

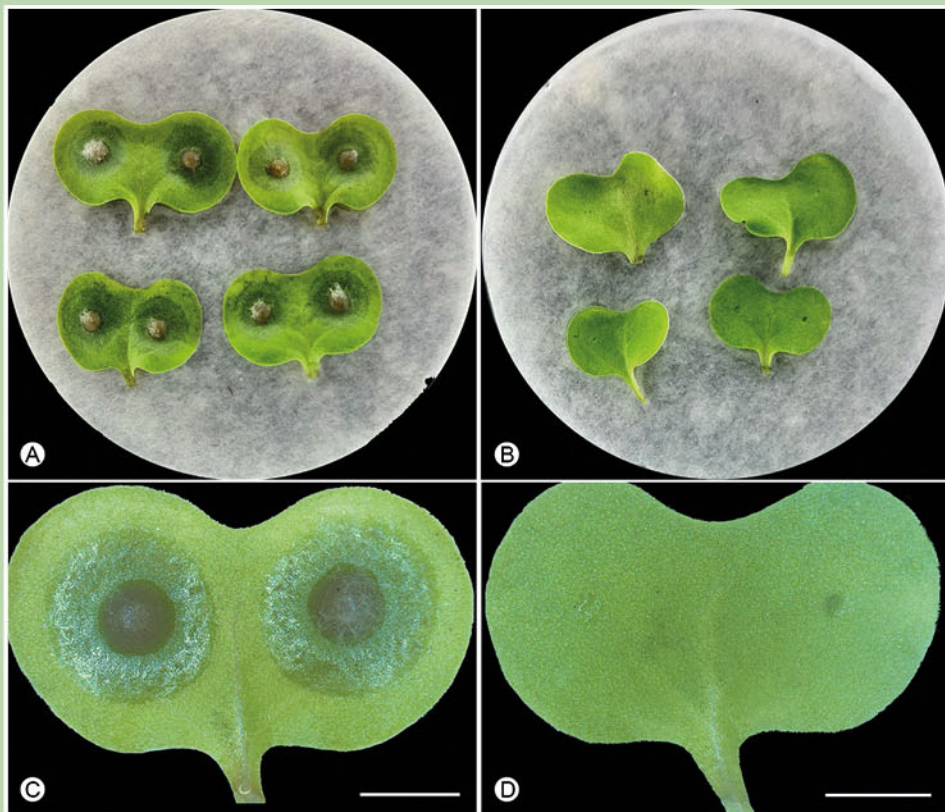


ISSN 1727-1320 (Print),
ISSN 2308-6459 (Online)

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

2022 TOM VOLUME 105 ВЫПУСК ISSUE 3



Санкт-Петербург
St. Petersburg, Russia

Cover page: figure 5 from Gomzhina M.M., Gasich E.L. (p. 144) [orig.]

На обложке: рисунок 5 из статьи Гомжиной М.М., Гасич Е.Л. (стр. 144) [ориг.]

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

2022 TOM 105 ВЫПУСК 3
 VOLUME ISSUE

Санкт-Петербург
St. Petersburg, Russia
2022

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

Корректоры англоязычных текстов: Ю.Я. Соколова, Ю.С. Токарев

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, CrossRef, ROAD и Sherpa/Romeo

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

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

Белюсов 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”

Кюссон М., PhD, Канада

Лаврищев А.В., дсxn, СПбГАУ

Лаптиева А.Б., дбн, ООО “ИЦЗР”

Лунева Н.Н., кбн, ВИЗР

Лысов А.К., ктн, ВИЗР

Мавроди Д., профессор, США

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

Намятова А.А., кбн, ЗИН

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, академик РАН, ВИЛАР

Синев С.Ю., дбн, ЗИН

Соколова Ю.Я., дбн, США

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

Ответственные редакторы выпуска:

О.С. Афанасенко, Ф.Б. Ганнибал, Н.Н. Лунева, Г.И. Сухорученко

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

Мини-обзоры / Mini-reviews**Directions for improvement of the herbicide assortment in Russia at the beginning of the 21st century****A.S. Golubev**

Основные направления совершенствования ассортимента гербицидов в России в начале 21 века

A.S. Golubev 104

Полнотекстовые статьи / Full-text articles**Резистентность к инсектицидам комнатной мухи *Musca domestica*****в центре Европейской части России****Т.А. Давлианидзе, О.Ю. Еремина, В.В. Олифер**Resistance to insecticides of housefly *Musca domestica* in the center of the European part of Russia

