ПОЧВЫ ПРИ МЕЛИОРАТИВНОМ ВНЕСЕНИИ ГИДРОГЕЛЕЙ**Т.Н. Данилова, Ю.В. Хомяков, П.Ю. Конончук****Агрофизический научно-исследовательский институт, Санкт-Петербург***ответственный за переписку, e-mail: 79117717774@yandex.ru*

Биологическая активность почвы – показатель, характеризующий численность организмов, обитающих в почве, и количественно оценивающий результаты их жизнедеятельности. Высокая биологическая активность является фактором повышения плодородия почв и её фитосанитарного состояния, достигается путем создания оптимальных условий жизнедеятельности почвенных микроорганизмов: обеспеченности питательными элементами, прежде всего органическим веществом, влагой, теплом и аэрацией почвы. В данной работе проведена оценка влияния гидрогелей разной химической основы на микробиологическую активность дерново-подзолистой супесчаной почвы. Изучено изменение биологической активности дерново-подзолистой почвы при внесении гидрогелей в почву вегетационных сосудов микрополевого опыта, заложенного в специальной установке, которая позволяет моделировать влагообеспеченность опытного участка – «засушнике», для исследования водообеспечения зерновых культур в условиях почвенной засухи и в полевых условиях (Меньковский филиал ФГБНУ АФИ, Гатчинский р-н, Ленинградская обл.). «Засушник» состоит из металлического каркаса с крышей, покрытой полиэтиленовой плёнкой или поликарбонатом. Вокруг «засушника» вырыта канава шириной 30–35 см и глубиной 60–70 см для изоляции от атмосферной воды. Для изоляции корней растений от грунтовых вод на глубине два метра укладывают два слоя полиэтиленовой пленки. В «засушнике» можно моделировать атмосферную и почвенную засуху в засушливые годы, во влажные годы – только почвенную. Опыт заложен с двумя типами гидрогелей (калиевая и натриевая основа) с одной дозой внесения (40 г/м²). В эксперименте сравнивали показатели биологической активности почвы в вариантах: почва – контроль с внесением азотосодержащего удобрения (фон N₉₀P₉₀K₉₀), гидрогель, внесенный на глубину 10–12 см + N₉₀P₉₀K₉₀, гидрогель, внесенный на глубину 20–22 см + N₉₀P₉₀K₉₀. Образцы дерново-подзолистой супесчаной почвы отбирали с глубины (10–12 см и 20–22 см) в начале и в конце вегетационного периода. В результате проведенных лабораторных исследований выявлено, что при внесении гидрогеля, как в верхнем корнеобитаемом слое почвы, так и в слое 20–22 см создаются благоприятные условия для микробиологической активности дерново-подзолистой супесчаной почвы. Установлено, что химическая основа гидрогеля не оказывает ингибирующего влияния на деятельность микробного сообщества.

Ключевые слова: биологическая активность, базальное дыхание, микробное дыхание, микробная биомасса, гидрогель

*Поступила в редакцию: 05.08.2020**Принята к печати: 10.06.2021***Введение**

Биологическая активность почвы – интегральный показатель, характеризующий общее содержание ферментов, высвобождающихся в течение жизни растений и почвенных микроорганизмов и накапливающихся в почве после деструкции микробных и растительных клеток (Забелина, 2014). Она определяется интенсивностью процессов трансформации органических соединений, а также направленностью процессов преобразования энергии и вещества в наземных экосистемах. К показателям биологической активности почвы обычно относят биомассу и количество различных групп почвенных микроорганизмов, их активность, ферментативную активность, количество и скорость накопления продуктов жизнедеятельности почвенных организмов, интенсивность процессов, связанных с трансформацией и круговоротом элементов и соединений (Купревич, 1951). Это важная характеристика почвы, дополняющая ее агрофизические и агрохимические свойства. Для оценки биологической активности и

плодородия почвы довольно часто используют показатели активности ферментов.

Основные методы определения показателей биологической активности включают микробиологический, биохимический, физиологический и химический. Традиционно выделяется фактическая и потенциальная биологическая активность почв, определяемая различными методами (Безкоровая, 2001). Потенциальная биологическая активность оценивается в искусственно создаваемых, оптимальных для конкретного исследуемого процесса условиях. Фактическая (реальная, естественная, полевая) биологическая активность определяется непосредственно в поле и характеризует реальную активность почвы в естественных условиях (Сэги, 1983).

С биологической активностью почвы связаны кислотно-основные свойства, окислительно-восстановительный потенциал, почвенная структура, количество и качество органического вещества и другие физические и химические

показатели. На количество и активность почвенных микроорганизмов воздействует целый комплекс абиотических, биотических и антропогенных факторов окружающей среды. Формирование микробных сообществ почвы во многом определяется ее водно-воздушным и тепловым режимом. Естественное изменение сообществ микроорганизмов происходит при деструкции и вовлечении в биологический круговорот органического вещества. Так, на первых этапах разложения растительных остатков в них развиваются, как правило, неспорообразующие бактерии и грибы, в дальнейшем увеличивается количество бацилл и актиномицетов. Количество, систематическое разнообразие почвенной микробиоты во многом отражается в том, что разложение органических веществ в разных климатических зонах происходит с неодинаковой скоростью и направленностью (Заварзин, 2004; Мотузова, 2007).

Внесение полиакриламидных гелей в почву, особенно в аридных климатических условиях, оказывает положительное влияние на рост и развитие растений (Nayat, Ali, 2004). Полимерные гели многократно увеличиваются в объеме при набухании, обладают высокой способностью к абсорбции воды, при этом стабильны при многократных циклах дегидратации/гидратации. При внесении в почвенный корнеобитаемый слой частицы геля располагаются в межагрегатном пространстве и при поступлении влаги набухают, обеспечивая прирост влажности по сравнению с показателями в необработанной почве (Данилова, Табынбаева, 2019). Применение гидрофильного полимера дает возможность накапливать значительное количество продуктивной влаги в корневой зоне растений (Gilbert et al., 2014). Полиакриламидный гель может использоваться как потенциальный носитель для инсектицидов, фунгицидов, гербицидов и удобрений (Jhurry, 1997). Однако влияние гидрофильных акриловых полимеров на почвенную биоту очень мало изучено. В зарубежной литературе есть сведения, что полиакриламидный гидрогель может в небольшой степени стимулировать рост бактерий рода *Pseudomonas*, причем стимуляция роста связана с дополнительным поступлением аммонийного азота в среду при гидролизе амидных групп углеродной цепи полиакриламида (Kau-Shoemake et al., 1998b). Обнаружено, что количество культивируемых гетеротрофных бактерий значительно увеличивалось в почвах, обработанных полиакриламидом и засеянных картофелем, однако этот эффект не наблюдался, если обработанные почвы засеивались фасолью. Предполагалось, что почвы, обработанные полиакриламидом и засеянные картофелем, содержали значительно более высокие концентрации NO_3 и NH_3 , чем необработанные или засеянные фасолью почвы (Kau-Shoemake et al., 1998a).

В Агрофизическом НИИ еще в 80–90-х годах изучали влияние различных доз (0.1–0.25–0.5–1 % от веса почвы) АЛС (сополимерный акрилатно-лигносульфонатный структурообразователь) и длительность его действия (от 1 сут до 3 мес) на метаболизм почвы. Установлено, что внесение АЛС в количестве 1 % от массы почвы увеличивает скорость газообменных процессов в 1-й день эксперимента в 1.5–2 раза, что, по-видимому, обусловлено внесением значительного количества органического вещества. АЛС в дозах 0.5–1 % подавляет активность микроорганизмов, разрушающих целлюлозу, в первые 2 месяца после внесения его в почву; малые дозы АЛС (0.1 %), напротив,

значительно активируют жизнедеятельность (Абросимова, 1983).

Актуальная кислотность, как один из важнейших физико-химических показателей качества почвы, в значительной мере определяет характер микробиоты. Значение кислотности одного типа почвы на разных участках поля может незначительно отличаться, кислотность может изменяться в течение вегетационного периода, что связано, в том числе, с жизнедеятельностью микроорганизмов: выделением ими углекислого газа, образованием органических кислот и т.п.

Большинство групп микроорганизмов наиболее активны в нейтральной среде, микробиологические процессы в почве активируются при нейтрализации кислых и щелочных почв, то есть за счет нормализации кислотно-основных свойств почвы. Количество всех групп почвенных микроорганизмов с глубиной уменьшается, но химический состав почвы в пахотном слое остается относительно неизменным. Уменьшение численности микроорганизмов с глубиной может быть вызвано ухудшением водно-воздушного режима или накоплением каких-либо метаболитов в нижних горизонтах почвы. Более глубокие слои почвы могут характеризоваться большим количеством углекислого газа в составе почвенных газов, что способствует уменьшению количества микроорганизмов и соответственно снижению микробиологической активности. Более активным по энергии дыхания считается верхний слой почвы (Емцев, Мишустин, 2005).

Биологическая активность почвы тесно связана с содержанием и составом органических веществ. Именно деятельностью почвенных микроорганизмов определяются такие важные процессы, как минерализация растительных остатков, гумификация, дегумификация, динамика высвобождения элементов минерального питания, реакция почвенного раствора, трансформация различных загрязняющих веществ в почве. Для повышения биологической активности почвы применяют органические и бактериальные удобрения, сидераты, а также проводят мероприятия, обеспечивающие наилучшие физико-химические, водно-воздушные, окислительно-восстановительные и температурные условия. Одним из способов влияния на указанные свойства почвы, приводящих к изменению биологической активности и направленности процессов трансформации химических соединений в почве, служит внесение в корнеобитаемый слой биоугля (Рижия и др., 2017). Применение полимерных гелей улучшает водно-физические и водно-воздушные свойства почвы (Данилова, 2016) и соответственно должно способствовать повышению биологической активности почвенной микробиоты. В экспериментальных исследованиях зарубежных ученых (Pushpamalar et al., 2018, Rabat et al., 2016) показано, что SRFH (синтезированная смесь акриламида или акриловой кислоты с минеральным удобрением) экологически совместима с лесной почвой, и она не оказывает неблагоприятного воздействия на микробное сообщество лесной подстилки. Комбинация гидрогеля и минеральных удобрений (KNO_3 , NH_4NO_3) способствует снижению потерь влаги на испарение и медленному высвобождению элементов питания из удобрений в течение вегетации растений. В полевых исследованиях (Li et al., 2014) изучено влияние двух типов водопоглощающих полимеров Jaguar

С (JS) и Jaguar S (JS), на рост и развитие озимой пшеницы, физические свойства почвы и активность микробной массы. Установлено, что внесение в почву полимерных гелей способствовало образованию макро почвенных агрегатов (размер частиц >0.25 мм) и увеличению количества микроорганизмов в почве при возделывании озимой пшеницы. Обработка посевов пшеницы полимером JS повысила урожайность культуры, улучшила эффективность использования доступного углерода почвенными микроорганизмами и увеличила микробное дыхание.

На основании экспериментальных работ зарубежных ученых (Sojka et al., 2006, Li et al., 2014, Ma et al., 2016, Jing et al., 2015) была определена цель нашего исследования. Она заключалась в оценке влияния двух типов гидрогелей (на натриевой и калиевой основе) на микробиологическую активность дерново-подзолистой супесчаной почвы при внесении гидрогелей в корнеобитаемый слой (10–12 см) почвы и в слой (20–22 см) в условиях почвенной засухи и в полевых условиях.

Материалы и методы

Объектом исследования служила дерново-подзолистая супесчаная почва, взятая из вегетационных сосудов микрополевого опыта, заложенного в 2015 году в специальной установке «засушник» и в полевых условиях (Меньковский филиал ФГБНУ АФИ, Гатчинский р-н, Ленинградская обл.). «Засушник» – установка, состоящая из рамы со светопропускающим поликарбонатным экраном, позволяющая моделировать влагообеспеченность опытного участка путём исключения воздействия внешних осадков.

Общая площадь «засушника»–50 м², площадь, занятая экспериментом–15 м². Опыт заложен в вегетационных

Поставленная цель включает решение следующих задач: определить влияние разных типов гидрогелей на микробное и базальное дыхание почвенной микробиоты и исследовать возможность ингибирующего действия гидрогелей различных типов на жизнедеятельность микроорганизмов дерново-подзолистой супесчаной почвы.

В данной работе впервые исследована микробиологическая активность дерново-подзолистой супесчаной почвы в условиях модельной почвенной засухи. Изучено влияние гидрогелей отечественного производства с разной структурной основой на эффективность использования доступного углерода микрофлорой почвы при внесении гелей на глубину корнеобитаемого и пахотного слоя. Гидрогели отечественного производства обладают высокой водоудерживающей способностью (Данилова, 2020), и также эффективны при применении в современных агротехнологиях как и зарубежные полимерные гели (Данилова, Табынбаева, 2019), но стоимость производства отечественных гидрогелей значительно ниже.

сосудах S = 0.075 м²; V = 0.0025 м³. Повторность опыта пятикратная, размещение вариантов систематическое (рис. 1). Для эксперимента взяты два типа гидрогелей: гидрогель «Ритин-10» (натриевая основа), содержание К–27.05%; Na–36.98%, 1 г гидрогеля удерживает 300 мл воды; гидрогель «В–415К» (калиевая основа), содержание К₂O–не менее 21%, 1 г гидрогеля удерживает 400 мл воды. Доза внесения гидрогеля: из расчета 400 кг/га–4 гр/м². Для сравнения эксперимент с аналогичной схемой заложен в полевых условиях (Данилова, 2018).



защитная полоса							
защитная полоса	К	Na (10–12см)	К (10–12см)	Na (20–22см)	К (20–22см)	защитная полоса	
	К	Na (10–12см)	К (10–12см)	Na (20–22см)	К (20–22см)		
	К	Na (10–12см)	К (10–12см)	Na (20–22см)	К (20–22см)		
	К	Na (10–12см)	К (10–12см)	Na (20–22см)	К (20–22см)		
	К	Na (10–12см)	К (10–12см)	Na (20–22см)	К (20–22см)		
защитная полоса							

Рисунок 1. Микрополевого эксперимент («засушник», полевые условия) и схема опыта
 Обозначения: К – контроль; Na (10–12) и К (10–12) – гидрогель, внесенный в слой 10–12 см;
 Na (20–22) и К (20–22) – гидрогель, внесенный в слой 20–22 см.
 Na – гидрогель натриевая основа; К – гидрогель калиевая основа

Figure 1. Experimental setup (drought simulator, field conditions)
 Designations: K – control; Na (10–12) and K (10–12) – hydrogel applied to the 10–12 cm layer;
 Na (20–22) and K (20–22) – hydrogel applied to the 20–22 cm layer.
 Na – sodium based hydrogel; K – potassium based hydrogel

Варианты опыта:

1. Контроль – фон $N_{80}P_{80}K_{80}$
2. Фон $N_{80}P_{80}K_{80} + \Gamma_{Na}$ (10–12 см)
3. Фон $N_{80}P_{80}K_{80} + \Gamma_K$ (10–12 см)
4. Фон $N_{80}P_{80}K_{80} + \Gamma_{Na}$ (20–22 см)
5. Фон $N_{80}P_{80}K_{80} + \Gamma_K$ (20–22 см)

Для изучения влияния гидрогелей на изменение биологической активности почвы, образцы отбирались с глубины 10–12 см и 20–22 см на начальном и заключительном этапах вегетации. Образцы почвы высушивали при температуре 22–24 °С и просеивали через сито (ячейка диаметром 2 мм). Интенсивность дыхания почвы измерялась в лабораторных условиях по интенсивности выделения CO_2 из почвы при увлажнении, соответствующей 65–70% от ППВ по методике, представленной в лабораторном практикуме (Банкин и др., 2005).

Расчет величины базального дыхания (БД) V_{basal} (мг С/г/час) проводился по формуле:

$$V_{basal} = (C1 - C0) \times 12 \times V_{флак} \times 1000 / m \times 22.4 \times t \times 100 \quad (1)$$

где $C0$ – начальная концентрация CO_2 во флаконе, объемные %; $C1$ – конечная концентрация CO_2 во флаконе; $V_{флак}$ – объем флакона, мл; t – время инкубации, час; m – навеска почвы, г.

Содержание углерода микробной биомассы определяли методом субстрат–индуцированного дыхания – СИД (Anderson, Domsch, 1978; Ананьева и др., 2011). В настоящее время СИД относится к одному из стандартных

методов определения микробной биомассы почвы. Содержание углерода микробной биомассы определяли по формуле:

$$Cmic = 40.04 \times VSIR + 0.37 \quad (2)$$

где $Cmic$ – содержание углерода, иммобилизованного в микробной биомассе (мкг С/100 г почвы), $VSIR$ – скорость субстрат-индуцированного дыхания (СИД, мг С/1 г почвы/час).

Для характеристики эффективности использования доступного углерода микробным сообществом использовали метаболическое частное (qCO_2). Метаболическое частное (qCO_2) служит индикатором стресса микробного сообщества. Чем ниже значения qCO_2 , тем лучше состояние микробного сообщества, т.е. микроорганизмы тратят меньше энергии на содержание и формирование единицы биомассы (Мостовая и др., 2015; Сушко и др., 2016). Метаболическое частное рассчитывается по формуле:

$$qCO_2 = V_{basal} / V \text{ SIR} \quad (3)$$

Статистическую обработку экспериментальных и расчетных данных проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel и Statistics 5.0 («StatSoft, Inc.», США). Статистический анализ включал вычисления значения средних (M) и стандартных отклонений ($\pm SD$). Достоверность различий средних значений между вариантами опыта и контролем оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), при $p \leq 0.05$.

Результаты

В результате проведенных лабораторных исследований получены следующие показатели биологической активности дерново-подзолистой супесчаной почвы при внесении двух типов гидрогелей. Продуцирование CO_2 микроорганизмами почвы рассматривается как ее базальное дыхание (БД), или дыхательный потенциал.

Анализ гистограмм биологической активности дерново-подзолистой супесчаной почвы под культурой ячменя в фазу колошение показывает, что базальное дыхание в полевых условиях в вариантах с гидрогелем, внесенным в верхний корнеобитаемый слой и в слой 20–22 см, ниже, чем базальное дыхание в вариантах с гидрогелем в «засушнике», а микробное дыхание (СИД) выше в полевых условиях (рис. 2). Однако результаты статистического анализа не показали достоверных различий ($p < 0.001$) базального дыхания между контролем и вариантами с гидрогелем в начале вегетации как в «засушнике», так и в полевых условиях.

Внесение гидрогеля в верхний корнеобитаемый слой почвы в «засушнике» достоверно повысило микробное дыхание ($p = 0.05$) в варианте с гидрогелем на калиевой основе, в варианте с гидрогелем на натриевой основе достоверных различий не обнаружено. Это объясняется тем, что гидрогель на калиевой основе удерживает большее количество влаги (400 мл), чем гидрогель на натриевой основе (300 мл). Сравнение контроля с вариантами, где гидрогель был внесен в слой 20–22 см выявило достоверные ($p < 0.05$) различия в обоих вариантах. В полевых условиях внесение гидрогеля в верхний корнеобитаемый слой способствовало достоверному ($p = 0.05$) повышению микробного дыхания, особенно в варианте с гидрогелем на калиевой основе. Внесение гидрогеля в слой 20–22 см также имело

достоверные ($p < 0.05$) различия в варианте с гидрогелем на натриевой основе и ($p = 0.05$) в варианте с гидрогелем на калиевой основе, по сравнению с контрольным вариантом. Базальное дыхание в вариантах с гидрогелем было ниже, чем на контроле и не имело существенных различий.

Анализ гистограмм биологической активности дерново-подзолистой супесчаной почвы в конце вегетации показывает, что в этот период наблюдается снижение деятельности почвенных бактерий как в «засушнике», так и в полевых условиях (рис. 3).

Микробное дыхание в «засушнике» только в варианте с гидрогелем на натриевой основе, внесенным в корнеобитаемый слой, достоверно отличается от контроля ($p = 0.05$). При сравнении контроля и остальных вариантов с гидрогелем, достоверных различий не выявлено. Внесение гидрогеля, как в корнеобитаемый слой, так и на глубину 20–22 см «засушнике» не привело к достоверному повышению базального дыхания. В полевых условиях микробное дыхание не имело достоверных различий между вариантами с гидрогелем и контролем. Базальное дыхание имело достоверные ($p < 0.05$) отличия от контроля только в варианте с гидрогелем на натриевой основе, внесенным в слой 10–12 см. При сравнении вариантов с гидрогелем, внесенным в слой 20–22 см, с контрольным вариантом достоверных различий не обнаружено.

В таблице 1 показана эффективность использования доступного углерода микроорганизмами в «засушнике» и в полевых условиях. Показатель qCO_2 служит индикатором стресса микробного сообщества и, чем меньше этот показатель, тем лучше состояние микробного сообщества (Мостовая и др., 2015; Сушко и др., 2016).

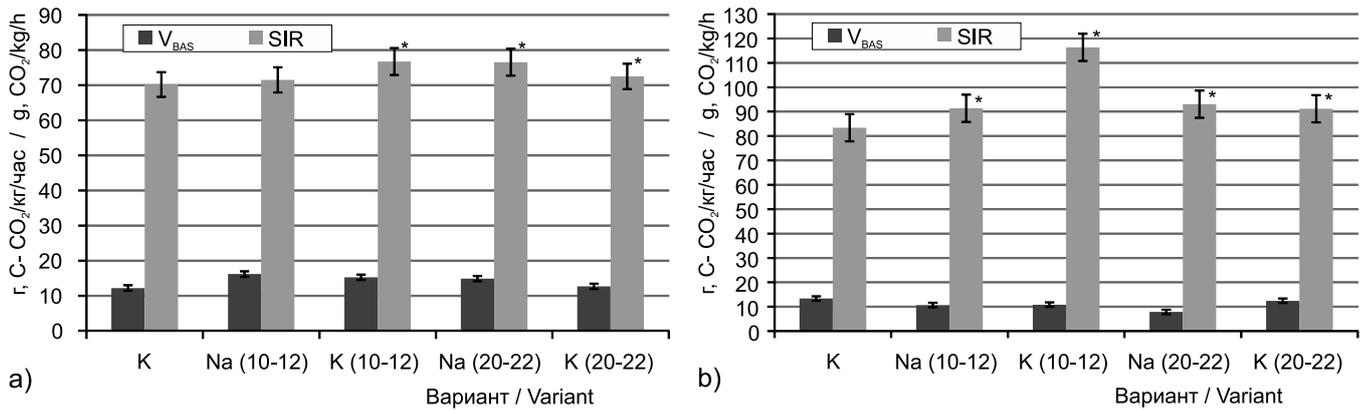


Рисунок 2. Биологическая активность дерново-подзолистой супесчаной почвы при внесении гидрогеля. Фаза развития ячменя – колошение; а) – «засушник»; б) – полевые условия; 2015 г.

Обозначения: V_{BAS} – базальное дыхание; SIR – микробное дыхание;
 К – контроль; Na (10–12) и К (10–12) – гидрогель, внесенный в слой 10–12 см;
 Na (20–22) и К (20–22) – гидрогель, внесенный в слой 20–22 см.
 Показаны средние (М) и стандартные отклонения (±SD).
 Достоверность отличия от контроля: *p≤0.05

Figure 2. Biological activity of the sod-podzolic soil amended with hydrogel Barley development phase – head emergence; а) – «dry place»; б) – field conditions; 2015
 Designations: V_{BAS} – basal breathing; SIR – microbial breathing;
 К – control; Na (10–12) and К (10–12) – hydrogel added into the 10–12 cm layer;
 Na (20–22) and К (20–22) – hydrogel added into the 20–22 cm layer.
 Means (M) and standard deviations (± SD) are shown.
 Differences from control: * p≤0.05

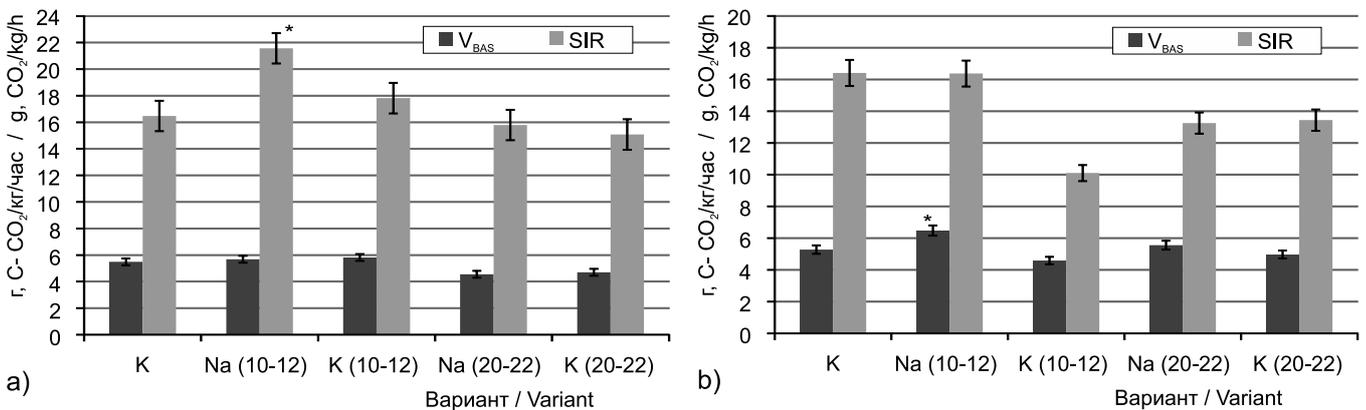


Рисунок 3. Биологическая активность дерново-подзолистой супесчаной почвы при внесении гидрогеля. Фаза развития ячменя – восковая спелость; а) – «засушник»; б) – полевые условия; 2015 г.

Обозначения: V_{BAS} – базальное дыхание; SIR – микробное дыхание;
 К – контроль; Na (10–12) и К (10–12) – гидрогель, внесенный в слой 10–12 см;
 Na (20–22) и К (20–22) – гидрогель, внесенный в слой 20–22 см.
 Показаны средние (М) и стандартные отклонения (±SD).
 Достоверность отличия от контроля: *p≤0.05

Figure 3. Biological activity of the sod-podzolic soil when amended with a hydrogel Barley development phase – wax ripeness; а) – «dry place»; б) – field conditions; 2015.
 Designations: V_{BAS} – basal breathing; SIR – microbial breathing;
 К – control; Na (10–12) and К (10–12) – hydrogel made in layer 10–12 cm;
 Na (20–22) and К (20–22) – hydrogel made in layer 20–22 cm.
 Means (M) and standard deviations (± SD) are shown.
 Differences from control: * p≤0.05

Метаболический коэффициент (qCO₂) в фазу колошения в «засушнике» в вариантах с гидрогелем немного превышает этот показатель в контрольном варианте, т.е. эффективность использования доступного углерода микроорганизмами понижена. В полевых условиях, в

вариантах с гидрогелем, микроорганизмы эффективно используют доступный углерод, так как метаболический коэффициент ниже, чем на контрольном варианте. Можно предположить, что внесение гидрогеля в полевых условиях способствовало улучшению водно-физических свойств

Таблица 1. Эффективность использования доступного углерода микробным сообществом
Table 1. Efficiency of using of the available carbon by microbial community

Варианты опыта Treatments	Метаболический коэффициент (qCO_2) Metabolic coefficient (qCO_2)	
	10–12 см	20–22 см
«засушник» – фаза колошение / Draught simulator – head emergence phase		
Контроль Control	0.173±0.2	
Γ_{Na}	0.224±0.2	0.194±0.1
Γ_K	0.201±0.2	0.138 ±0.2
полевые условия – фаза колошение / Field conditions – head emergence phase		
Контроль Control	0.160±0.2	
Γ_{Na}	0.139±0.2	0.162 ±0.2
Γ_K	0.117±0.3	0.150 ±0.1
«засушник» – фаза восковая спелость / Draught simulator – wax ripeness phase		
Контроль Control	0.333±0.07	
Γ_{Na}	0.335±0.1	0.287±0.08
Γ_K	0.326±0.03	0.312±0.07
полевые условия – фаза восковая спелость / Draught simulator – wax ripeness phase		
Контроль Control	0.317±0.04	
Γ_{Na}	0.338±0.07	0.418±0.06
Γ_K	0.460±0.06	0.364±0.05

Примечание: Γ_{Na} ; Γ_K – гидрогель с натриевой и калиевой основой.

Γ_{Na} ; Γ_K – hydrogel based on sodium or potassium, respectively.

почвы и снижению стресса микробного сообщества. Тип гидрогеля (калиевая или натриевая основа) не оказывал ингибирующего влияния на жизнедеятельность микроорганизмов почвы в полевых условиях. Проведенный статистический анализ метаболического коэффициента по вариантам опыта не показал достоверных различий между вариантами с гидрогелем и контролем. Между вариантами с гидрогелем также не обнаружено существенных различий. Однако в фазу восковой спелости в полевых условиях наблюдается превышение метаболического коэффициента в вариантах с гидрогелем. Предполагаем, что

причина такого превышения связана с влажностью почвы. В работе (Данилова, 2018) представлены данные по объемной влажности дерново-подзолистой супесчаной почвы в «засушнике» и в полевых условиях за период вегетации ячменя. Так в вариантах с гидрогелем в полевых условиях объемная влажность почвы в фазу восковой спелости выше, чем на контроле. В «засушнике» влажность очень низкая. Вероятно, что в полевых условиях в результате выпадения осадков и наличия гидрогеля произошло повышение влажности почвы, что привело к снижению биологической активности микроорганизмов в конце вегетации.

Обсуждение

Результаты проведенных лабораторных исследований показали, что наличие гидрогеля в верхнем корнеобитаемом слое и в слое 20–22 см, как в «засушнике», так и в полевых условиях достоверно ($p \leq 0.05$) повышало микробное дыхание в начальный период вегетации. Это отмечено у обоих типов гидрогелей, но калиевый гидрогель проявил себя лучше. Вероятно, наличие калия и возможность удерживать большее количество влаги способствовало созданию благоприятных водно-физических условий для жизнедеятельности микробиоты почвы, это было установлено ранее в наших исследованиях (Данилова, 2018). Исследованиями Дж. Пушпамалара с соавторами (Pushpamalar et al., 2018) показано, что введение в структуру гидрогелей нитрата калия (KNO_3) и нитрата аммония (NH_4NO_3), дает возможность использовать их в качестве удобрений, так как они обладают свойством медленного высвобождения микроэлементов, биоразлагаемостью и хорошей водоудерживающей способностью.

Базальное дыхание в вариантах опыта с гидрогелем значительно отличалось от контроля, статистический анализ существенных различий ($p < 0.001$) не выявил как в начале вегетации (в фазу колошения), так и в фазу восковой спелости. В вариантах с гидрогелем микроорганизмы эффективнее используют доступный углерод в полевых условиях, чем в «засушнике». Метаболический коэффициент

в вариантах с гидрогелем ниже, чем в контрольном варианте, следовательно, состояние микробного сообщества лучше. Способность водопоглощающих полимеров повышать микробное дыхание и понижать метаболический фактор, подтверждена зарубежными исследователями (Li et al., 2014, Jing et al., 2015). В исследованиях (Sojka et al., 2006) было показано, что при внесении в почву большого количества полиакриламида дополнительный N, содержащийся в полимере, может уменьшить активность бактериальной и грибковой биомассы, однако заметного влияния на метаболический потенциал микроорганизмов почвы он не оказывает. Подавляющего действия гидрогелей (натриевая и калиевая основа) на жизнедеятельность почвенных микроорганизмов в наших исследованиях также не обнаружено. К снижению биологической активности почвенных микроорганизмов может приводить избыток или недостаток влаги в почве.

Таким образом, сравнение результатов нашего исследования с исследованиями зарубежных ученых показало, что применение гидрогелей не приводит к неблагоприятным последствиям для почвенного микробного сообщества, а наличие нитрата калия или нитрата аммония повышают доступность для микроорганизмов основных субстратов, таких как NH_3 и NO_3 , что способствует увеличению почвенной микробиологической активности.

Библиографический список (References)

- Абросимова ЛН (1983) Биологическая оценка лигниновых структурообразователей. *Бюл. АФИ* 53:42–45
- Ананьева НД, Стольников ЕВ, Сусьян ЕА, Ходжаева АК (2010) Грибная и бактериальная микробная биомасса (селективное ингибирование и продуцирование CO₂ и N₂O дерново-подзолистыми почвами постагрогенных биогеоценозов). *Почвоведение* 11:1387–1393
- Банкин МП, Банкаина ТА, Коробейникова ЛП (2005) Физико-химические методы в агрохимии и биологии почв (учебное пособие). СПб.: СПбГУ. 175 с.
- Безкоровайная ИН (2001) Биологическая диагностика и индикация почв (краткий курс лекций). Красноярск: Красноярский ГАУ. 12–17
- Данилова ТН (2016) Регулирование водного режима дерново-подзолистых почв и влагообеспеченности растений при помощи водопоглощающих полимеров. *Агрофизика* 1:8–16
- Данилова ТН (2018) Влияние полимерных гелей «Ритин-10» и «В 415-К» на водообеспечение зерновых культур в условиях почвенной засухи. *Агрофизика* 1:1–9. <https://doi.org/10.25695/AGRPH.2018.01.01>
- Данилова ТН, Табынбаева ЛК (2019) Полимерные гели для управления водообеспеченностью пшеницы (*Triticum aestivum.*) в разных экологических условиях. *Сельскохозяйственная биология* 54(1):76–83. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.1.76rus>
- Данилова ТН (2020) Влияние полимерных гелей на диапазон доступной влаги дерново-подзолистой почвы. *Агрофизика* 3:17–22. <https://doi.org/10.25695/AGRPH.2020.03.03>
- Емцев ВТ, Мишустин ЕН (2005) Микробиология: учебник для вузов. М.: Дрофа. 445 с.
- Забелина ОН (2014) Оценка экологического состояния почвы городских рекреационных территорий на основании показателей биологической активности (на примере г. Владимира). *Дисс. ... к.б.н.* Владимир. 146 с.
- Заварзин ГА (2004) Лекции по природоведческой микробиологии. М.: Наука. 348 с.
- Купревич ВФ (1951) Биологическая активность почвы и методы ее определения. *Докл. АН СССР* 79:863–866
- Мостовая АС, Курганова ИН, Лопес де Гереню ВО, Хохлова ОС, Русаков АВ, Шаповалов АС (2015) Изменение микробиологической активности серых лесных почв в процессе естественного лесовосстановления. *Вестник ВГУ Серия: химия, биология, фармация* 2:64–72
- Мотузова ГВ (2007) Экологический мониторинг почв. М.: Академический проект. 237 с.
- Рижия ЕЯ, Мухина ИМ, Вертебный ВЕ, Хорак Я, Конончук ПЮ, Хомяков ЮВ (2017) Ферментативная активность и эмиссия закиси азота из дерново-подзолистой супесчаной почвы с биоуглем. *Сельскохозяйственная биология* 52(3):464–470. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.3.464rus>
- Сэги И (1983) Методы почвенной микробиологии. М.: Наука. 182 с.
- Сушко СВ, Ананьева НД, Иващенко КВ, Васенев ВИ, Саржанов ДА (2016) Микробное дыхание почвы в полевых и лабораторных условиях. *Агрофизика* 4:17–23
- Anderson J, Domsch KH (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol Biochem* 10:215–221
- Gilbert C, Peter S, Wilson Ng, Edward M, Francis M, Sylvester K, Erick B (2014) Effects of Hydrogels on Soil Moisture and Growth of *Cajanus cajan* in Semi Arid Zone of Kongelai, West Pokot County. *Open Journal of Forestry* 4(1):34–37
- Hayat R, Ali S (2004) Water absorption and its effect on soil properties and tomato yield. *Int J Agri Biol* 6(6):998–1002
- Jhurry D (1997) Agricultural polymers Food and Agricultural Research Council, Rédu it, Conf. Proc. AMAS 109–113
- Jing D, Xing S, Liu F, Ma H, Du Z (2015) Border irrigation co-applied with super absorbent polymers improving soil physical characteristics and increasing microbial activity in poplar forest. *Trans Chin Soc Agric Eng* 31(14):116–122
- Kay-Shoemake JL, Watwood ME, Lentz RD, Sojka RE (1998a) Polyacrylamide as an organic nitrogen source for soil microorganisms with potential effects on inorganic soil nitrogen in agricultural soil. *Soil Biol Biochem* 30(8/9):1045–1052
- Kay-Shoemake JL, Watwood ME, Sojka RE, Lentz RD (1998b) Polyacrylamide as a substrate for microbial amidase in culture and soil. *Soil Biol Biochem* 30(13):1647–1654
- Li X, He JZ, Hughes JM, Liu YR, Zheng YM (2014) Effects of super-absorbent polymers on a soil-wheat (*Triticum aestivum* L.) system in the field. *Appl Soil Ecol* 73:58–63 <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.08.005>
- Ma HL, Liu FC, Ma BY, Du Z, Jing D, Xing S (2016) Effects of super-absorbent polymer on the microbial community structure in rhizosphere soil and drought resistance of *platycladus orientalis* container seedlings. *Chin J Appl Environ Biol* 01:43–48
- Pushpamalar J, Langford S J, Ahmad M B, Lim YY, Hashim K (2018) Eco-friendly smart hydrogels for soil conditioning and sustain release fertilizer. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 15:2059–2074. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1598-2>
- Rabat NE, Hashimb S, Majidb RA (2016) Effect of different monomers on water retention properties of slow release fertilizer hydrogel. *Engineering* 148:201–207
- Sojka R.E., Entry J.A., Fuhrmann J.J. (2006) The influence of high application rates of polyacrylamide on microbial metabolic potential in an agricultural soil. *Appl Soil Ecol* 32(1):243–252. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2005.06.007>

Translation of Russian References

- Abrosimova LN (1983) [Biological evaluation of lignin builders]. *API Bulletin*, 53:42–45 (In Russian)
- Ananeva ND, Stolnikova EV, Susyan EA, Khodzhaeva AK (2010) [Fungal and bacterial microbial biomass (selective inhibition and production of CO₂ and N₂O by sod-podzolic soils of post-agrogenic biogeocenoses)]. *Soil Science* 11:1387–1393 (In Russian)
- Bankin MP, Bankina TA, Korobeynikova LP (2005) [Physicochemical methods in agrochemistry and soil biology. (tutorial)]. St. Petersburg: SpbSU. 175 p. (In Russian)
- Bezkorovaynaya IN (2001) [Biological diagnostics and indication of soils. (short course of lectures)]. Krasnoyarsk: Krasnoyarsk State Agrarian University. 12–17 (In Russian)

- Danilova TN (2016) [Regulation of the water regime of sod-podzolic soils and moisture supply to plants using water-absorbing polymers]. *Agrofizika* 1:8–16 (In Russian)
- Danilova TN (2018) [Influence of polymer gels «Ritin-10» and «V 415-K» on water supply of grain crops in conditions of soil drought]. *Agrofizika* 1:1–9 (In Russian) <https://doi.org/10.25695/AGRPH.2018.01.01>
- Danilova TN, Tabynbaeva LK (2019) [Polymer gels for control of water availability in wheat (*Triticum aestivum*.) In different environmental conditions]. *Agricultural Biology* 54(1):76–83 (In Russian) https://doi.org/10.153k89/agrobiology.2019.1.76_rus
- Danilova TN (2020) [The effect of polymer gels on the range of available moisture of the dend-podzolic soil]. *Agrofizika* 3:17–22 (In Russian) <https://doi.org/10.25695/AGRPH.2020.03.03>
- Emtcev VT, Mishchustin EN (2005). [Microbiology: a textbook for high schools]. Moscow: Drofa. 445 p. (In Russian)
- Zabelina ON (2014) [Assessment of the ecological state of the soil of urban recreational areas based on indicators of biological activity (for example, Vladimir)]. *PhD Thesis*. Vladimir. 146 p. (In Russian)
- Zavarzin GA (2004) [Lectures on natural microbiology]. Moscow: Nauka, 348 p. (In Russian)
- Kuprevich VF (1951) [Biological activity of the soil and methods for its determination]. *Reports of Academy of Sciences of USSR* 79:863–866 (In Russian)
- Mostovaya AS, Kurganova IN, Lopes de Gerenyu VO, Hohlova OS, Rusakov AV, SHapovalov AS (2015) [Changes in the microbiological activity of gray forest soils in the process of natural reforestation]. *Bulletin of the Voronezh State University. Series: chemistry, biology, pharmacy* 2:64–72 (In Russian)
- Motuzova GV (2007) [Ecological monitoring of soils]. M.: Academic project 237 p. (In Russian)
- Rizhiya EYa, Mukhina IM, Vertebniy VE, Horak J, Kononchuk PYu, Khomyakov YuV (2017) [Soil enzymatic activity and nitrous oxide emission from light-textured spodosol amended with biochar]. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya* 52(3):464–470 (In Russian) <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.3.464rus>
- Segi I (1983) [Methods of soil microbiology]. M.: Nauka. 182 p. (In Russian)
- Sushko SV, Ananeva ND, Ivashchenko KV, Vasenev VI, Sarzhanov DA (2016) [Microbial respiration of the soil in the field and laboratory conditions]. *Agrophysics* 4:17–23 (In Russian)

Plant Protection News, 2021, 104(2), p. 97–104

OECD+WoS: 4.01+XE (Soil Science)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2021-104-2-13961>

Full-text article

BIOLOGICAL ACTIVITY OF SOD-PODZOLIC SAND SOIL AMENDED BY HYDROGELS

T.N. Danilova, Yu.V. Khomyakov, P.Yu. Kononchuk*

Agrophysical Research Institute, Saint-Petersburg, Russia

*corresponding author, e-mail: 79117717774@yandex.ru

Biological activity of the soil is an indicator characterizing the number of organisms living in it, and quantitatively evaluating results of their activity. High biological activity is a factor in increasing soil fertility and its phytosanitary state. It is achieved by creating optimal living conditions for soil microorganisms: providing nutrients, especially organic matter, moisture, heat and soil aeration. In this paper, we assess the effect of two chemically distinct hydrogels on microbiological activity in the sod-podzolic sandy loam soil. We studied hydrogel effects on the biological activity of sod-podzolic soil in containers kept in a drought simulator and under field conditions. The experiment was conducted at Menkovsky branch of the Agrophysical Research Institute located in Gatchinsky district, Leningrad region). The drought simulator is a metal frame supporting a transparent plastic roof and surrounded by a 30–35 cm wide and 60–70 cm deep ditch for insulation from water. Plant roots were also isolated from groundwater by placing two layers of polyethylene film at a depth of two meters. The experiment tested application of 40 g/m² potassium and sodium-based hydrogels to sod-podzolic sandy loam soil. In addition, soil in all treatments received N₉₀P₉₀K₉₀. Indicators of soil biological activity were compared between the following: control soil, hydrogel introduced to a depth of 10–12 cm, and hydrogel introduced to a depth of 20–22 cm. Soil samples were then taken from the depths of 10–12 cm and 20–22 cm at the beginning and at the end of the growing season. Hydrogel applications to both soil layers created favorable conditions for the microbial activity. The chemical basis of the hydrogel did not affect activity of the microbial community.

Keywords: biological activity, basal respiration, microbial respiration, microbial biomass, hydrogel

Submitted: 05.08.2020

Accepted: 10.06.2021

ПОТЕРЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЕ *SR25* И *SR6AGI* НА ТЕРРИТОРИИ НИЖНЕГО ПОВОЛЖЬЯ

О.А. Баранова^{1*}, С.Н. Сибикеев², А.Е. Дружин², И.Д. Созина¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

²Федеральный аграрный научный центр Юго-Востока, Саратов

* ответственный за переписку, e-mail: baranova_oa@mail.ru

Пшеница – одна из важнейших продовольственных культур в России. Ржавчинные заболевания (бурая, желтая и стеблевая ржавчины) – особо опасные заболевания пшеницы, представляющие угрозу продовольственной безопасности. Стеблевая ржавчина (возбудитель – биотрофный гриб *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) наиболее вредоносна – потери урожая могут достигать 50–80% и более. В работе представлены результаты анализа устойчивости к стеблевой ржавчине 189 интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы селекции Федерального аграрного научного центра Юго-Востока и 11 возделываемых в Нижнем Поволжье сортов в вегетационные сезоны 2016–2020 гг, а также результаты фитопатологической оценки вирулентности саратовских популяций патогена 2016–2020 гг. Показано, что к саратовским популяциям *P. graminis* 2016–2020 гг. эффективны гены *Sr13*, *Sr26*, *Sr31*, *Sr35* и сочетания генов *Sr24+31*, *Sr36+31* и *Sr26+9g*. За все годы исследования не выявили изолятов, вирулентных к линии с геном *Sr31*. Анализ устойчивости сортов и линий пшеницы показал потерю эффективности гена *Sr6Agi* с 2016 года и постепенную потерю эффективности *Sr25* к 2020 году. В 2020 г. сорта – носители гена *Sr25* (Лебедушка и Добрыня), а также линии с этим геном поразились саратовской популяцией стеблевой ржавчины, как в лабораторных условиях при искусственном заражении, так и в поле на естественном инфекционном фоне. В проанализированных 189 интрогрессивных линиях были в основном идентифицированы гены *Sr25/Lr19* (77.2%) и *Sr31/Lr26* (22.2%), также гены *Sr22*, *Sr35*, *Sr28*, *Sr38/Lr37* и *Sr57/Lr34*. Выделено 50 высокоустойчивых к стеблевой ржавчине линий, несущих сочетание гена *Sr31* с *Sr25/Lr19* и *Sr6Agi*. Таким образом, показано, что ген *Sr31* эффективен против поволжских популяций *P. graminis*, а гены *Sr6Agi* и *Sr25* потеряли свою эффективность на территории Поволжья.

Ключевые слова: яровая мягкая пшеница, интрогрессивные линии, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Sr*-гены

Поступила в редакцию: 18.04.2021

Принята к печати: 09.06.2021

Введение

В последние годы наблюдается усиление вредоносности стеблевой ржавчины пшеницы (возбудитель биотрофный гриб *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. & Henn.) как на территории стран Африки и Америки, так и стран Евразийского континента, в том числе и в России. С одной стороны, сохраняется угроза проникновения на территорию Российской Федерации высоковредоносной расы возбудителя стеблевой ржавчины – Ug99 (ТТКСК), поражающей сорта с геном *Sr31*, распространенной в странах Африки и Ближнего Востока, и мигрирующей в направлении Средней и Юго-Восточной Азии (данные CIMMYT). С другой стороны, в мире появились новые агрессивные расы возбудителя стеблевой ржавчины, отличные от Ug99. Несмотря на то, что ген *Sr31* остается к ним эффективным, они вызывали жесточайшие эпифитотии, как, например, раса ТКТТФ, названная также Digalu в 2012 г в Эфиопии, потери урожая от этой расы достигали почти 100% (Olivera et al., 2017). Или раса ТТТТФ, поразившая в 2016 году огромные площади (несколько тысяч гектаров) твердой пшеницы на Сицилии (Италия). Это была крупнейшая за последние десятилетия вспышка стеблевой ржавчины в Европе. Позднее было показано, что раса ТТТТФ вирулентна к линиям с генами *Sr9e*, *Sr13* и авирулентна к генам *Sr31*, *Sr24* и *Sr25* (Bhattacharya, 2017). Также в 2016 году на территории Южной Америки в Эквадоре была выявлена

раса RRTTF, вирулентная к *Sr38* и *Sr13*, что стало реальной угрозой для производства пшеницы в Северной и Южной Америке, поскольку значительная часть современных коммерческих сортов оказалась к ней восприимчива <http://gustracker.cimmyt.org/?p=7143> (08.06.2021). В 2015, 2016 годах эпифитотийное развитие стеблевой ржавчины наблюдалось в Северном Казахстане (Койшыбаев, 2017). На территории Российской Федерации эпифитотийное развитие болезни отмечалось в 2015–2020 годах в Западной Сибири, Центральном регионе Европейской части РФ и Нижнем Поволжье (Шаманин и др., 2017). В 2016 году в Западной Сибири выявлена раса ТТТТФ, отличающаяся от сицилийской расы (по данным Global Rust Reference Center). В том же 2016 году на посевах яровой мягкой пшеницы в период колошения на всей территории Республики Татарстан отмечалось сильнейшее распространение стеблевой ржавчины. Все сорта пшеницы, рекомендованные для возделывания в Татарстане, были восприимчивы кроме образцов *Triticum dicoccum* Shuebl., а также сортов Тулайковская 5 и Белка (Василова и др., 2017). В Саратовской области, особенно в Правобережной её части, в 2016 году эпифитотия стеблевой ржавчины начиналась с молочной спелости зерна (начало июля) и продолжалась до полного созревания и уборки. Степень развития достигала 80%, поражённые сорта снизили урожай на 50% и масса

1000 зерен была на уровне 18–19 грамм (Сибикеев, неопубликованные данные).

В условиях изменения климата и ухудшения эпифитотийной ситуации остро стоит проблема низкого генетического разнообразия возделываемых сортов пшеницы, в том числе и по генам устойчивости. В результате селекции, направленной на продуктивность и качество зерна, произошло сильное обеднение генофонда пшеницы по многим признакам, в том числе и по устойчивости к фитопатогенам, и это общемировая тенденция (Wulf and Moscou, 2014). Большинство современных сортов пшеницы восприимчивы к возбудителю стеблевой ржавчины (Волкова и др., 2010; Волкова, Сияк, 2011), а устойчивые российские сорта защищены от *P. graminis* в основном генами *Sr31* и *Sr25*. На территории Поволжья в районированных российских яровых сортах мягкой пшеницы

широко распространены гены устойчивости *Sr25* и *Sr6Agi*, и селекция на введение в сорта именно этих генов ведется и в настоящее время.

С другой стороны, на фоне стремительного распространения патогена по территории России, особенно в крупнейших зернопроизводящих регионах, таких как Поволжье и Западная Сибирь, особенно остро стоит проблема потери эффективности генов устойчивости, распространенных в возделываемых отечественных сортах.

Целью нашей работы была оценка возделываемых в Нижнем Поволжье сортов, а также интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы селекции ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока» на устойчивость к стеблевой ржавчине в 2016–2020 гг, идентификация в них эффективных *Sr*-генов и анализ вирулентности саратовской популяции *P. graminis* с определением эффективных генов устойчивости.

Материалы и методы

Материалом исследования служили 189 интрогрессивных линий с чужеродным генетическим материалом селекции ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока» (НИИСХ Юго-Востока). Линии получены с участием генетического материала от *Triticum kiharae* Dorof. & Migush., *T. timopheevii* Zuk., *T. timococcum* Kost., *T. dicoccum*, *T. persicum* Vav. ex Zhuk., *Aegilops squarrosa* L., *Ae. columnaris* Zhuk., *Ae. speltoides* Tausch., *Ae. sharonensis* Eig., *Agropyron elongatum* Host., *Ag. intermedium* Host., *Secale cereale* L., австралийского сорта ярового тритикале Satu, а также сортов и линий, носителей генов *Sr22*, *Sr35* и *Sr13*. А также 11 сортов яровой мягкой пшеницы, участвующих в родословных интрогрессивных линий – Саратовская 55, Саратовская 68, Саратовская 70, Саратовская 73, Альбидум 32, Фаворит, Добрыня, Воевода и Лебедушка, селекции ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока», а также Прохоровка и Юго-Восточная 2, селекции ФГБНУ «Ершовская ОСОЗ НИИСХ Юго-Востока». Эти сорта занимают свыше 95 % площадей в Саратовской и Волгоградской областях, а также распространены в Средневолжском, Уральском и частично Центрально-чернозёмном регионах России. В ходе работы были проанализированы популяции возбудителя стеблевой ржавчины, собранные в Саратовской области (включая район г. Саратова и Лысогорский район Саратовской области). Популяции гриба были собраны с гербарного материала сильно пораженных стеблевой ржавчиной восприимчивых сортов пшеницы. Пораженные стеблевой ржавчиной образцы пшеницы собирались рандомизированно, согласно принятым методикам (Койшыбаев, Муминджанов, 2016). Популяции *P. graminis* с гербарных образцов были размножены на универсально-восприимчивом сорте пшеницы Хакасская по принятым методикам (Generalized Protocol, 08.06.2021).

Вегетационные условия в годы исследования были контрастные по осадкам, если 2016 и 2017 гг оценивались как благоприятные, то 2018 и 2019 – как острозасушливые. В 2016 г и 2017 г наблюдали эпифитотийное развитие стеблевой ржавчины, в 2018 г и 2019 гг стеблевая ржавчина наблюдалась на позднеспелых образцах яровой мягкой пшеницы или при позднем посеве. Вегетационный сезон 2020 года разделился по погодным условиям на два периода: достаточная влажность и умеренная температура от начала вегетации до цветения (апрель – середина июня) и острозасушливый с повышенной температурой воздуха с

начала налива зерна до уборки. В этот год наблюдали эпифитотийное развитие стеблевой ржавчины.

Фитопатологическую оценку проводили по стандартной лабораторной методике на проростках (Jin et al., 2007; Generalized Protocol, 08.06.2021) в условиях контролируемой температуры и влажности. Для анализа ювенильной устойчивости использовали саратовскую популяцию патогена. Реакцию проростков на инокуляцию суспензией спор возбудителя стеблевой ржавчины проводили на 12 сутки по стандартной по 4-х балльной шкале Stakman and Levine (1962). Об устойчивости/восприимчивости образца судили на основании типов реакции в двух повторностях. Устойчивыми считали растения с типами реакции «0», «0;», «1», «2» восприимчивыми – «3», «4», «X». В качестве критериев оценки устойчивости взрослых растений в полевых условиях (естественный фон) служили тип реакции и степень поражения растений по шкале, рекомендуемой СИММИТ (Roelfs, Singh, 1992): R – устойчивость к заражению; MR – средняя устойчивость; MS – средняя восприимчивость; S – восприимчивая реакция.

Анализ вирулентности *P. graminis* f. sp. *tritici* был проведен на наборе из 20 дифференциаторов (North American differential set: *Sr5*, *Sr21*, *Sr9e*, *Sr7b*, *Sr11*, *Sr6*, *Sr8a*, *Sr9g*, *Sr36*, *Sr9b*, *Sr30*, *Sr17*, *Sr9a*, *Sr9b*, *Sr10*, *SrTmp*, *Sr24*, *Sr31*, *Sr38*, *SrMcN*) и добавочных линиях с *Sr* генами: *Sr2compl*, *Sr8b*, *Sr11*, *Sr12*, *Sr13*, *Sr15*, *Sr17+13*, *Sr20*, *Sr22*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr27*, *Sr28*, *Sr29*, *Sr32*, *Sr33+5*, *Sr33*, *Sr35*, *Sr36*, *Sr37*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr44*, *SrDb*, *Sr WLD*, *SrWLD-1*, *Sr24+31*, *Sr36+31*, *Sr24+31*, *Sr31+36*, *Sr24+36*, *Sr2+23*, *Sr7a+12*, *Sr7b+18*, *Sr26+9g*. сорта Аврора (*Sr31*) и Хакасская (восприимчивый контроль).

ДНК выделяли из пятидневных проростков пшеницы методом с использованием цетилтриметиламмонийбромидом (СТАВ) (Murray, Thompson, 1980). Для идентификации генов устойчивости использовали молекулярные маркеры, рекомендованные для маркер-ориентированной селекции (MAS): маркер *csSr2* для гена *Sr2* (Mago et al., 2011); *Gb* для *Sr25/Lr19* (Ayala-Navarrete et al., 2007); *Sr26#43* для *Sr26* (Mago et al., 2005); *scm9* для *Sr31/Lr26* (Weng et al., 2007); *csSr32#1* и *csSr32#2* для гена *Sr32* (Mago et al., 2013); *Xcfa2071* и *XBF485004* для *Sr35* (Zhang et al., 2010); *Xcmwg682* для *Sr38* (Helguera et al., 2003); *Xwmc477i* и *Xstm773-2* для *Sr36* (Tsilo et al., 2008);

wPt-7004-PCR и Xwmc332 для *Sr28* (Rouse et al., 2012); csLV34 для *Sr57/Lr34* (Lagudah et al., 2006). Амплификацию проводили на термоциклере C1000 Thermal Cycler (BioRad), разделение продуктов амплификации проводили в 2% агарозных гелях, окрашенных бромистым этидием. Позитивным контролем служили изогенные линии и сорта с известными *Sr*-генами, негативным контролем

– восприимчивый сорт Хакасская, контролем на контаминацию – ПЦП смесь без добавления ДНК. В качестве маркера молекулярного веса использовали GeneRuler™ 50bp DNA Ladder («Fementas»). Визуализацию продуктов амплификации проводили с помощью геледокументирующей системы ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad). ПЦП ставили в 2-х повторностях.

Результаты

Анализ вирулентности саратовских популяций *P. graminis* 2016–2020 гг

Были проанализированы популяции возбудителя стеблевой ржавчины, собранные в Саратовской области (включая Лысогорский район Саратовской области) в

2016–2020 гг по признаку вирулентности в лабораторных условиях на наборе 20 линий-дифференциаторов (North American differential set) и добавочных *Sr* линиях (26 линий). Данные оценки популяций патогена на стадии проростков представлены в таблице 1.

Таблица 1. Устойчивость *Sr* линий к популяциям *P. graminis* f. sp. *tritici* 2016–2019 гг
Table 1. Resistance of *Sr* lines to different populations of *P. graminis* f. sp. *tritici* in 2016–2019

Линии с <i>Sr</i> геном Lines containing <i>Sr</i> gene	Устойчивость (тип реакции) / Resistance (reaction type)						
	Популяции патогена, собранные в Лысогорском районе Саратовской области Pathogen populations collected in Lysogorsk region of Saratov oblast			Саратовская область Saratov Oblast		Лысогорский район Саратовской области с сорта Фаворит Lysogorsk region of Saratov oblast on variety 'Favorit'	
	2016 г	2017 г	С сорта Белянка 2017 г	2017 г	2020 г	2018 г	2019 г
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Sr5</i>	3	3	4	3	3	3-	3
<i>Sr6</i>	3	3	4	3	3	3	4
<i>Sr7b</i>	3+	3	3	3	3	3+	3
<i>Sr8a</i>	3	3	4	3	3	3	3
<i>Sr8b</i>	3	3	3	3	3	4	3
<i>Sr9a</i>	3	4	3	3	3	4	4
<i>Sr9b</i>	3	3	3	3	3	3	3
<i>Sr9d</i>	3	4	3	3	3	4	4
<i>Sr9e</i>	3	3	3	3	3	4	4
<i>Sr9g</i>	3-	3	3	3	3	3	3
<i>Sr10</i>	3	4	4	3	3	4	3
<i>Sr11</i>	3	3	4	3	3	4	4
<i>Sr12</i>	3+	3	3	3	3	3	4
<i>Sr13</i>	2	1	2	2-	1	2	2
<i>Sr15</i>	2,2+,3	3	4	3	4	4	4
<i>Sr17</i>	2	1,3	3	1,0;	3	3	10;3
<i>Sr20</i>	3-	3	3	3	4	3	3-
<i>Sr21</i>	2+,3	2+,3	4	2,3	3	3	3
<i>Sr22</i>	3	3	3	3	3	4	4
<i>Sr24*</i>	1;	1-2.	1	1	0;	1-2.	0;
<i>Sr25</i>	2,3	3	2+,3-	2	4	1,3-	1,3-
<i>Sr26</i>	1;	1+	1;	1		1-	1
<i>Sr27</i>	3	3	3	3	4	3	4
<i>Sr28</i>	3	3	4	3	4	4	4
<i>Sr29</i>	3	1,3	3	1,3	4	3	4
<i>Sr30</i>	3+	4	4	3	3	3+	3
<i>Sr31</i>	1;	1;	1;	1;	0;1	1	0;1
<i>Sr32</i>	2	1	2+	1	3	2+	4
<i>Sr33</i>	1	-	-	-	4	3	4
<i>Sr35</i>	2	1-2	2	1-2	1	1-2	2
<i>Sr36</i>	1,3	3	3-	2+	3	4	4
<i>Sr37</i>	3	3	4	3	3	3	3-
<i>Sr38</i>	3	3	4	3	3	3+	4
<i>Sr39</i>	3	4	4	3	3	4	4
<i>Sr40</i>	3	3	2	4	3	4	4
<i>Sr44</i>	3	3	3	4	4	4	4
<i>SrWld</i>	3	-	4	-	-	3	-
<i>SrTmp</i>	3	3	3	3	3	3	3
<i>Sr NcM</i>	3	3	3	3	3	3	4
<i>Sr24+31</i>	1	1	1	1	1	1	1

Продолжение таблицы 1 / Table 1 continued

1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Sr36+31</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>Sr24+36</i>	1	0;	0;	1;	1	1	1
<i>Sr26+9g</i>	1	1	1	1	1	2+	2
<i>Sr7a+12</i>	3	3	4	-	3	3-	3
<i>Sr7b+18</i>	3-	-	-	-	4	3	4
<i>Sr17+13</i>	3,2+,1	0	2-	0;	3	4	4

□ – устойчивость; «*» – при анализе расового состава были выделены изоляты, вирулентные к линии с геном *Sr24*
 □ – resistance; «*» – analyses of race composition revealed isolates virulent to the line containing gene *Sr24*

Из результатов многолетнего анализа можно заключить, что гены *Sr13*, *Sr26*, *Sr31*, *Sr35* и сочетания генов – *Sr24+31*, *Sr36+31* и *Sr26+9g* пока сохраняют свою эффективность к саратовским популяциям возбудителя стеблевой ржавчины. Однако из этих генов только *Sr31* распространен в российских возделываемых сортах пшеницы, и надо подчеркнуть, что местные патотипы гриба, вирулентные к нему, пока не выявлены. Что касается гена *Sr25*, то, как видно из таблицы 1, во все годы изучения

из популяций гриба выделялись изоляты, вирулентные к линии с *Sr25*. Исключение составила только популяция из саратовской области 2017 года. Линии с геном *Sr6Agi* в нашем наборе *Sr*-линий не было, однако тот факт, что, начиная с 2016 года, наблюдали сильное поражение стеблевой ржавчиной сортов Фаворит (*Sr6Agi*), Воевода (*Sr6Agi*) и Белянка (*Sr6Agi*), говорит о потере эффективности данного гена на территории Поволжья.

Идентификация генов устойчивости

В 11 сортах и 189 интрогрессивных линиях с использованием молекулярных маркеров были идентифицированы гены устойчивости к стеблевой ржавчине. В сортах Прохоровка и Юго-Восточная 2 – *Sr31*, в сортах Добрыня и Лебедушка – *Sr25*.

Всего было проанализировано 189 интрогрессивных линий. В проанализированных интрогрессивных линиях с использованием молекулярных маркеров в основном

были идентифицированы гены *Sr25/Lr19* (77.2%) и *Sr31/Lr26* (22.2%) (рис.1 и рис.2).

Кроме того, в некоторых линиях были идентифицированы такие гены, как *Sr22*, *Sr35*, *Sr28*, *Sr38/Lr37* и *Sr57/Lr34*. Гены *Sr2*, *Sr13*, *Sr24*, *Sr26*, *Sr32*, *Sr36* в анализируемых линиях обнаружены не были. Количество линий с идентифицированными *Sr*-генами представлено на рисунке 3.

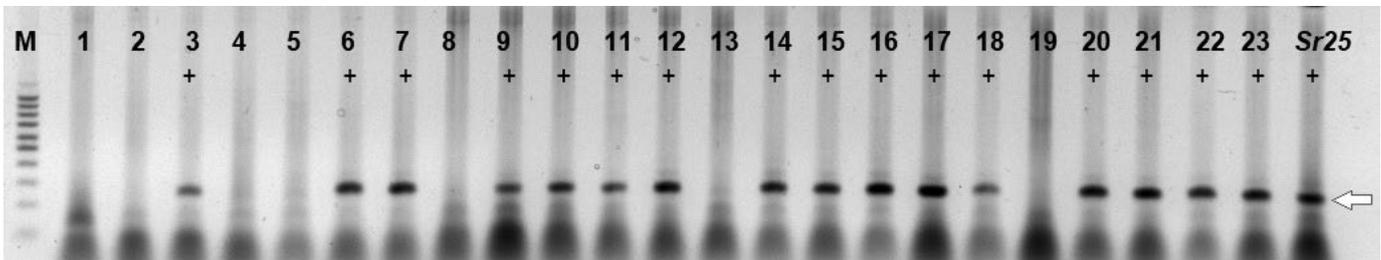


Рисунок 1. Идентификация гена *Sr25* с использованием молекулярного маркера *Gb*.

М – маркер молекулярного веса 50 bp «Fermentas», *Sr25* – положительный контроль (линия LC-SR25-ARS).

Стрелкой указан диагностический фрагмент с молекулярным весом 130 п.о. Продукты амплификации разделяли в 2% агарозном геле. «+» – наличие диагностического фрагмента – 130 п.о.

Figure 1. Identification of the *Sr25* gene using molecular marker *Gb*. M – 50 bp Fermentas molecular weight marker, *Sr25* is a positive control (LC-SR25-ARS line). Arrow indicates a diagnostic fragment with a molecular weight of 130 bp. Amplification products were separated in a 2% agarose gel. «+» – presence of diagnostic fragment – 130 bp

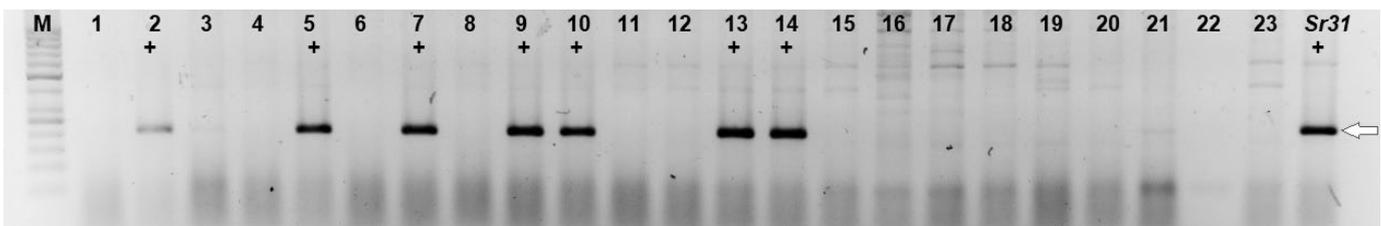


Рисунок 2. Идентификация гена *Sr31* с использованием молекулярного маркера *Scm9*.

М – маркер молекулярного веса 50 bp «Fermentas», *Sr31* – положительный контроль (сорт Аврора). Стрелкой указан диагностический фрагмент с молекулярным весом 207 п.о. Продукты амплификации разделяли в 2% агарозном геле.

«+» – наличие диагностического фрагмента – 207 п.о.

Figure 2. Identification of the *Sr31* gene using the molecular marker *Scm9*. M – 50 bp Fermentas molecular weight marker, *Sr31* – positive control (variety Aurora). The arrow indicates a diagnostic fragment with a molecular weight of 207 bp. The amplification products were separated in a 2% agarose gel. «+» – presence of diagnostic fragment – 207 bp



Рисунок 3. Результаты идентификации *Sr*-генов устойчивости в интрогрессивных линиях яровой мягкой пшеницы

Figure 3. Results of identification of *Sr*-genes in introgression lines of spring bread wheat

Всего были идентифицированы следующие сочетания генов устойчивости – сочетание генов *Sr31/Lr26+Sr25/Lr19* было идентифицировано у 38 линий (20.1%). У трех

Анализ устойчивости сортов и линий яровой мягкой пшеницы к стеблевой ржавчине

В настоящей статье мы представляем обобщенные результаты оценки устойчивости сортов и селекционного материала к саратовским популяциям *P. graminis* в вегетационные сезоны 2016–2020 гг.

Степень развития болезни в 2016 году на сортах Фаворит и Воевода достигала 80%, что привело к значимым потерям урожая (Сибикеев, не опубликованные данные). Из 11 взятых в анализ сортов, сорта Саратовская 55, Саратовская 68, Саратовская 70, Саратовская 73, Альбидум 32, были восприимчивы в поле к саратовской популяции возбудителя стеблевой ржавчины в 2016–2020 гг (табл. 2). Сорта Фаворит (*Sr6Agi*) и Воевода (*Sr6Agi*) были гетерогенны в 2019 г и восприимчивы в 2016, 2017, 2018 и 2020 годах. Сорт Добрыня (*Sr25*) был гетерогенен по устойчивости в 2016, 2017 годах, в 2018 и 2019 году был устойчив в поле, а в 2020 году – восприимчив. Сорт Лебедушка (*Sr25+Sr6Agi*) был восприимчив в 2016 году, в 2017 и 2019 – гетерогенен по устойчивости и в 2020 – восприимчив.

линий идентифицировано сочетание генов *Sr38/Lr37+Sr25/Lr19*; у восьми линий идентифицировано сочетание генов *Sr25+Sr28*; у одной линии – *Sr31/Lr26+Sr28+Sr38/Lr37*; у одной линии – *Sr31/Lr26+Sr25/Lr19+Sr28*; у одной линии – гена *Sr25/Lr19* с геном возрастной устойчивости *Sr57/Lr34*. Сочетание генов *Sr25/Lr19+Sr35* было идентифицировано в двух линиях, *Sr22+Sr25/Lr19* – у двух линий. Эти линии были устойчивы к стеблевой ржавчине, что делает их перспективными для дальнейшего использования в селекции. Однако в настоящей статье мы не останавливаемся на анализе линий с генами *Sr22* и *Sr35*, так как это материал для отдельной статьи (Сибикеев и др., в печати).

По результатам лабораторной и полевой оценки устойчивости из 189 линий за все годы исследования выделено 50 интрогрессивных линий, высокоустойчивых к стеблевой ржавчине. Устойчивые линии несут в основном комбинации генов *Sr31/Lr26+Sr25/Lr19* и *Sr31/Lr26+Sr6Agi/Lr6Agi*. Как видно это сочетания гена *Sr31* с генами *Sr25* и *Sr6Agi*.

Сорта Прохоровка и Юго-Восточная 2 были гетерогенны по устойчивости в 2016 г, устойчивы в 2017–2019 гг и в 2020 году сорт Прохоровка был гетерогенен по устойчивости, а сорт Юго-Восточная 2 устойчив. В процессе нашего исследования в сортах Прохоровка и Юго-Восточная 2 был идентифицирован ген *Sr31*. Однако при оценке устойчивости к саратовской популяции патогена в этих сортах были выявлены восприимчивые растения (таблица 2).

Возник вопрос о возможном появлении в саратовской популяции патогена патотипов гриба, вирулентных к сортам и линиям с геном *Sr31*. Для подтверждения отсутствия у восприимчивых растений транслокации 1BL.1RS (несущей *Sr31*) была выделена ДНК из 10 индивидуальных зерен пораженного растения сорта Прохоровка и поставлена ПЦР со специфичными праймерами на маркер scm9, выявляющий ржаную транслокацию 1BL.1RS. Диагностический фрагмент 207 п.о. был получен только у контрольного сорта Аврора (носителя *Sr31*), что означает

Таблица 2. Результаты фитопатологического анализа устойчивости и идентификации *Sr*-генов (сорта)

Table 2. Results of phytopathological analysis of resistance and identification of *Sr*-genes (varieties)

Сорта Varieties	Устойчивость к стеблевой ржавчине (полевая оценка) Resistance to stem rust (field estimate) Саратовская популяция <i>P. graminis</i> Saratov population of <i>P. graminis</i>					Идентифицированные <i>Sr</i> гены Identified <i>Sr</i> genes
	2016	2017	2018*	2019*	2020	
	Саратовская 55	S	S	S	S	
Саратовская 68	S	S	S	S	S	-
Саратовская 70	S	S	S	S	S	-
Саратовская 73	S	S	R,S	S	S	-
Альбидум 32	S	S	S	S	S	-
Прохоровка	R/S	R;	R	R	R/S	<i>Sr31/Lr26</i>
Юго-Восточная 2	R/S	R;	R	R	R/MR ⁺	<i>Sr31/Lr26</i>
Добрыня	MR/S	MR,S	R	R	S	<i>Sr25/Lr19</i>
Фаворит	S	S	S	R/S	S	<i>Sr6Agi</i> *
Воевода	S	S	S	R/S	S	<i>Sr6Agi</i> *
Лебедушка	S	MR/S	R/S	R/S	S	<i>Sr25 +Sr6Agi</i> *

*– по данным Сибикеева с соавторами (Sibikeev et al.,2017);

R – устойчивый; MR – среднеустойчивый; S – восприимчивый.

*– according to Sibikeev et al.(2017); R – resistant; MR – moderately resistant; S – susceptible.

отсутствие в данном растении гена *Sr31*. Полученные результаты предполагают гетерогенность сорта и потерю транслокации 1RS.1BL. Таким образом, было подтверждено, что ген *Sr31* пока сохраняет свою эффективность.

Результаты полевой оценки взятых в анализ интрогрессивных линий в сезоны 2016–2019 гг характеризуют линии как высокоустойчивые к саратовским популяциям *P. graminis*. Однако результаты оценки на устойчивость к стеблевой ржавчине в вегетационном сезоне 2020 года

резко отличалась. Из 158 линий устойчивых к *P. graminis* во время эпифитотии 2016 года, в 2020 году были устойчивы 65 линий (41.1%). Мы считаем, что это произошло за счёт потери эффективности гена *Lr19/Sr25* (восприимчивые линии были защищены только этим геном либо сочетанием *Lr19/Sr25+Sr6Agi*), что подтверждается как результатами анализа вирулентности популяций *P. graminis*, так и поражением стеблевой ржавчиной сортов – носителей данного гена – Добрыни и Лебедушки.

Обсуждение

В лаборатории генетики и цитологии ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока» на основе использования набора оригинальных устойчивых к патогенам интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы (Сибикеев и др., 2012; Sibikeev, Druzhin 2016; Sibikeev et al., 2016), были получены устойчивые к комплексу патогенов сорта яровой мягкой пшеницы – Белянка, Фаворит, Воевода, с замещением хромосомой пырея промежуточного пшеничной хромосомы 6(D)6Agi и сорт Лебедушка (комбинация замещения 6(D)6Agi и 7DS-7DL-7Ae#1L – транслокации от пырея удлинённого с генами *Sr25/Lr19*).

В Нижнем Поволжье в основном доминируют 23 сорта яровой мягкой пшеницы селекции ФГБНУ «ФАНЦ Юго-Востока», из внесенных в Госреестр по состоянию на 2020 г 25-ти сортов (Государственный реестр селекционных достижений, 2020). По данным Министерства сельского хозяйства Саратовской области в Саратовской области посевная площадь под яровой пшеницей составляет 205583 га, из которых большая часть занята сортами: Саратовская 55 – 8865 га, Саратовская 68 – 7017 га, Саратовская 70 – 10550 га, Саратовская 73 – 6872 га, Альбидум 32 – 10016 га, Фаворит – 18776 га, Прохоровка – 107 га, Юго-Восточная 2 – 155 га, Добрыня – 15286 га, Воевода – 15567 га и Лебедушка – 940 га. Как показывают наши исследования, на сегодняшний день к стеблевой ржавчине из них устойчивы только Прохоровка и Юго-Восточная 2, носители гена *Sr31*.

Поражение стеблевой ржавчиной сортов Фаворит и Воевода во время эпифитотии 2016 года и в последующие годы до настоящего времени, к большому сожалению, показывает потерю эффективности гена *Sr6Agi* для Поволжья. Другой, широко распространенный в яровых

отечественных сортах ген устойчивости к стеблевой ржавчине – *Sr25*.

Ген *Sr25* сцеплен с геном устойчивости к бурой ржавчине *Lr19*. Эта транслокация интродуцирована в мягкую пшеницу от *Agropyron elongatum* (Host) *Beauvois* и может быть локализована в хромосомах 7DL или 7AL. Ген *Sr25* относился до настоящего момента к высокоэффективным генам. Он обеспечивает устойчивость пшеницы к расе *Ug99* и широко используется в селекционных программах (Волуевич, 2013). Среди российских сортов гены *Sr25/Lr19* распространены в сортах пшеницы, выращиваемых в Поволжье, на Урале и в Западной Сибири (Гуляева, 2012; Гуляева и др., 2019). Причем в Западной Сибири *Sr25* и на сегодняшний день представляет интерес для практической селекции (Кельбин и др., 2020).

Однако за рубежом были показаны случаи выявления в популяциях *P. graminis* изолятов, вирулентных к *Sr25*, например, в Индии (Jain et al., 2009), также было показано, что в Эфиопии раса ТКТТФ была вирулентна к линиям с геном *Sr25* (Patroug et al., 2017).

Появление вирулентных к *Sr25* изолятов гриба мы наблюдали при фитопатологическом анализе саратовских популяций возбудителя стеблевой ржавчины с 2016 по 2020 гг. Также была отмечена потеря устойчивости линий с этим геном в лабораторных условиях (Baranova et al., 2019). Анализ полевой устойчивости сортов особенно в вегетационный сезон 2020 г окончательно показал потерю эффективности на территории Поволжья генов устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr6Agi* и *Sr25*, что также подтверждается данными по потере устойчивости сортов пшеницы с этими генами при эпифитотии стеблевой ржавчины в Татарстане в 2016 году (Василова, 2017).

Заключение

Таким образом, показано, что устойчивость пшеницы к популяциям *P. graminis* 2016–2020 гг способны обеспечить гены *Sr13*, *Sr26*, *Sr31*, *Sr35* и сочетания генов *Sr24+31*, *Sr36+31* и *Sr26+9g*. По результатам оценки устойчивости из 189 интрогрессивных селекционных линий выделено 50 высокоустойчивых к стеблевой ржавчине. Устойчивые линии несут в основном комбинации гена *Sr31/Lr26* с *Sr25/Lr19* и *Sr6Agi/Lr6Agi*. Ген *Sr31* сохраняет эффективность

против местных популяций *P. graminis*, однако показана потеря эффективности на территории Поволжья как гена от пырея промежуточного *Sr6Agi* так и гена *Sr25*. В связи с этим рекомендуем использовать в селекции на иммунитет к поволжским популяциям стеблевой ржавчины такие эффективные гены как *Sr13*, *Sr26* и *Sr35* в сочетании с геном *Sr31* и эффективными генами устойчивости взрослых растений, такими как *Sr2*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-016-00170 а.

Библиографический список (References)

Василова Н.З., Асхадуллин Д.Ф., Асхадуллин Д.Ф. (2017) Эпифитотия стеблевой ржавчины на яровой пшенице в Татарстане. *Защита и карантин растений* 2:27–28.
Волкова Г.В., Синяк Е.В. (2011) Эффективные гены устойчивости пшеницы к возбудителю стеблевой ржавчины

пшеницы на юге России. *Наука Кубани* 2:34–36.
Волкова Г.В., Синяк Е.В., Балапанов И.М. (2010) Стеблевая ржавчина пшеницы на Северном Кавказе: распространение, внутривидовая структура и изменчивость по вирулентности. *Наука Кубани* 2:38–41.

- Волуевич Е.А. (2013) Генетические подходы в селекции мягкой пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине. *Молекулярная и прикладная генетика* 16:72–81.
- Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию (2020) «Сорта растений» (1). Москва: Росинформагротех. 680с.
- Гулятьева Е.И., Шайдаюк Е.Л., Рсалиев А.С. (2019) Идентификация генов устойчивости к бурой ржавчине у образцов яровой мягкой пшеницы российской и казахстанской селекции. *Вестник защиты растений* 3(101):41–49. [http://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-3\(101\)-41-49](http://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-3(101)-41-49)
- Гулятьева Е.И. (2012) Методы идентификации генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине с использованием ДНК-маркеров и характеристика эффективности Lr-генов. Санкт-Петербург: ВИЗР. 72 с.
- Кельбин В.Н., Сколотнева Е.С., Салина Е.А. (2020) Возможности и перспективы формирования генетической защиты мягкой пшеницы от стеблевой ржавчины в Западной Сибири. *Вавиловский журнал генетики и селекции* 24(8):821–828. <http://doi.org/10.18699/VJ20.679>
- Койшыбаев М., Муминджанов Х (2016) Методические указания по мониторингу болезней, вредителей и сорных растений на посевах зерновых культур. Анкара: Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций: 28с.
- Койшыбаев М. (2017) Особенности развития ржавчины и септориоза на яровой пшенице в северном казахстане. *Защита и карантин растений* 11:21–24.
- Сибикеев С.Н., Дружин А.Е., Крупнов В.А. (2012) Увеличение генетического разнообразия саратовских пшениц методом интрогрессивной селекции как развитие идей Н.И. Вавилова. *Вестник Саратовского государственного университета им. Н.И. Вавилова* 10:33–37.
- Ayala-Navarrete L., Bariana H.S., Singh R.P., Gibson J.M. et al. (2007) Trigenomic chromosomes by recombination of *Thinopyrum intermedium* and *Th. ponticum* translocations in wheat. *Theor Appl Genet* 116:63–75. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0647-5>
- Baranova O.A., Sibikeev S.N., Druzhin A.E. (2019) Molecular identification of the stem rust resistance genes in the introgression lines of spring bread wheat. *Vavilov Genet and Breeding J* 23(3):296–303. <https://doi.org/10.18699/VJ19.494>
- Bhattacharya S. (2017) Deadly new wheat disease threatens Europe's crops. *Nature* 542(7640):145–146. <https://doi.org/10.1038/nature.2017.21424>.
- Helguera M., Khan I.A., Kolmer J., Lijavetzky D. et al. (2003) PCR assays for the Lr37-Yr17-Sr38 cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. *Crop Sci* 43:1839–1847
- Jain S.K., Prashar M., Bhardwaj S.C., Singh S.B., Sharma Y.P. (2009) Emergence of Virulence to *Sr25* of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* on Wheat in India. *Plant Dis* <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-8-0840B>
- Jin Y., Singh R.P., Ward R.W., Wanyera R. et al. (2007) Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis* 91:1096–1099
- Jin Y., Singh R.P., Ward R.W., Wanyera R., Kinyua M., Njau P., Fetch T., Pretorius Z.A. and Yahyaoui A. (2007) Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Dis* 91:1096–1099
- Lagudah E.S., McFadden H., Singh R.P., Huerta-Espino J. et al. (2006) Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. *Theor Appl Genet* 114:21–30
- Mago R., Bariana H.S., Dundas I.S., Spielmeier W. et al. (2005) Development of PCR markers for the selection on wheat stem rust resistance genes *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm. *Theor Appl Genet* 111:496–504. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-2039-z>
- Mago R, Simkova H, Brown-Guedira G, Dreisigacker S, et al. (2011) An accurate DNA marker assay for stem rust resistance gene *Sr2* in wheat. *Theor Appl Genet* 122:735–744. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1482-7>
- Mago R, Verlin D, Zhang P, Bansal U et al. (2013) Development of wheat–*Aegilops speltoides* recombinants and simple PCR-based markers for *Sr32* and a new stem rust resistance gene on the 2S#1 chromosome. *Theor Appl Genet* 126:2943–2955. <https://doi.org/10.1007/s00122-013-2184-8>
- Murray M.G., Thompson W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*:4321–4325.
- Olivera P., Newcomb M., Flath K., Sommerfeldt N. et al. (2017) Characterization of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* isolates derived from an unusual wheat stem rust outbreak in Germany in 2013. British Society for Plant Pathology. <https://doi.org/10.1111/ppa.12674>
- Roelfs A.P., Singh R.P. (1992) Rust diseases of wheat concepts and methods of management. Mexico: CIMMIT.
- Rouse M.N., Nava I.C., Chao S., Anderson J.A. et al. (2012) Identification of markers linked to the race Ug99 effective stem rust resistance gene *Sr28* in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 125:877–885. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1879-6>
- Sibikeev S.N., Druzhin A.E. (2016) Prebreeding research of near-isogenic lines of spring bread wheat with a combination of translocations from *Agropyron elongatum* (host.) P.b. and *Aegilops ventricosa* tausch. *Russian Genet J: Applied Res* 3:338–343. <https://doi.org/10.1134/S2079059716030126>
- Sibikeev S.N., Voronina S.A., Druzhin A.E., Badaeva E.D. (2016) Study of resistance to leaf and stem rust in *Triticum aestivum* – *Aegilops speltoides* lines. *Russian Genet J: Applied Res* 6(4):351–356. <https://doi.org/10.1134/S2079059716040183>
- Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Vlasovec L.T., Golubeva T.D. et al. (2017) The reaction of introgression lines of spring bread wheat to leaf rust, stem rust and tan spot in 2016. *Annual W News/KSU USA* 63:57–58.
- Stakman E.C., Stewart D.M., Loegering W.Q. (1962) Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. United States Department of Agriculture – Agricultural Research Service E-617 (rev).
- Tsilo T.J., Jin Y., Anderson J.A. (2008) Diagnostic microsatellite markers for detection of stem rust resistance gene *Sr36* in diverse genetic backgrounds of wheat. *Crop Sci* 48:253–261. <https://doi.org/10.2135/cropsci2007.04.0204>
- Weng Y, Azhaguvel P, Devkota R.N., Rudd J.C. (2007) PCR-based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat–rye translocations in wheat background. *Plant Breed* 126:482–486. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01331.x>

- Wulf B.B.H. and Moscou J.M. (2014) Strategies for transferring resistance into wheat: from wide crosses to GM cassettes. *Front Plant Sci* 5:692. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00692>
- Zhang W, Olson E, Saintenac C, Rouse M et al (2010) Genetic maps of stem rust resistance gene *Sr35* in diploid and hexaploid wheat. *Crop Sci* 50:2464–2474. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.04.0202Trans>
- Generalized Protocol for Race Analysis – Seedling Assays. http://www.fao.org/fileadmin/templates/rust/img/race_analysis_web.pdf (08.06.2021)

Translation of Russian References

- Gulyaeva E.I. (2012) Methods of identification of wheat resistance genes to leaf rust using DNA-markers and characterization of *Lr*-gene efficiency. Saint-Petersburg: VIZR: 72 p. (In Russian)
- Gulyaeva E.I., Shaydayuk E.L., Rsaliev A.S. (2019) Identification of leaf rust resistance genes in spring soft wheat samples developed in Russia and Kazakhstan. *Plant Protection News* (3):41–49 (In Russian) [https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-3\(101\)-41-49](https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-3(101)-41-49)
- Kelbin V.N., Skolotneva E.S., Salina E.A. (2020) Challenges and prospects for developing genetic resistance in common wheat against stem rust in Western Siberia. *Vavilov Genet and Breeding J* 24(8):821–828 (In Russian) <https://doi.org/10.18699/VJ20.679>
- Koishybaev M., Muminjanov H. (2016) Methodological guidelines for monitoring diseases, pests and weeds in cereal crops. Ankara: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 28p.
- Koishybayev M. (2017) Features of the development of rust and Septoria leaf spot on spring wheat in Northern Kazakhstan. *Zashchita i karantin rasteniy* 11:21–24 (In Russian)
- State Register of Breeding Achievements Approved for Use (2020) Plant Varieties. Moscow: FGBNU Rosinformagrotech (1): 680 p. (In Russian)
- Vasilova N.Z., Askhadullin D.F., Askhadullin D.F. (2017) Stem rust epiphytotic on soft spring wheat in Tatarstan. *Zashchita i karantin rasteniy* 2:27–28 (In Russian)
- Volkova G.V., Sinyak E.V. (2011) Effective genes of wheat resistance to the causative agent of wheat stem rust in the south of Russia. *Nauka Kubani* 2:34–36. (In Russian)
- Volkova G.V., Sinyak E.V., Balapanov I.M. (2010) Stem rust of wheat in the North Caucasus: distribution, intrapopulation structure and virulence variability. *Nauka Kubani* 2:38–41. (In Russian)
- Volujevich E.A. (2013) Genetic approaches in breeding soft wheat for resistance to stem rust. *Molec and Appl Genet* 16:72–81 (In Russian)

Plant Protection News, 2021, 104(2), p. 105–112

OECD+WoS: 4.01+AM (Agronomy)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2021-104-2-14994>

Full-text article

LOSS OF EFFECTIVENESS OF STEM RUST RESISTANCE GENES *SR25* AND *SR6AGI* IN THE LOWER VOLGA REGION

O.A. Baranova^{1*}, S.N. Sibikeev², A.E. Druzhin², I.D. Sozina¹

¹All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

²Federal Center of Agriculture Research of the South-East Region, Saratov, Russia

*corresponding author, e-mail: baranova_oa@mail.ru

Wheat is one of the most important food crops in Russia. Rust diseases (leaf, yellow and stem rusts) are particularly dangerous diseases of wheat that threaten food security. The stem rust, caused by a biotrophic fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* is the most dangerous, as crop losses reach 50 to 80% or more. The paper presents results of the analysis of resistance to stem rust in 189 introgressive lines of spring soft wheat selected at the Federal Agrarian Scientific Center of South East and in 11 varieties cultivated in the Lower Volga region during the growing seasons of 2016–20. The results of phytopathological assessment of virulence of the Saratov pathogen population in 2016–2020 are also given. It is shown that *Sr13*, *Sr26*, *Sr31*, *Sr35* and combinations of *Sr24+31*, *Sr36+31* and *Sr26+9g* genes cause wheat resistance to Saratov populations of *P. graminis* 2016–2020. No isolates virulent to the line with the *Sr31* gene were identified during the research period. Analysis of resistance in wheat varieties and lines showed a loss of *Sr6Agi* gene efficacy beginning 2016 and a gradual loss of *Sr25* efficacy by 2020. In 2020, varieties carrying the *Sr25* gene (Lebedushka and Dobrynya) and lines with this gene affected the Saratov population of stem rust both under laboratory conditions using experimental infection and under field conditions using the natural infection background. In the analyzed 189 introgressed lines, *Sr25/Lr19* (77.2%) and *Sr31/Lr26* (22.2%) were the main identified genes, although *Sr22*, *Sr35*, *Sr28*, *Sr38/Lr37* and *Sr57/Lr34* genes were also found. Fifty lines carrying the combination of *Sr31* with *Sr25/Lr19* and *Sr6Agi* were identified as highly resistant to the stem rust. Thus, it was shown that in Volga region, *Sr31* gene was effective against *P. graminis* populations, while *Sr6Agi* and *Sr25* genes lost their effectiveness.

Keywords: spring bread wheat; introgression lines; *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*; *Sr*-genes

Submitted: 18.04.2021

Accepted: 09.06.2021

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР К *PHYTOPHTHORA INFESTANS* В ЛАБОРАТОРНОМ ИЗУЧЕНИИ

Н.М. Зотеева*, О.С. Косарева

Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), Санкт-Петербург

* ответственный за переписку, e-mail: zoteyeva@rambler.ru

Изучали 38 сортов картофеля *Solanum tuberosum* из коллекции ВИР по устойчивости к фитофторозу листьев и клубней. Для заражения использовали агрессивный изолят *Phytophthora infestans*, выделенный из пораженного растения посадок картофеля на экспериментальном поле ВИР (г. Пушкин). В опытах использовали концентрацию инокулюма 50000 зооспор/мл. Симптомы болезни учитывали с использованием шкалы от 1 до 9 баллов, где балл 9 означает устойчивость. Коллекция картофеля ВИР содержит богатое сортовое разнообразие. По данным, полученным в полевых обследованиях последних лет, большую часть коллекционных сортов составляют чувствительные к фитофторозу. Часть сортов, выделенных по устойчивости ботвы в полевом изучении, оценивали при искусственном заражении отделенных долей листьев для получения более достоверной характеристики их устойчивости. У некоторых из них полевая устойчивость не была подтверждена. Данные, полученные в тестах заражения клубней, не показали прямой зависимости между устойчивостью листьев и клубней. Только некоторые сорта характеризовались комбинацией этих признаков. В данном исследовании также выявлены сорта с устойчивостью листьев и чувствительностью клубней и с устойчивостью клубней и чувствительностью листьев. Для создания клонов картофеля, сочетающих устойчивость к фитофторозу с высокими агрономическими характеристиками, выделенные источники устойчивости могут быть привлечены в гибридизацию с сортами, обладающими высокими потребительскими свойствами, но также восприимчивостью к патогену листьев и/или клубней.

Ключевые слова: *Solanum tuberosum*, фитофтороз, инокуляция, устойчивость листьев, устойчивость клубней

Поступила в редакцию: 01.12.2020

Принята к печати: 01.06.2021

Введение

Фитофтороз картофеля, вызываемый оомицетом *Phytophthora infestans*, является одной из наиболее вредоносных болезней культуры. Для полового воспроизводства *Ph. infestans* требуются оба типа совместимости (A1 и A2) (Fry, Gudwin, 1997). До 1980 г. в популяциях возбудителя фитофтороза за пределами Мексики был распространен только один тип совместимости. Воспроизводство было бесполом, т.к. присутствовала только клоновая линия спаривания A1. После миграции новых штаммов *Ph. infestans* в Европу в 1976 г. и появление типа совместимости A2, половое размножение патогена стало возможным за счет чего выросло число высоко патогенных рас. Исследования показали, что популяции Северо-Восточной Европы характеризуются наличием обоих типов совместимости и обеспечивают процесс полового размножения оомицета (Веденяпина и др. 2002, Lehtinen et al., 2008; Runno-Paurson et al., 2009).

В северо-западном регионе РФ, где погодные условия крайне благоприятны для распространения инфекции, возбудитель фитофтороза может вызывать значительные потери урожая картофеля. Получение полноценного урожая невозможно без использования фунгицидов. В этой связи необходим поиск нового исходного материала для селекции. Патоген поражает как ботву, так и клубни картофеля. При создании фитофтороустойчивых сортов необходимо

проводить изучение устойчивости как надземных, так и подземных органов растений.

Расширение генетического разнообразия исходного материала является одной из стратегий селекции картофеля, направленной на выведение сортов с устойчивостью к патогенам. Сортная коллекция картофеля ВИР пополняется новыми образцами, которые проходят оценку устойчивости к болезням, в том числе к фитофторозу (Зотеева и др., 2017, 2018; Костина, Косарева. 2018). Испытания по устойчивости к фитофторозу картофеля в полевых условиях являются важным элементом при выборе исходного материала для селекции картофеля. Однако, стабильность устойчивости сортов в течение нескольких сезонов в условиях сильного проявления болезни изучается сравнительно редко ((Stewart et al. 1983, Parker et al. 1992, Forbes et al. 2005, Wulf et al. 2007). В полевых условиях высокая вероятность наличия более широкого спектра факторов вирулентности, чем в изолятах, используемых в лабораторных тестах. В поле часть растений может избегать попадания инфекции на растения в силу ряда условий (солнечная сторона посадок и др.), либо инфекционный фон будет снижен из-за жаркой погоды и отсутствия осадков. Устойчивость растений сильно зависит от погодных условий сезона. Так, исследователи из Литвы сообщают, что в отдельные годы эпифитотий опытные сорта поражались

целиком (100%), в то время как при умеренном распространении инфекции развитие болезни на них достигало 68% (Razukas et al., 2007).

Исследователями устойчивости картофеля к фитофторозу подчеркивается важность проведения оценки при искусственном заражении (Colon et al. 1995; Inglis et al. 1996). Различия в реакции растений на заражение может проявляться в зависимости от ряда факторов, в том числе, результаты изучения зависят от инфекционной нагрузки, агрессивности и вирулентности штаммов, используемых в лабораторных тестах и присутствующих в популяциях патогена в естественных условиях. Представляется, что для получения более надежной информации об устойчивости растительного материала к патогену, следует проводить его изучение как в полевых обследованиях, так и в лабораторных опытах. Интрогрессия генов устойчивости к болезни от диких видов *Solanum* является основным методом усиления устойчивости сортов картофеля к патогену. Многие современные сорта включают гермоплазму диких и культурных видов. Идентификация молекулярных маркеров с дальнейшим отбором растений, (MAS, molecular-assistent selection) имеет большое значение в связи со снижением как финансовых, так и больших трудовых затрат на проведение фитопатологического скрининга для отбора растений с устойчивостью к патогенам (Ewing et al. 2000). Генотипы с наличием нескольких маркеров генов устойчивости к разным патогенам используют в гибридизации, направленной на создание клонов с комплексной и групповой устойчивостью.

Материал и методы

Материалом для исследования служили 38 образцов *S. tuberosum* из сортовой коллекции отдела генетических ресурсов картофеля ВИР.

Оценку устойчивости проводили методами заражения отделенных долей листьев (Zarzycka, 2001) и декапированных клубней (Зотеева, Зимнох-Гузовска, 2004). Из природной популяции *Ph. infestans* с пораженных растений в поле Пушкинских и Павловских Лабораторий ВИР в 2020 г. было выделено несколько изолятов патогена. Для использования в опытах был отобран высоко патогенный изолят, поражающий в наиболее короткие сроки ломтики клубней чувствительного сорта Dorisa. Данный изолят вызывал поражение около 90% поверхности ломтиков клубней на 6-е сутки после заражения. Факторы вирулентности не определены. Концентрация инокулюма при заражении листьев и клубней составляла 50000 зооспор/1мл. Такую концентрацию инокулюма используют как отечественные, так и зарубежные исследователи (Хютти и др., 2020, Lin et al., 2020). Каждый признак изучали в двух независимых тестах. Опыты проводили в двух повторностях. Во всех тестах использовали контрольные сорта Alouette (устойчивый) и Dorisa (чувствительный).

Оценка устойчивости листьев. В пластиковые кюветы, выстланные влажной копировальной бумагой, выкладывали листья, накрывали их стеклами для создания условий повышенной влажности и помещали в климатическую

камеру с t° воздуха 17°C . Заражение осуществляли, помещая каплю инокулюма на центральную часть доли листа. Использовали по 3 доли листьев, собранных со среднего яруса 3-х растений образца в каждой повторности. Оценку поражения проводили на 7-е сутки после заражения с использованием 9-балльной шкалы, где балл 9 означает отсутствие симптомов болезни; балл 8 – инфекционное пятно занимает до 3% оцениваемой площади; балл 7 – от 3 до 10%; балл 6 – от 10.1 до 25%; балл 5 – от 25, 1 до 75%; балл 4 – от 75.1 до 90%; балл 3 – от 90.1 до 97%; балл 2 – 97.1 до 99% и балл 1 – инфекционное пятно занимает 100% площади (Zarzycka, 2001). Данная шкала использована при оценке устойчивости листьев и клубней.

Наличие нескольких маркеров генов устойчивости к фитофторозу в растительном материале увеличивает вероятность его высокой устойчивости. У значительной части растений при идентификации маркеров генов *Rpi* устойчивость отсутствует, т.е. у них эти гены не функциональны. С другой стороны, отсутствие в устойчивом материале маркеров генов, наиболее часто применяемых при генотипировании, является следствием еще недостаточного арсенала разработанных маркеров. Этим можно объяснить то, что в недавно проведенном исследовании, гибридный клон с наличием 4-х маркеров генов *Rpi* был менее устойчив, чем клон этого же гибрида с двумя (из их числа) детектированными маркерами (Зотеева и др., 2017).

Цель работы состояла в выявлении источников устойчивости к фитофторозу среди сортов картофеля. Проведенная нами работа направлена на выявление сортов картофеля с устойчивостью листьев и/или клубней для дальнейшей работы по их генотипированию и поиску MAS-эффективных маркеров. Образцы сортовой коллекции ВИР оценены нами по устойчивости к фитофторозу листьев и клубней в полевых обследованиях и в лабораторном изучении.

камеру с t° воздуха 17°C . Заражение осуществляли, помещая каплю инокулюма на центральную часть доли листа. Использовали по 3 доли листьев, собранных со среднего яруса 3-х растений образца в каждой повторности. Оценку поражения проводили на 7-е сутки после заражения с использованием 9-балльной шкалы, где балл 9 означает отсутствие симптомов болезни; балл 8 – инфекционное пятно занимает до 3% оцениваемой площади; балл 7 – от 3 до 10%; балл 6 – от 10.1 до 25%; балл 5 – от 25, 1 до 75%; балл 4 – от 75.1 до 90%; балл 3 – от 90.1 до 97%; балл 2 – 97.1 до 99% и балл 1 – инфекционное пятно занимает 100% площади (Zarzycka, 2001). Данная шкала использована при оценке устойчивости листьев и клубней.

Оценка устойчивости клубней. Оценку устойчивости клубней осуществляли с использованием метода, разработанного Зотеевой и Зимнох-Гузовской (2004). Изучение проводили в помещении с постоянной t° воздуха 18°C в пластиковых кюветах, накрытых стеклами, без доступа света. Инокулировали по 5 клубней каждого образца в присутствии контрольных сортов. Интенсивность роста мицелия фиксировали на 6-е сутки после заражения по оригинальной шкале 0–3 балла, где балл 0 означает отсутствие мицелия, а балл 3 – его интенсивный рост. Площадь инфекционного пятна оценивали на продольном разрезе клубня на 12-е сутки после заражения по шкале 1–9 баллов.

Результаты и обсуждение

Растения обследовали в общих посадках сортовой коллекции ВИР, первоначально было оценено более 100 образцов. Среди коллекционных сортов большую часть

составляют чувствительные к болезни. Часть сортов, выделенных по устойчивости ботвы в полевом изучении, оценивали при искусственном заражении листьев для

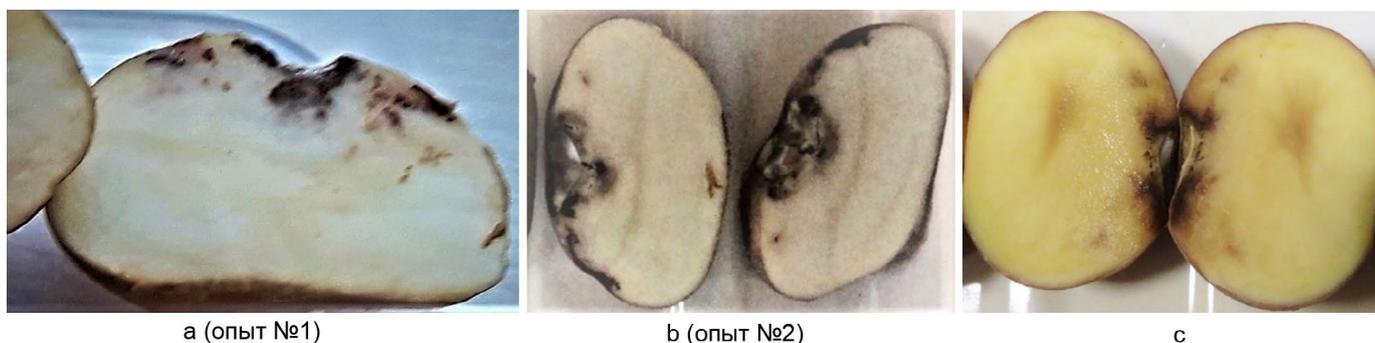
получения более достоверной характеристики их устойчивости. У части сортов полевая устойчивость не была подтверждена при искусственном заражении. Реакция контрольных сортов в лабораторных опытах была соответствующей характеристикам их устойчивости: на листьях сорта *Alouette* симптомы болезни отсутствовали, листья сорта *Dogisa* поражались в сильной степени (средний балл оценки 2.8). Часть сортов проявила высокую и умеренную чувствительность. В данном изучении 10 сортов проходили оценку только при заражении отделенных листьев. Среди них три (*Огниво*, *Сувенир* и *Сеянец Лаптева*) проявили устойчивость как при оценке в поле, так и в лабораторном изучении (данные не приведены в таблице 1). В ответ

на заражение *Ph. infestans* на листьях сорта *Сеянец Лаптева* появлялась реакция сверхчувствительности (рис.1). Устойчивость ботвы, найденная в полевом изучении, не подтвердилась у сортов *Голубизна* и *Воля*, ее оценивали баллами – 3.7 и 2.9, соответственно. Умеренной чувствительностью характеризовались сорта: *Дарковичский*, *Елисейевский*, *Брянский Надежный*, *Маугли*, *Лина* (средний балл 5); умеренной устойчивостью – сорт *Теща* (балл 5.7). В лабораторных опытах подтверждена устойчивость сортов: *Белуха*, *Ветеран*, *Дебрянск*, *Калинка*, *Киви*, *Кустаревский*, *Лазарь*, *Никулинский* и *Пранса* (таблица 1).



Рисунок 1. Реакция сверхчувствительности на отделенных долях листьев сорта *Сеянец Лаптева* (7-е сутки после заражения *Phytophthora infestans*)

Figure 1. Hypersensitivity reaction on detached leaflets of ‘*Sejanets Lapteva*’ variety (7th day after inoculation with *Phytophthora infestans*)



а (опыт №1)

б (опыт №2)

с

Рисунок 2. Проявление некротической реакции на продольном разрезе клубней сортов ‘*Белоснежка*’ (а, б), ‘и ‘*Кустаревский*’ (с) на 12-е сутки после инокуляции *Phytophthora infestans*

Figure 2. Necrotic reaction on longitudinally cut of tubers of varieties ‘*Belosniezhka*’ (a – assay 1 and b – assay 2), and ‘*Kustarevsky*’ (c) on the 12th day after inoculation with *Phytophthora infestans*

Таблица 1. Устойчивость листьев и клубней к фитофторозу у образцов сортовой коллекции картофеля ВИР

Название образца	Устойчивость, балл							
	Листьев		σ I, II	Клубней				σ (пятно) I, II
	I	II		мицелий (I)	пятно (I)	мицелий (II)	пятно (II)	
Барон	5.3	4.0	0.6	1.5	4.9	1.3	4.7	0.5
Белуха	7.0	8.5	0.7	2.7	2.3	2	2.6	0.4
Белоснежка	4.5	4.4	0.4	0.3	6.5	0.2	6.0	0.5
Брянский надежный	5.0	5.4	0.4	0.8	6.4	1.0	6.5	0.2
Варяг	5.8	5.6	0.2	1.2	6.2	1.0	6.1	0.2
Вектор	8.3	9.0	0.6	0.0	8.7	0.2	8.5	0.2
Захидна	6.5	6.0	0.5	1.5	6.1	1.0	6.0	0.1
Воля	3.3	3.0	0.6	1.5	3.2	1.5	3.0	0.4
Ветеран	7.5	8.7	0.6	2.7	7.3	0.7	6.7	0.6
Голубизна	3.8	3.6	0.7	1.7	5.7	1.0	5.9	0.2
Гибрид 1226-33	3.9	6.0	6.1	1.7	3.9	1.8	4.1	0.4
Дарковичский	5.0	5.4	0.4	0.7	6.0	0.8	6	0.2
Дебрянск	7.0	8.4	0.9	0.2	3.0	0.3	3.0	0.9
Диво	5.0	4.8	0.6	2.8	4.8	2.7	4.2	0.4
Елисеевский	5.3	5.0	0.6	2.6	3.4	2.8	3.3	0.6
Калинка	6.3	8.5	0.4	1.5	6.2	1.0	6.0	0.9
Киви	7.4	7.6	0.2	2.5	5.0	2.0	5.0	0.3
Красная Заря	7.0	7.0	0.0	0.8	6.8	0.5	6.7	0.4
Кустаревский	6.9	6.5	0.3	0.6	6.6	0.5	7.0	0.5
Лазарь	6.3	6.5	0.4	1.3	6.0	1.0	6.0	0.4
Лина	4.8	5.1	0.5	0	6.0	0	6.0	0.2
Маугли	5.0	5.0	0.6	2.0	6.3	0.5	6.0	0.7
Ломоносовский	3.3	4.0	0.5	1.5	6.0	1.0	6.4	0.4
Никулинский	7.0	7.0	0.0	0	6.5	1.0	6.3	0.5
Очарование	5.0	5.0	0.0	1.0	5.9	1.8	6.2	0.3
Пранса	6.5	6.7	0.5	1.1	6.3	1.0	6.0	0.3
Теща	5.5	5.9	0.4	0	6.4	0	6.7	0.7
контрольные сорта								
Alouette	9.0	9.0	0	0	9.0	0	9.0	0.3
Dorisa	3.0	2.4	0.4	2.6	3.0	2.7	3.0	0.8

I – первый опыт; II – второй опыт; σ – стандартное отклонение.

В двух опытах №1 и №2 по оценке устойчивости клубней у сорта Dorisa отмечен интенсивный рост мицелия и сильное распространение инфекции внутри клубня. На клубнях контрольного устойчивого сорта Alouette симптомы болезни отсутствовали. При оценке симптомов поражения у некоторых сортов отмечали некротическую реакцию на заражение *Ph. infestans* (рис. 1, 2). Интенсивный рост мицелия отмечен на клубнях сортов Елисеевский и Диво (балл 2.8), почти полное его отсутствие – у сорта Дебрянск (балл 0.3), Вектор, Белоснежка (балл 0.2) и полное отсутствие – у сортов Лина и Теща. Размеры инфекционных пятен на продольном разрезе клубней, оцениваемые баллами от 6 до 9, имели сорта: Белоснежка, Брянский Надежный, Варяг, Вектор, Ветеран, Захидна, Калинка, Красная Заря, Лазарь, Маугли, Никулинский и Теща. У устойчивых сортов, отвечающих на заражение появлением некротов, степень их выраженности была разной (рис. 2).

На продольном разрезе клубней сортов Дебрянск и Елисеевский, сильно различающихся по интенсивности роста мицелия, размеры инфекционных пятен были сопоставимы (баллы 3.0 и 3.4, соответственно) и указывали на чувствительность к болезни обоих сортов.

Обсуждение

В сортименте картофеля, выращиваемого в РФ, недостаточно устойчивых к фитофторозу сортов отечественной селекции. Для их создания необходим исходный материал, сочетающий устойчивость к болезни с хорошими хозяйственными характеристиками. В связи с этим образцы

После пассирования мицелия *Ph. infestans* в течение 2-х месяцев на ломтиках клубней сорта Dorisa, агрессивность изолята возросла. При пересеве культуры, мицелий получали уже на 4-е сутки после инокулирования. Во втором опыте, с использованием той же концентрации инокулюма, что и в предыдущем, на 12-е сутки после заражения у части сортов несколько увеличилась площадь инфекционных пятен. У сортов Лина и Калинка устойчивость снизилась с 5.9 до 5.0 и с 6.0 до 4.8 баллов, соответственно (данные не приведены в таблице).

Сопоставление полученных данных выявило отсутствие зависимости степени устойчивости листьев и клубней у изученных сортов. По результатам оценки выявлены образцы, характеризующиеся как устойчивостью листьев и неустойчивостью клубней (Гибрид 1226-33, Киви), так и с устойчивостью клубней и неустойчивостью листьев (Белоснежка, Ломоносовский). В данном изучении у части сортов найдена устойчивость как листьев, так и клубней, среди них: Вектор, Ветеран, Кустаревский, Лазарь, Никулинский, Пранса.

сортовой коллекции ВИР нуждаются в комплексном изучении. В разные годы проведено изучение признаков скоропелости, продуктивности, содержанию крахмала, а также по устойчивости к ряду болезней и вредителей (Костина, Косарева. 2018). Проведена оценка устойчивости сортов в

Table 1. Leaf and tuber late blight resistance of the varieties from VIR's potato collection

Tested varieties	Resistance, score							
	Leaves		σ I, II	Tubers				σ (spot) I, II
	I	II		mycelium (I)	spot (I)	mycelium(II)	spot (II)	
Baron	5.3	4.0	0.6	1.5	4.9	1.3	4.7	0.5
Belukha	7.0	8.5	0.7	2.7	2.3	2	2.6	0.4
Belosnezhka	4.5	4.4	0.4	0.3	6.5	0.2	6.0	0.5
Bryanskiy nadyozhnyy	5.0	5.4	0.4	0.8	6.4	1.0	6.5	0.2
Varyag	5.8	5.6	0.2	1.2	6.2	1.0	6.1	0.2
Vektor	8.3	9.0	0.6	0.0	8.7	0.2	8.5	0.2
Zakhidna	6.5	6.0	0.5	1.5	6.1	1.0	6.0	0.1
Volya	3.3	3.0	0.6	1.5	3.2	1.5	3.0	0.4
Veteran	7.5	8.7	0.6	2.7	7.3	0.7	6.7	0.6
Golubizna	3.8	3.6	0.7	1.7	5.7	1.0	5.9	0.2
Gibrid 1226-33	3.9	6.0	6.1	1.7	3.9	1.8	4.1	0.4
Darkovichskiy	5.0	5.4	0.4	0.7	6.0	0.8	6	0.2
Debryansk	7.0	8.4	0.9	0.2	3.0	0.3	3.0	0.9
Divo	5.0	4.8	0.6	2.8	4.8	2.7	4.2	0.4
Eliseyevskiy	5.3	5.0	0.6	2.6	3.4	2.8	3.3	0.6
Kalinka	6.3	8.5	0.4	1.5	6.2	1.0	6.0	0.9
Kivi	7.4	7.6	0.2	2.5	5.0	2.0	5.0	0.3
Krasnaya Zarya	7.0	7.0	0.0	0.8	6.8	0.5	6.7	0.4
Kustarevskiy	6.9	6.5	0.3	0.6	6.6	0.5	7.0	0.5
Lazar	6.3	6.5	0.4	1.3	6.0	1.0	6.0	0.4
Lina	4.8	5.1	0.5	0	6.0	0	6.0	0.2
Maugli	5.0	5.0	0.6	2.0	6.3	0.5	6.0	0.7
Lomonosovskiy	3.3	4.0	0.5	1.5	6.0	1.0	6.4	0.4
Nikulinskiy	7.0	7.0	0.0	0	6.5	1.0	6.3	0.5
Ocharovaniye	5.0	5.0	0.0	1.0	5.9	1.8	6.2	0.3
Pransa	6.5	6.7	0.5	1.1	6.3	1.0	6.0	0.3
Tyoshcha	5.5	5.9	0.4	0	6.4	0	6.7	0.7
Control varieties								
Alouette	9.0	9.0	0	0	9.0	0	9.0	0.3
Dorisa	3.0	2.4	0.4	2.6	3.0	2.7	3.0	0.8

I – first experiment; II – second experiment; σ – standard deviation.

условиях инфекционных фонов *Ph. infestans* сезонов 2016 и 2017 гг., характеризовавшихся сильным распространением инфекции (Зотеева и др., 2017).

Сорта, прошедшие обследования в течение нескольких полевых сезонов с сильным распространением инфекции и проявившие устойчивость как в полевых условиях, так и в лабораторных тестах, можно рассматривать, как обладающие стабильно высокой устойчивостью к патогену.

Уровень устойчивости, проявляемый сортом, может зависеть от способа тестирования и условий естественного инфекционного фона. Чтобы заключить, что уровень устойчивости к фитофторозу сортов является длительным и стабильным данные об их высокой устойчивости должны иметь близкий диапазон баллов оценки, независимо от местоположения посадок и условий года (Lin et al. 1986; Becker, Leon 1988). У части сортов высокая устойчивость к фитофторозу, отмеченная в поле, не была подтверждена в лабораторных опытах.

При оценке материала в поле, расхождение данных об устойчивости может быть вызвано различием состава популяций *Ph. infestans*, и разными уровнями патогенности изолятов, используемых в лабораторном изучении. В отдельных случаях данные оригинаторов, найденные для некоторых сортов, расходились с результатами оценки, полученными нами. Так, в наших опытах при тестировании клубней сорта Очарование сорт оценивали, как устойчивый (средний балл устойчивости 6.1). По данным оригинатора (<https://www.kartofel.org/cultivars/sorta>), код сорта в

реестре (РФ9463592) устойчивость клубней оценивается баллом 5.0.

Часть сортов, проявивших устойчивость в полевых обследованиях, проведенных ранее, не вошла в число устойчивых в оценке последних лет. Это может быть связано с адаптацией местной популяции патогена к сортам. Способность паразита мутировать приводит к его адаптации к хозяевам (Kaltz, Shykoff, 1998; Gandon, Michalakis, 2002). Этот процесс наблюдали на примере сортов Невский и Аврора, проявлявших устойчивость ботвы в начале их появления в посадках, а теперь характеризующимися чувствительностью ботвы к патогену.

Сильное влияние на результаты тестов оказывает фактор агрессивности используемого изолята. В любом, выделенном из природной популяции изоляте, могут также присутствовать гены вирулентности, которые не определяются с помощью клонов-дифференциаторов Блека *R1-R11* (Black et al., 1953), для идентификации которых не разработаны генотипы растений -хозяев. Поэтому идентификация генов вирулентности от v.1 до v.11 не дает полной информации о вирулентности изолятов. Для мониторинга генетической вариабильности популяций *Ph. infestans* в настоящее время используют молекулярные методы, исследуя гаплотипы митохондриальной ДНК (mtDNA haplotyping) (Martin et al., 2019).

Полученные результаты можно рассматривать, как предварительные, поскольку в использованном изоляте *Ph. infestans* не определены факторы вирулентности на

листьях генотипов-дифференциаторов Блека *R1 –R11*. Однако, исходя из того, что данный изолят был выделен из популяции *Ph. infestans*, на высоком инфекционном фоне которой проходила полевая оценка устойчивости опытных образцов, он рассматривается нами, как репрезентативный и дающий возможность дифференцировать образцы по степени их устойчивости.

Сопоставление данных по устойчивости листьев и клубней у растений картофеля проводили ранее (Stewart et al., 1994). Результаты проведенной нами оценки показали

Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по теме №0662-2019-0004_2019 «Скрининг генофонда основных сельскохозяйственных культур по устойчивости к болезням и вредителям с использованием современных лабораторных методов, изучение эффективности источников устойчивости к вредным организмам», номер государственной регистрации ЕГИСУ НИОКР АААА–А16–116040710361–8).

Библиографический список (References)

- Веденяпина Е.Г., Зотеева Н.М., Патрикеева М.В. (2002) *Phytophthora infestans* в Ленинградской области: гены вирулентности, типы совместимости и жизнеспособность ооспор. *Микология и фитопатология* 36(6):77–85
- Зотеева Н., Зимнох-Гузовская Е. (2004) Новый метод оценки устойчивости клубней картофеля к фитофторозу. *Микология и фитопатология* 38(1):89–93
- Зотеева Н.М., Антонова О.Ю., Клименко Н.С., Апаликова О.В. и др. (2017) Использование молекулярных маркеров R-генов и типов цитоплазмы при интрогрессивной гибридизации диких полиплоидных мексиканских видов картофеля. *Сельскохозяйственная биология* 52:964–975. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.5.964rus>
- Зотеева Н.М., Косарева О.С., Евдокимова З.З. (2017) Поиск устойчивого к фитофторозу исходного материала для селекции среди сортов и клонов картофеля. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции* 178(4):125–131. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2017-4-119-126>
- Зотеева Н.М., Косарева О.С., Евдокимова З.З. (2018) Чувствительность сортов и селекционных клонов картофеля к *Rizoctonia solani* и *Streptomyces scabies*. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции* 179(4):141–148. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2018-4-141-148>
- Костина Л.И., Косарева О.С. (2017) Коллекция селекционных сортов картофеля для селекции на продуктивность, скороспелость, устойчивость к фитофторозу, вирусным болезням и *Globodera rostochiensis* Woll. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции* 179(4):75–82. <https://doi.org/10.18699/VJ20.629> [10.30901/2227-8834-2018-4-74-81](https://doi.org/10.30901/2227-8834-2018-4-74-81)
- Хютти А.В., Рыбаков Д.А., Гавриленко Т.А., Афанасенко О.С. (2020) Устойчивость к возбудителям фитофтороза и глободероза современного сортимента семенного картофеля и его фитосанитарное состояние в различных агроклиматических зонах европейской части России. *Вавиловский журнал генетики и селекции* 24(4):363–375. <https://doi.org/10.18699/VJ20.629>
- Becker HC, Léon J (1988) Stability analysis in plant breeding. *Plant Breed* 101(1):1–23. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1988.tb00261.x>
- Black W, Mastenbroek C, Mills WR, Peterson LC (1953) A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. *Euphytica* 2:173–179. <https://doi.org/10.1007/BF00053724>
- Colon LT, Budding DJ, Hoogendoorn J (1995) Breeding for foliar resistance to *Phytophthora infestans* in potato: the influence of test conditions on the results of screening for field resistance. In: Dowley L, Bannon E, Cooke L, Keane T, O’Sullivan E (eds) *Phytophthora infestans* 150. Dublin, Ireland: Boole Press Ltd. 282–288
- Ewing EE, Šimko I, Smart CD (2000) Genetic mapping from field tests of qualitative and quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in a population derived from *Solanum tuberosum* and *Solanum berthaultii*. *Mol Breed* 6(1):25–36. <https://doi.org/10.1023/A:1009648408198>
- Fry WE, Goodwin SB (1997). Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Dis* 81(12):349–357. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.12.1349>
- Gandon S, Michalakakis Y (2002) Local adaptation, evolutionary potential and host–parasite coevolution: interactions between migration, mutation, population size and generation time. *J Evol Biol* 15(3):451–462. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2002.00402.x>
- Inglis DA, Johnson DA, Legard DE, Fry WE et al (1996) Relative resistance of potato clones in response to new and old populations of *Phytophthora infestans*. *Plant Dis* 80(5):575–578
- Kaltz O, Shykoff JA (1998) Local adaptation in host-parasite systems. *Heredity* 81(4):361–370. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.1998.00435.x>
- Lin CS, MR Binns, LP Lefkovitch (1986) Stability analysis: Where do we stand? *Crop Sci* 26(5):894–900. <https://doi.org/10.2135/cropsci1986.0011183X002600050012x>
- Lehtinen A, Hannukkala A, Rantanen T, Jauhiainen L (2007) Phenotypic and genetic variation in Finnish potato late blight populations 1997–2000. *Plant Pathol* 56(3):480–491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01556.x>
- Parker JM, Thurston HD, Villareal-Gonzalez MJ, Fry WE (1992) Stability of disease expression in the potato late blight pathosystem: A preliminary field study. *Am J Pot Res* 69(10):635–644. <https://doi.org/10.1007/BF02852676>
- Razukas AJ, Jundulas J, Asakaviciute JR (2008) Potato cultivars susceptibility to potato late blight (*Phytophthora infestans*). *Appl Ecol Env Res* 6(1):95–106
- Martin FN, Zhang Y, Cooke DEL, Coffey MD et al (2019) Insights into evolving global populations of *Phytophthora infestans* via new complementary mtDNA haplotype markers and nuclear SSRs. *PLoS One* 14(1):e0208606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208606>
- Runno-Paurson E, Fry WE, Myers KL, Koppel M et al (2009) Characterization of *Phytophthora infestans* isolates collected

- from potato in Estonia during 2002–2003. *Eur J Plant Pathol* 124(4):565–575. <https://doi.org/10.1007/s10658-009-9442-2>
- Stefańczyk E, Plich J, Janiszewska M, Smyda-Dajmund P et al (2020) Marker-assisted pyramiding of potato late blight resistance genes *Rpi-rzcl* and *Rpi-phul* on di- and tetraploid levels. *Mol Breed* 40(9):89. <https://doi.org/10.1007/s11032-020-01169-x>
- Stewart HE, Bradshaw JE, Wastie RL (1994) Correlation between resistance to late blight in foliage and tubers in potato clones from parents of contrasting resistance. *Potato Res* 37(4):429–434. <https://doi.org/10.1007/BF02358357>
- Stewart, HE, Flavell PH, McCalmont DC, Wastie RL (1983) Correlation between glasshouse and field test for resistance to foliage blight caused by *Phytophthora infestans*. *Potato Res* 26(1):41–48. <https://doi.org/10.1007/BF02357372>
- Wulff EG, Pérez W, Nelson RJ, Bonierbale M et al (2007) Identification of stable resistance to *Phytophthora infestans* in potato genotypes evaluated in field experiments in Peru. *Exp Agr* 43(3):353–363. <https://doi.org/10.1017/S0014479707004991>
- Zarzycka H (2001) Evaluation of resistance to *Phytophthora infestans* in detached leaflet assay. In: Monografie i Rozprawy Naukowe 10b. Radzików: IHAR. 75–77

Translation of Russian References

- Khiutti AV, Rybakov DA, Gavrilenko TA, Afanasenko OS (2020) [Resistance to causal agents of late blight and golden potato nematode of the modern cultivars of seed potatoes and their phytosanitary status in various agroclimatic zones of the European part of Russia]. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* 24(4):363–375 (in Russian) <https://doi.org/10.18699/VJ20.629>
- Kostina LI, Kosareva OS (2018) [The collection of potato cultivars as a source for breeding for high yield, earliness, and resistance to late blight, virus diseases and *Globodera rostochiensis* Woll.]. *Proceedings on applied botany, genetics and breeding* 179(4):74–81 (in Russian) <https://doi.org/10.18699/VJ20.629> [10.30901/2227-8834-2018-4-74-81](https://doi.org/10.30901/2227-8834-2018-4-74-81)
- Zoteyeva N, Zimnoch-Guzowska E (2004) [New method of the assessment of the potato tuber resistance to late blight]. *Mikologiya i fitopatologiya* 38(1):89–93 (in Russian)
- Zoteyeva NM, Kosareva OS, Evdokimova ZZ (2017) [Search for source material with late blight resistance among potato varieties and clones]. *Proceedings on applied botany, genetics and breeding* 178(4):119–126 (in Russian) <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2017-4-119-126>
- Zoteyeva NM, Kosareva OS, Evdokimova ZZ (2018) [Assessment of the potato cultivars and breeding clones for susceptibility to *Rizoctonia solani* and *Streptomyces scabies*]. *Proceedings on applied botany, genetics and breeding* 179(4):142–149 (in Russian) <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2018-4-141-148>
- Vedenyapina EG, Zoteyeva NM, Patrikeyeva MV (2002) [*Phytophthora infestans* in Leningrad Region: genes for virulence, mating types and oospore fitness]. *Mikologiya i fitopatologiya* 36(6):77–85 (in Russian)
- Zoteyeva NM, Antonova OYu, Klimenko NS, Apalikova OV et al (2017) [Facilitation of introgressive hybridization of wild polyploid Mexican potato species using DNA markers of R- genes and of different cytoplasmic types]. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* 52(5):964–975 (in Russian) <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.5.964rus>

Plant Protection News, 2021, 104(2), p. 113–119

OECD+WoS: 4.01+AM (Agronomy)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2021-104-2-14616>

ASSESSMENT OF THE VARIETIES FROM THE VIR'S POTATO COLLECTION FOR RESISTANCE TO *PHYTOPHTHORA INFESTANS* IN LABORATORY ASSAYS

H.M. Zoteyeva*, O.S. Kosareva

All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

*corresponding author, e-mail: zoteyeva@rambler.ru

Thirty-eight varieties of potato *Solanum tuberosum* L. from the N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR) collection were studied for leaf and tuber resistance to late blight. An aggressive *Phytophthora infestans* isolate collected from VIR experimental field was used for inoculation at a concentration of 50,000 zoospores/ml. The disease severity was evaluated using a scale from 1 to 9 grades, where grade 9 means resistant. Recent field observations revealed that most of the variety accessions were sensitive to late blight. In the present study, some of the varieties identified as foliar resistant in field evaluation were further tested under artificial inoculation. Resistance of some varieties found in field observations was not confirmed in laboratory assays. The data obtained in tuber inoculation tests did not show a direct correlation between resistance levels in leaves and tubers. Only some varieties possessed both characteristics, while varieties with leaf resistance and tuber sensitivity and with tuber resistance and leaf sensitivity were also identified. To develop potato varieties that combine resistance to late blight with good agronomic characteristics, resistant lines identified in this study can be potentially hybridized with varieties of high consumer value that are susceptible to late blight.

Keywords: *Solanum tuberosum*, late blight, inoculation, resistance of leaves, resistance of tubers

Submitted: 01.12.2020

Accepted: 01.06.2021

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ СОРТООБРАЗЦОВ КОСТРЕЦА БЕЗОСТОГО К ВОЗБУДИТЕЛЮ ТЕМНО-БУРОЙ ПЯТНИСТОСТИ НА ИСКУССТВЕННОМ ИНФЕКЦИОННОМ ФОНЕ

Н.Ю. Костенко

Всероссийский научно-исследовательский институт кормов имени В. Р. Вильямса, Лобня, Московская обл.

* ответственный за переписку, e-mail: kostenko86@yandex.ru

Кострец безостый *Bromopsis inermis* – широко распространенная многолетняя злаковая культура с ценными кормовыми качествами. Отличается высокой зимостойкостью. Основное направление в селекционной работе – выведение высокоурожайных сортов с повышенной болезнестойкостью. Исследования проводились на искусственном инфекционном фоне лаборатории иммунитета ФНЦ «ВИК» имени В. Р. Вильямса в г. Лобня Мытищинского района Московской области в 2018–2020 годах. Многолетний фитосанитарный мониторинг посевов показал, что наиболее распространенное заболевание данной культуры – это темно-бурая пятнистость или гельминтоспориоз. В 2018 году на инфекционном фоне было высеяно 16 образцов костреца безостого для определения их болезнестойкости. Максимального развития болезнь достигает в фазу начала созревания семян. Два из изучаемых образцов, по двухлетним данным, превысили стандартный сорт Факельный в среднем на 12% по устойчивости к возбудителю гельминтоспориоза и могут быть рекомендованы для включения в селекционный процесс при создании современных сортов интенсивного типа.

Ключевые слова: кострец безостый, пятнистость листьев, гельминтоспориоз, мониторинг болезней, оценка поражения

Поступила в редакцию: 05.08.2020

Принята к печати: 24.05.2021

Введение

Кормовые травы – это мощные, постоянно действующие, важные факторы корригирования окружающей среды, сохранения и улучшения почвенного плодородия, а также устойчивости биоценозов (Косолапов, Шамсутдинов, 2015). Кострец безостый *Bromopsis inermis* превосходит по питательной ценности большинство многолетних злаковых культур, обладает высокой экологической пластичностью, хорошо поедается сельскохозяйственными животными, поэтому активно используется, как пастбищное растение в России, США, Канаде, Австралии, Японии и ряде других стран.

Основной недостаток костреца безостого в с/х производстве – нестабильный урожай семян, а также поражаемость листьев возбудителями грибных заболеваний, особенно пятнистостями. Гельминтоспориоз – одно из самых вредоносных и распространенных заболеваний костреца безостого. Возбудителем заболевания является гриб *Drechslera bromi* Ito. Данный гриб имеет широкий спектр хозяев и вызывает характерные пятна на листьях у многих представителей семейства Poaceae, при этом кострец безостый служит основным хозяином *Drechslera bromi* (Ali, Francl, 2014).

Прогнозируемое повышение минимальной температуры на 2–6 °С в зимние месяцы из-за глобального потепления, удлинение вегетационного сезона могут быть благоприятны для увеличения распространенности грибных заболеваний и, вероятно, повлияют на выживаемость кормовых культур (Belanger, 2002; Nakala, et. al., 2011).

В США последние 70 лет ведется работа по селекции сортов костреца безостого с повышенной устойчивостью к

темно-бурой пятнистости, так Casler с соавт. (2000), анализируя генетический прогресс костреца безостого за 50 лет, отмечал, что распространенность бурой пятнистости листьев на этом злаке снижалась в среднем на 0.21 единицы за десятилетие (применялась 10 бальная шкала оценки). В России перед селекционерами стоит задача: формирование комплекса сортов многолетних злаков с различными экологическими и сельскохозяйственными качествами (Шамсутдинов, 2014). Wilkins и Humphreys (2002) указывают, что большая часть полезных генетических вариаций внутри и между видами кормовых трав еще не использована. В России зарегистрировано свыше 40 сортов костреца безостого. Селекционная работа в настоящее время направлена на создание сортов нового поколения, устойчивых к различным лимитирующим факторам, в частности, к поражению фитопатогенами. Инфекционный фон является надежным инструментом для определения устойчивости изучаемых сортообразцов, поскольку инфекционная нагрузка подобранная опытным путем позволяет вызывать заражение растений при любых погодных условиях в течение вегетационного периода.

Цель наших исследований: определение устойчивости образцов костреца безостого к возбудителю гельминтоспориоза на полевом инфекционном фоне, так как углубленное и всестороннее изучение коллекций сортообразцов из различных географических зон позволяет выявить доноров устойчивости и создать исходный селекционный материал с повышенной болезнестойкостью.

Материалы и методы

Определение пораженности растений костреца безостого к возбудителю гельминтоспориоза на полевом

инфекционном фоне проводилось по 9-ти бальной шкале, согласно методическим рекомендациям, разработанным в

лаборатории иммунитета ФНЦ «ВИК» имени В. Р. Вильямса (Пуца и др., 1999). Объектами исследований служили перспективные сортообразцы и дикорастущие формы, собранные в различных областях России (коллекция ФНЦ «ВИК» имени В. Р. Вильямса).

Перед посевом на инфекционном фоне, в лабораторных условиях проводили оценку экспресс методом на устойчивость к *D. bromi* сортообразцов костреца безостого (Костенко, 1991). После анализа полученных данных, на поле-вом инфекционном фоне высевали лишь те сортообразцы, устойчивость которых оказалась выше, чем у стандартного

сорта Факельный. В 2018 году на инфекционном фоне было высеяно 16 образцов костреца безостого, семена которых искусственно не заражались возбудителем болезни. Посев осуществляли вручную широкорядным способом с междурядьями 45 см. Длина рядка – 4 м. Норма высева – 1 г/м². Повторность – опыта четырехкратная. Стандартом служил районированный сорт Факельный. Математическая обработка результатов исследования проводилась методом дисперсионного анализа с вычислением наименьшей существенной разницы для выборочных средних с уровнем значимости 5% (HCP_{05}) (Доспехов, 2011).

Результаты и обсуждения

В начале июня 2018 года после появления полных всходов, практически ни на одном из изучаемых сортообразцов не было обнаружено признаков поражения возбудителем гельминтоспориоза. По мере развития растений в фазу

кущения начали появляться первые симптомы пятнистости. Проведенные учеты поражения растений показали, что интенсивность развития болезни не превышала 3% (табл. 1).

Таблица 1. Поражаемость сортообразцов костреца безостого возбудителем гельминтоспориоза (посев 2018 г.)

№ образца	Название сорта/сортообразца или географическое происхождение диких растений (д/р)	Пораженность растений в лабораторных условиях по девятибалльной шкале в 2018 г.	Интенсивность развития болезни, %			
			Кущение 2018 г.	Начало созревания семян		
			2019 г.	2020 г.	Среднее за 2 года	
1	д/р Карелия	1	2.8±0.9	6.7±2.1	22.2±10.4	14.4±8.6
0	Факельный (стандарт)	3	3.0±1.2	11.1±4.3	33.3±12.1	22.2±13.6
3	сорт Дуэт	2	1.9±1.1	8.9±3.9	31.1±10.4	20.0±11.8
2	д/р Московская обл.	1	1.1±0.2	3.3±1.5	15.6±6.3	9.5±5.1
5	д/р Костромская обл.	1	2.0±1.2	6.7±3.1	19.6±8.1	13.2±8.1
6	д/р Карелия	1–2	1.3±0.4	7.8±2.1	24.4±9.2	16.1±9.8
7	д/р Архангельская обл.	2	1.5±0.4	11.1±4.2	20.0±7.6	15.6±10.5
8	д/р Карелия	2	1.7±0.6	11.1±5.0	20.0±9.1	15.6±10.5
9	сорт Орловский	2	2.4±1.2	8.9±3.3	17.8±6.3	13.4±8.9
10	МФ-152	1	2.0±1.3	8.9±4.1	13.3±4.4	11.1±7.7
11	БУ-13	1–2	2.2±1.0	8.9±3.8	22.3±8.3	15.6±9.9
12	д/р Московская обл.	1	1.5±0.7	4.4±2.1	16.9±6.1	10.7±6.1
13	д/р Воронежская обл.	1–2	2.0±0.6	6.7±2.9	22.2±8.5	14.5±8.6
14	Павл. 22-17	2	1.8±1.1	6.7±2.4	31.1±8.0	18.9±10.2
0	Факельный (стандарт)	3	2.5±1.2	11.1±6.1	33.3±8.9	22.2±13.6
16	д/р Московская обл.	2	0.9±0.2	8.9±3.8	31.1±10.8	20.0±11.8
	Факельный (стандарт), среднее	3	2.75±0.9	11.1±5.9	33.3±12.4	22.2±13.6
	HCP_{05}		$F_{\phi} < F_{\tau}$	5.6	14.1	11.3

Table 1. Infectability of samples of smooth brome grass planted in 2018 with the causative agent of helminthosporiosis

Sample #	Variety/accession or geographic origin of wild plants (w/p)	Plant infection levels under lab conditions using the 9-point scale in 2018	Disease development intensity in the field, %			
			Branching 2018	Beginning of seed maturation		
			2019	2020	Biannual mean	
1	w/p Karelia	1	2.8±0.9	6.7±2.1	22.2±10.4	14.4±8.6
0	Fakelnyy (standard)	3	3.0±1.2	11.1±4.3	33.3±12.1	22.2±13.6
3	variety Duet	2	1.9±1.1	8.9±3.9	31.1±10.4	20.0±11.8
2	w/p Moscow region	1	1.1±0.2	3.3±1.5	15.6±6.3	9.5±5.1
5	w/p Kostroma region	1	2.0±1.2	6.7±3.1	19.6±8.1	13.2±8.1
6	w/p Karelia	1–2	1.3±0.4	7.8±2.1	24.4±9.2	16.1±9.8
7	w/p Arkhangelsk region	2	1.5±0.4	11.1±4.2	20.0±7.6	15.6±10.5
8	w/p Karelia	2	1.7±0.6	11.1±5.0	20.0±9.1	15.6±10.5
9	variety Orlovskiy	2	2.4±1.2	8.9±3.3	17.8±6.3	13.4±8.9
10	MF-152	1	2.0±1.3	8.9±4.1	13.3±4.4	11.1±7.7
11	BU-13	1–2	2.2±1.0	8.9±3.8	22.3±8.3	15.6±9.9
12	w/p Moscow region	1	1.5±0.7	4.4±2.1	16.9±6.1	10.7±6.1
13	w/p Voronezh region	1–2	2.0±0.6	6.7±2.9	22.2±8.5	14.5±8.6
14	Pavl. 22-17	2	1.8±1.1	6.7±2.4	31.1±8.0	18.9±10.2
0	Fakelnyy (standard)	3	2.5±1.2	11.1±6.1	33.3±8.9	22.2±13.6
16	w/p Moscow region	2	0.9±0.2	8.9±3.8	31.1±10.8	20.0±11.8
	Fakelnyy (standard), mean	3	2.75±0.9	11.1±5.9	33.3±12.4	22.2±13.6
	LSD_{05}		$F_{calc} < F_{crit}$	5.6	14.1	11.3

Математически достоверных различий по устойчивости растений между изучаемыми сортами не было установлено. Болезнь в течение лета развивалась очень медленно, и лишь перед уходом в зиму на нижних листьях растений можно было наблюдать многочисленные мелкие черные пятна поражения, характерные для изучаемого патогена.

В 2019 году, уже сразу после весеннего отрастания растений костреца безостого, на молодых листьях наблюдалось интенсивное развитие болезни.

Максимального развития поражённость растений костреца безостого возбудителем гельминтоспориоза достигла в период начала созревания семян. Интенсивность развития болезни колебалась от 3.3% до 11% (табл. 1). Согласно полученным данным, по устойчивости к изучаемому патогену было выделено два образца (№2 и №12), математически достоверно превышающие стандартный сорт

Факельный по этому признаку. Интенсивность развития болезни составила 3.3% и 4.4% против 11.1% у стандарта соответственно (табл. 1).

По сравнению с 2019 г., в 2020 году было отмечено усиление поражения травостоев изучаемого материала. Интенсивность развития пятнистости на сорте Факельный составила 33.3%, что в три раза выше, чем в 2019 году. Подобная тенденция была зафиксирована и на других сортообразцах.

В 2020 году в меньшей степени страдали от возбудителя гельминтоспориоза образцы №2 и №12. В среднем за 2 года их поражённость на 12.7% и 11.5% соответственно, была ниже, чем у стандартного сорта Факельный. Следует отметить, что листья у выделенных злаков отличались повышенной опушенностью и жесткостью. Дальнейшие исследования по изучению морфологических и генетических аспектов устойчивости растений будут продолжены.

Заключение

На искусственном инфекционном фоне, согласно полученным результатам, было выделено два образца, превышающих стандартный сорт Факельный в среднем на

12% по устойчивости к возбудителю гельминтоспориоза, и, следовательно, их можно рекомендовать для включения в селекционный процесс.

Библиографический список (References)

- Доспехов ММ (2011) Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). М.: Альянс. 350 с.
- Косолапов ВМ, Шамсутдинов ЗШ (2015) Генетические ресурсы кормопроизводства. *Вестник российской академии наук* 85(1): 19–22. <https://doi.org/10.7868/S0869587315010077>
- Косолапов ВМ, Шамсутдинов ЗШ (2015) Использование генетических ресурсов для селекции инновационных сортов кормовых культур. *Вестник российской академии наук* 85(3): 224–232. <https://doi.org/10.7868/S0869587315030081>
- Пуца НМ, Разгуляева НВ, Костенко НЮ, Соложенцева ЛФ (1999) Методические рекомендации по изучению устойчивости кормовых культур к возбудителям грибных болезней на полевых инфекционных фонах. М.: Россельхозакадемия. 39 с.
- Шамсутдинов ЗШ (2014) Селекция кормовых культур: достижения и задачи. *Сельскохозяйственная биология* 6: 36–45. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2014.6.36ru>

- Ali S, Francl LJ (2014) A differential medium for discriminating between *Drechslera bromi* (Died.) Shoemaker and *D. tritici-repentis* (Died.) Shoemaker. *Pakistan J Phytopathol* 26 (02): 207–212
- Belanger G, Rochette P, Castonguay Y, Bootsman A, et al. (2002) Climate change and winter survival of perennial forage crops in eastern Canada. *Agron J* 94(5):1120–1130. <https://doi.org/10.2134/agronj2002.1120>
- Casler MD, Vogel KP, Balasko JA, Berdahl JD et al. (2000) Genetic progress from 50 years of smooth bromegrass breeding. *Crop Sci* 40 (1): 13–22 <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.40113x>
- Hakala K, Hannukkala A, Huusela-veistola E (2011). Pests and diseases in a changing climate a major challenge for Finnish crop production. *Agr Food Sci* 20(1): 3–14. <https://doi.org/10.2137/145960611795163042>
- Wilkins PW, Humphreys MO (2003). Progress in breeding perennial forage grasses for temperate agriculture. *J Agr Sci* 140 (2):129–150 <https://doi.org/10.1017/S0021859603003058>

Translation of Russian References

- Dospikhov MM (2011) [Field experiment technique (with the basics of statistical processing of research results)]. Moscow: Alyans. 350 p. (In Russian)
- Kosolapov VM, Shamsutdinov ZSH (2015) [Genetic resources for selecting innovative feed crop varieties]. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Nauk* 85(1): 19–22 (In Russian) <https://doi.org/10.7868/S0869587315010077>
- Kosolapov VM, Shamsutdinov ZSH (2015) [The use of genetic resources for the selection of innovative varieties of forage crops]. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Nauk* 85(3): 224–232 (In Russian) <https://doi.org/10.7868/S0869587315030081>

- Putsa NM, Razgulyayeva NV, Kostenko NYU, Solozhentseva LF (1999) [Methodical recommendations for studying the resistance of forage crops to causative agents of fungal diseases in the field of infectious backgrounds]. Moscow: Rosselkhozakademiy. 39 p. (In Russian)
- Shamsutdinov ZSH (2014) [Forage crops selection: progress and challenges]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya* 6: 36–45. (In Russian) <http://doi.org.10.15389/agrobiol.2014.6.36rus>

SUSTAINABILITY ASSESSMENT OF THE RESISTANCE OF SMOOTH BROMEGRASS
VARIETIES TO THE CAUSATIVE AGENT OF HELMINTHOSPORIOSIS
ON AN ARTIFICIAL INFECTIOUS BACKGROUND

N.Yu. Kostenko

All-Russian Williams Research Fodder Institute, Lobnya, Moscow region, Russia

**corresponding author, e-mail: kostenko86@yandex.ru*

Smooth bromegrass *Bromopsis inermis* is a widespread perennial grass that serves as a high quality animal feed and is characterized by high frost resistance. The main direction in breeding work with this grass is developing varieties with high seed productivity and with increased resistance to diseases. The research was carried out using an artificial infectious background in the immunology laboratory in FWRC FPA (previously, the All-Russian Williams Fodder Research Institute) in Lobnya, Mytishchi district, Moscow region, in 2018–2020. Long-term phytosanitary monitoring of crops showed that the most common disease of this crop is brown leaf spot (helminthosporium). Sixteen samples of cultivated or wild smooth bromegrass from different populations were planted in 2018 in the artificial infectious background to determine their disease resistance. Disease reached its peak at the stage of seed ripening. Two of the tested samples, on average, exceeded the standard variety Fakelny by 12% for resistance to helminthosporiosis according to three-year data. These samples can be recommended for inclusion in the breeding process to create new varieties.

Keywords: Smooth bromegrass, leaf spotting, helminthosporiosis, disease monitoring, assessing progression of the disease

Submitted: 05.08.2020

Accepted: 24.05.2021

BIODIVERSITY OF THE *FUSARIUM* FUNGI CAUSING ROOT ROT OF WINTER CEREALS IN BELARUS

N.A. Krupenko*, S.F. Buga, A.G. Zhukovskiy, I.N. Odintsova,
A.A. Zhukovskaya, T.G. Pilat, V.G. Leshkevich

Institute of plant protection, Priluki, Minsk district, Belarus

*corresponding author, e-mail: krupenko_natalya@mail.ru

Fusarium fungi are the main causal agents of root rot of winter cereals in Belarus. As many as 12 different species were identified, with occurrence being dependent on the cereal host species and weather conditions during the growing season. Lack of precipitation from April to July led to decreasing fungal biodiversity. *Fusarium* pathogen complex on wheat roots was formed by *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, whereas *F. equiseti* and *F. oxysporum* prevailed on triticale and rye, and *F. solani*, *F. avenaceum* and *F. equiseti* dominated on barley root systems. The infestation of root with *F. oxysporum* increased under dry conditions. In contrast, *F. culmorum* was isolated from root system of wheat and triticale more frequently when rainfall was sufficient. For the first time, *F. cerealis* and *F. tricinctum* were isolated from triticale, and *F. cerealis* from rye only, in the Republic of Belarus.

Keywords: *Fusarium* root rot, species composition, pathogen complex, occurrence frequency, weather conditions

Submitted: 02.12.20

Accepted: 10.06.2021

Introduction

Root rot is one of the most widespread diseases of winter cereal crops in many regions of the world (Fernandez et al., 2007; Tunali et al., 2008; Grigoryev, 2012b; Moya-Elizondo et al., 2015; Kolomiets, 2016; Xu et al., 2018). Depending on disease aetiology, several kinds of the root rot are distinguished, with differing prevalence in different regions of cultivation (Paulitz et al., 2002; Cromley et al., 2006; Grigoryev, 2012b). Yield losses due to the root rot average 9% , but in years of intensive disease development, they can be as high as to 35% (Paulitz et al., 2002; Poole et al., 2013).

The *Fusarium* root rot is the most widespread and harmful under conditions typical of Belarus (Buga et al., 2000; Sklivenok, 2015; Krupenko et al., 2016). The fungus *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker in certain years also joins the pathogen complex of fungi causing the disease. Its prevalence may reach 30% at the period of earing, followed by a significant decrease due to antagonistic interactions among the fungi (Sklivenok, 2015).

The importance of studies of fungi in the genus *Fusarium* Link is acknowledged around the world because of their

presence in numerous agricultural crops, high harmfulness, and production of the mycotoxins which are dangerous to the health of humans and domestic animals (Zinedine et al., 2007; Marin et al., 2010; Pestka, 2010). In cereal crops, this problem is augmented by recent changes of species composition of the plant pathogenic fungi, which can be linked to climate change (Tunali et al., 2008; Moya-Elizondo et al., 2011).

Investigation of species composition of the fungi causing root rot in winter cereals is performed in Belarus since the end of the XX century (Buga et al., 2000). Most studies focused on the winter wheat, which is the most widely grown crop in the republic. Yet, during the last 20 years, there have been changes in species composition for the pathogens, with previously infrequent species becoming the prevailing ones (Sklivenok, 2015; Krupenko, Kryzhanovskaya, 2017). To forecast the harmfulness of the root rot fungi and to develop measures to protect crops from the disease, species composition of its causative agents needs to be thoroughly examined.

Materials and Methods

To analyze species composition of the root rot pathogens of winter cereal crops, surveys of wheat, triticale, rye, and barley stands were performed in 2018–19. The territory of Belarus extends for 650 km from west to east; therefore, each crop was sampled in western, central and eastern parts of the country to account for possible geographic variation. Both plants with and without root rot symptoms (10 plants per sample) were collected at the stage of the wax ripeness (Table 1).

The samples were dried and stored refrigerated. The fungi of the genus *Fusarium* were isolated as follows. The roots were rinsed with tap water for one hour, cut into pieces 1–1.5

cm long, disinfected by immersion into 1% solution of sodium hypochlorite for 15–20 sec, rinsed twice with sterile distilled water, and placed between layers of sterile blot paper. Then the samples were placed in Petri dishes onto potato sucrose agar (PSA) with addition of Triton X-100 and 5% streptomycin. The dishes were incubated for 10 days at 22 °C, then the grown colonies of the *Fusarium* fungi were transferred to PSA in glass tubes. Micro- and macromorphology were used for species identification according to Gerlach & Nirenberg (1982).

Incidence level of each species was estimated as a percentage of its isolates among the total number of the

Table 1. Information on the origin of the samples of winter cereals and number of *Fusarium* fungi included in present study

Geographic zone of Belarus	Region	District	Crop	Number of <i>Fusarium</i> isolates	
				2018	2019
Eastern	Mogilev	Gorki	wheat	117	3
			triticale	40	13
			rye	23	3
			barley	-	10
Central	Minsk	Minsk	wheat	198	1
			triticale	11	7
			rye	16	17
Western	Grodno	Schuchin	wheat	45	2
			triticale	35	7
	Brest	Kobrin	rye	29	10

Fusarium fungi colonies in each sample and averaged estimates were calculated. Species diversity was evaluated using the Shannon's index according to the formula

$$H_w = -\sum p_i * \ln(p_i),$$

where p_i is the frequency of the given phenotype in the population (Kolmer et al., 2003).

Results

In April–July of 2018, the air temperature and precipitation levels were elevated. In 2019, the air temperature at the whole Belarus territory exceeded the average perennial values while the precipitation was below normal, especially in the western part of the country (Grodno region), with a total precipitation during four months of 167.9 mm (vs normal 264.0 mm). As a result, in 2018 the conditions favored increased diversity of the *Fusarium* fungi, as can be seen from rather high Shannon's index values: 2.83 (rye), 2.92 (triticale), and 4.19 (wheat). In 2019, deficiency of precipitation resulted in lower fungal diversity: 0.22 (wheat), 0.81 (barley), 1.91 (triticale), and 2.02 (rye).

The core group of the root rot pathogen complex was made up by *F. culmorum* and *F. avenaceum*, as well as by *F. equiseti*

and *F. oxysporum* in winter wheat; *F. equiseti* and *F. oxysporum* in triticale and rye; and *F. solani*, *F. avenaceum*, and *F. equiseti* in barley (Table 2).

Incidence levels of *F. avenaceum* reached 33.3%, 20.0%, 9.5% and 4.7% of the total fungal complex in wheat, barley, rye and triticale stands, respectively. The highest level of *F. culmorum* was in wheat (up to 30.9%) and triticale (up to 16.9%) under the conditions of sufficient humidity.

Besides the aforementioned species, *F. cerealis*, *F. graminearum*, *F. poae* (Peck) Wollenw., *F. sambucinum* Fuckel, *F. semitectum* Berk. & Ravenel, *F. sporotrichioides* Sherb. and *F. tricinctum* (Corda) Sacc. were also found in root system, with incidence levels depending upon the crop.

Table 2. Species composition of the *Fusarium* fungi on the root system of winter cereals

Species of <i>Fusarium</i>	Incidence level, %						
	wheat		triticale		rye		barley
	2018 г.	2019 г.	2018 г.	2019 г.	2018 г.	2019 г.	2019 г.
<i>F. avenaceum</i>	18.5±5.9	33.3±33.3	6.1±6.1	9.5±9.5	4.7±0.9	2.0±2.0	20.0
<i>F. cerealis</i>	4.2±4.2	0.0	0.9±0.9	0.0	2.1±2.1	2.0±2.0	0.0
<i>F. culmorum</i>	30.9±11.4	0.0	16.9±14.3	9.5±9.5	5.3±2.7	10.0±10.0	0.0
<i>F. equiseti</i>	5.8±3.2	33.3±33.3	30.2±18.3	34.4±10.1	32.1±16.1	18.6±15.8	20.0
<i>F. graminearum</i>	0.2±0.2	0.0	0.0	0.0	1.4±1.4	0.0	0.0
<i>F. oxysporum</i>	6.9±3.0	16.7±16.7	36.0±15.8	28.9±21.7	28.6±5.9	49.8±25.2	0.0
<i>F. poae</i>	0.0	0.0	1.7±1.7	0.0	2.6±1.3	0.0	0.0
<i>F. sambucinum</i>	0.0	0.0	1.7±1.7	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>F. semitectum</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1±2.1	2.0	0.0
<i>F. solani</i>	2.3±1.3	16.7±16.7	0.8±0.8	0.0	4.7±0.9	0.0	50.0
<i>F. sporotrichioides</i>	6.0±3.9	0.0	4.0±2.7	7.7±7.7	14.4±8.5	13.7±13.7	0.0
<i>F. tricinctum</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1±2.1	2.0±2.0	0.0
<i>Fusarium</i> spp.*	25.3±1.9	0.0	1.8±0.9	9.9±9.9	0.0	0.0	10.0

* unidentified species from different sections

Discussion

Results of this research indicate that formation of *Fusarium* root rot pathogens' complex is largely influenced by weather conditions during the vegetation period. Higher precipitation level, resulted in higher species diversity of the *Fusarium* fungi. The weather may also promote certain species over other species. Our study has confirmed that dry and hot years

are beneficial for *F. oxysporum*, while cold and humid years favor to *F. culmorum* (Grigoryev, 2012a; Poole et al., 2013).

Species diversity of fungi is known to vary greatly even within a limited area (Xu, Nicholson, 2009; Khemir et al., 2020), leading to considerable changes in the prevailing species range, which determine harmfulness of plant diseases. This explains why monitoring of the composition of root rot

fungi species complexes and identifying dominant species are essential for improving plant protection. In Belarus, the species composition of causative agents of Fusarium root rot is changing. In the beginning of the first decade of XXI century, main root rot pathogens of winter wheat, rye and triticale were *F. oxysporum*, *F. culmorum* and *F. sporotrichiella* (Buga et al., 2000). Ten years after, *F. oxysporum* was still prevailing but importance of *F. avenaceum* and *F. equiseti* has also increased (Sklimenok, 2015) and in certain years, *F. culmorum* and *F. solani* were frequent (Sklimenok, 2015; Krupenko, Kryzhanovskaya, 2017). In the present study conducted in

2018–2019, the dominant species were *F. avenaceum* and *F. culmorum*, as well as *F. equiseti* and *F. oxysporum* (under conditions of rainfall deficiency). Differences in the prevailing species of *Fusarium* were also found between the winter crops. In particular, in triticale and rye the dominating species of the pathogens' complex were *F. equiseti* and *F. oxysporum*, while in barley those were *F. solani*, *F. avenaceum*, and *F. equiseti*.

Two pathogen species have been isolated for the first time in Belarus from the root system of winter triticale (*F. cerealis* and *F. tricinctum*) and rye (*F. cerealis*), which were previously reported in winter wheat only (Sklimenok, 2015).

References

- Buga SF, Ushkevich LA, Loban SV, Boyarchuk VE, Radyna AA (2000) [Incidence of *Fusarium* fungi and composition of *Fusarium* complexes in agrophytocenoses of winter cereal crops in the Republic of Belarus]. *Zaschita rasteniy: sbornik nauchnykh trudov* 24:55–64 (In Russian)
- Cromley MG, Parkes RA, Fraser PM (2006) Factors associated with stem base and root diseases of New Zealand wheat and barley crops. *Austral Plant Pathol* 35:391–400. <https://doi.org/10.1071/AP06032>
- Fernandez MR, Basnyat P, Zentner RP (2007) Response of common root rot in wheat to crop management in eastern Saskatchewan. *Can J Plant Sci* 87:953–963. <https://doi.org/10.4141/cjps07005>
- Gerlach W, Nirenberg H (1982) The genus *Fusarium* – a pictorial atlas. Berlin: Kommissionsverlag Parey. 406 p.
- Grigoriev MF (2012a) [Studying of pathogenic complexes of causal agents of the most widespread root rot types of cereal crops in Central Non-black Earth of Russia]. *Izvestiya TSCChA* 2:111–125 (In Russian)
- Grigoriev MF (2012b) [Types of root rot of cereal crops and pathogenic complexes of their causal agents in Central Non-black Earth of Russia]. *Izvestiya TSCChA* 87–100 (In Russian)
- Khemir E, Chekali S, Moretti A, Gharbi MS et al (2020) Impacts of previous inoculum of *Fusarium culmorum* in soil, and development of foot and root rot of durum wheat in Tunisia. *Phytopath Mid* 59(1): 187–201. <https://doi.org/10.14601/Phyto-10827>
- Kolmer JA, Long DL, Kosman E, Hughes ME (2003) Physiologic specialization of *Puccinia triticina* on wheat in the United States in 2001. *Plant Dis* 87:859–866. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.7.859>
- Kolomiets TM, Pankratova LF (2016) [Pathogenic complex of wheat root rot causal agents in different regions of Russia]. *Zaschita I karantin rasteniy* 2:37–40 (In Russian)
- Krupenko NA, Kryzhanovskaya IN (2017) [Complex of *Fusarium* fungi causing root rot of winter wheat]. *Zaschita vasteniy: sbornik nauchnykh trudov* 41:160–166 (In Russian)
- Marin DE, Taranu I, Burlacu R, Tudor DS (2010) Effects of zearalenone and its derivatives on the innate immune response of swine. *Toxicon* 56(6): 956–963. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.06.020>
- Moya-Elizondo E, Arismendi N, Castro MP, Doussoulin H (2015) Distribution and prevalence of crown rot pathogens affecting wheat crops in southern Chile. *Chilean J Agr Res* 75(1):78–84. <https://doi.org/10.4067/s0718-58392015000100011>
- Moya-Elizondo EA, Rew LJ, Jacobsen BJ, Hogg AC et al (2011) Distribution and prevalence of *Fusarium* crown rot and common root rot pathogens of wheat in Montana. *Plant Dis* 95(9):1099–1108. <https://doi.org/doi:10.1094/pdis-11-10-0795>
- Paulitz TC, Smiley RW, Cook RJ (2002) Insights into the prevalence and management of soilborne cereal pathogens under direct seeding in the Pacific Northwest, USA. *Can J Plant Pathol* 24(4):416–428. <https://doi.org/10.1080/07060660209507029>
- Pestka JJ (2010) Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch Toxicol* 84(9):663–679. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0579-8>
- Poole GJ, Smiley RW, Walker C, Huggins D et al (2013) Effect of climate on the distribution of *Fusarium* spp. causing crown rot of wheat in the Pacific Northwest of the United States. *Phytopath* 103:1130–1140. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-12-0181-R>
- Sklimenok NA (2015) [Complex of fungi that parasitize on winter wheat and measures for limitation their harmfulness]. *Abstr. Dr. Biol. Thesis*. Priluki. 23 p. (In Russian)
- Tunali B, Nicol JM, Hodson D, Uçkun Z et al (2008) Root and crown rot fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. *Plant Dis* 92:1299–1306. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-9-1299>
- Xu X, Nicholson P (2009) Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. *An Rev Phytopath* 47(1):83–103. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081737>
- Xu F, Yang G, Wang J, Song Y et al (2018) Spatial distribution of root and crown rot fungi associated with winter wheat in the North China Plain and its relationship with climate variables. *Front Microbiol* 9:1054. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01054>
- Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, Mañes J (2007) Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food Chem Toxicol* 45(1): 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.030>

ВИДОВОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM*, ВЫЗЫВАЮЩИХ КОРНЕВУЮ ГНИЛЬ ОЗИМЫХ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР В БЕЛАРУСИ

Н.А. Крупенько*, С.Ф. Буга, А.Г. Жуковский, И.Н. Одинцова, А.А. Жуковская, Т.Г. Пилат, В.Г. Лешкевич
Институт защиты растений, аг. Прилуки, Минский р-н, Беларусь

* ответственный за переписку, e-mail: krupenko_natalya@mail.ru

Представлены результаты изучения видового состава грибов рода *Fusarium*, являющихся основными возбудителями корневой гнили озимых зерновых культур (пшеница, рожь, тритикале, ячмень). Выявлено не менее 12 разных видов, частота встречаемости которых варьировала в зависимости от вида зерновой культуры и погодных условий в период сезона вегетации. Основу комплекса патогенов грибов-возбудителей корневой гнили на озимой пшенице (в порядке уменьшения частоты встречаемости) составили виды *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*. На тритикале и ржи преобладали грибы *F. equiseti* and *F. oxysporum*, на ячмене – *F. solani*, *F. avenaceum* and *F. equiseti*. Установлено, что в условиях дефицита осадков видовое разнообразие снижалось. Частота встречаемости гриба *F. culmorum* на пшенице и тритикале была выше в год с избыточным увлажнением, тогда как *F. equiseti* and *F. oxysporum* на озимых тритикале и ржи она была высокой независимо от года, при этом доля последнего увеличивалась в условиях недостатка осадков. Впервые в Беларуси из корневой системы озимых тритикале и ржи выделен *F. cerealis*, а также *F. tricinctum* – из озимой ржи.

Ключевые слова: фузариозная корневая гниль, видовой состав, комплекс патогенов, частота встречаемости, гидротермические условия

Поступила в редакцию: 02.12.20

Принята к печати: 10.06.2021

О ПРОШЕДШЕМ МЕРОПРИЯТИИ: ПЕРВЫЙ ВИРТУАЛЬНЫЙ СЪЕЗД ОБЩЕСТВА ПАТОЛОГИИ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

С 1967 года Общества патологии беспозвоночных (SIP) объединяет членов из различных научных областей в рамках единой дисциплины – патологии беспозвоночных. SIP имеет 7 Отделений: Бактерий, Болезней полезных беспозвоночных, Грибов, Микробиологической борьбы, Микроспоридий, Нематод и Вирусов, которые развивают научные знания патологии беспозвоночных животных, включая экономически значимые виды.

В связи с текущей пандемией, Обществом принято решение провести ежегодное собрание в онлайн-формате с 28 июня по 2 июля 2021 г. в Туре (Франция). Как обычно, была представлена захватывающая научная программа, освещающая последние фундаментальные и прикладные исследования патологии беспозвоночных, включая микробиологическую борьбу, болезни полезных беспозвоночных и достижения фундаментальной науки в области паразито-хозяйинных отношений. Основные события данного мероприятия включали симпозиумы, организованные Отделениями Общества, и пленарный симпозиум на

тему «Современные вызовы микробиологической борьбы со *Spodoptera frugiperda*». Симпозиумы проходили в режиме реального времени, тогда как предварительно записанные секционные доклады, а также стендовые доклады, были доступны онлайн на протяжении всего мероприятия, и специальные сессии были организованы для их обсуждения.

Мероприятие посетило 294 участника из 40 стран, включая 11 исследователей из России. Среди них, 8 докладов на тему разнообразия и взаимоотношений облигатных внутриклеточных паразитов (микроспоридий и вирусов) с насекомыми-хозяевами были сделаны сотрудниками Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений.

Доклад А.С. Румянцевой на тему «Восприимчивость гусениц лугового мотылька к микроспоридиям из чешуекрылых» отмечен наградой Отделения Микроспоридий как лучшее студенческое выступление.

PAST CONFERENCE: FIRST VIRTUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY

Since 1967, the Society for Invertebrate Pathology (SIP) has brought together members from diverse scientific backgrounds under the unified discipline of invertebrate pathology. The SIP has 7 Divisions: Bacteria, Diseases of Beneficial Invertebrates, Fungus, Microbial Control, Microsporidia, Nematode and Virus, which promote scientific knowledge of pathology of invertebrate animals, including pest species and species of commercial interest.

Due to the current pandemics, the Society for Invertebrate Pathology has decided to hold its 53th annual meeting online from 28th of June to 2nd of July 2021 in Tours, France. As always, the meeting has offered an exciting scientific program exploring the latest fundamental and applied findings in invertebrate pathology, including microbial control, diseases of beneficial invertebrates, and advances in fundamental research on host-pathogen interactions. Among the scientific highlights,

the society's divisions have put together stimulating symposia and the plenary symposium has been on 'Current challenges for the microbial control of *Spodoptera frugiperda*'. All symposia have been held live on the zoom platform and pre-recorded contributed talks and posters posted for viewing prior to live chat sessions.

As many as 294 participants from 40 countries have attended the meeting, including 11 researchers from Russia. Among those, 8 contributions have been from All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, addressing the diversity and interactions of obligate intracellular parasites (microsporidia and viruses) with their insect hosts.

The talk of A.S. Rumiantseva titled "Susceptibility of beet webworm larvae to microsporidia from Lepidoptera" has been awarded by Microsporidia Division as the best student presentation.

Научное издание

Индекс 36189

Подписано к печати 5 июля 2021 г.

Формат 60x84/8. Объем 7 1/2 п.л. Тираж 250 экз. Заказ

Индекс 36189