T.A. Davlianidze, O.Yu. Eremina, V.V. Olfir 114

Факторы повышения индуцирующей активности двух штаммов *Bacillus subtilis***в защите пшеницы от возбудителей темно-бурой пятнистости (*Bipolaris sorokiniana*)****и бурой ржавчины (*Puccinia triticina*)****И.И. Новикова, Э.В. Попова, Н.М. Коваленко, И.Л. Краснобаева**The factors increasing the inducing activity of two *Bacillus subtilis* strains in the protection of wheat against pathogens of spot blotch *Bipolaris sorokiniana* and leaf rust *Puccinia triticina*

I.I. Novikova, E.V. Popova, N.M. Kovalenko, I.L. Krasnobaeva 122

Plenodomus* species infecting oilseed rape in Russia*М.М. Гомжина, Е.Л. Гасич**Виды *Plenodomus*, поражающие рапс в России

M.M. Gomzhina, E.L. Gasich 135

О прошедшем мероприятии: Второй виртуальный съезд Общества патологии беспозвоночных**Past Conference: Second Virtual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology 148****О прошедшем мероприятии: XVI съезд Русского энтомологического общества****Past Conference: XVI Meeting of Russian Entomological Society 149****О прошедшем мероприятии: XI Международная конференция****«Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем»****Past Conference: XI International Conference****«Biological Plant Protection – the Basis for Agroecosystem Stabilization» 151****Памяти Ирмы Викторовны Исси****In memory of Irma V. Issi 152**

DIRECTIONS FOR IMPROVEMENT OF THE HERBICIDE ASSORTMENT IN RUSSIA AT THE BEGINNING OF THE 21ST CENTURY

A.S. Golubev

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

e-mail: golubev100@mail.ru

Changes in herbicides recommended for the use in Russian Federation between 2000 and 2022 are analyzed. The main directions of improving chemical control of weeds are identified based on the integration of domestic market with the world market. Only a limited number of active ingredients was introduced in Russia during the last decade, including pinoxaden, thiencazuron-methyl, piroxulam, sodium flucarbazone, topramezone, diclosulam, tembotrione, and metamifop. Improved formulations of herbicides such as colloidal solution concentrate with increased penetrability due to the particle size reduced by an order of magnitude became widely available. Premix herbicides were developed based on tribenuron-methyl, metsulfuron-methyl, florasulam, clopiralid, picloram, imazamox, imazapyr, imazethapyr, etc. Parameters for herbicide application were optimized to consider phenology of weeds. Novel technologies were implemented, such as growing hybrids resistant to certain active ingredients to allow their application during crop vegetation.

Keywords: herbicides, weeds, active ingredients, formulations, combined herbicides

Submitted: 30.06.2022

Accepted: 30.08.2022

Introduction

Weeds are ubiquitous and persistent members of agricultural ecosystems, as opposed to the other harmful organisms, namely pests and plant disease agents, which become prevalent only in certain years when conditions are favorable for their development and spreading. Serious negative effects of weeds due to their competition with crops for light, water and mineral compounds are well known. In China, which is the largest pesticide manufacturer in the world, the herbicides add up to as much as one third of the total amount of the synthetic pesticides. While the production of insecticides is decreasing, there is an increasing trend in herbicide production (Jin et al., 2010).

Large scale application of herbicides in the second half of the 20th century facilitated the emergence of resistant weed populations, which made the researchers to seek alternative methods of weed control (Owen, 2016; Davis, Frisvold, 2017; Peterson et al., 2018; Gage, Schwartz-Lazaro, 2019; Beckie et al., 2019). The first instance of biological weed control was reported in 1971; since the end of the last century, researchers were enthusiastic by the development of about this approach (Umer et al., 2022). Unfortunately, the volumes of applied bioherbicides are still too low to be considered a success (Triolet et al., 2020). Still, we are optimistic about further advances in this field in the near future (Golubev, Berestetskiy, 2021). However, using of synthetic compounds to protect agricultural crops from unwanted plants remains the leading method of control.

The main trend in expanding the array of available herbicides at the early stages of chemical control was the search and commercialization of novel active ingredients with strong toxic action against weeds. Meanwhile, other factors associated with their application were not considered, leading to serious health problems in applicators, as well as

in environmental contamination. Subsequently, the vector of development changed to aim at decreasing the application rates and the probability of negative side-effects on non-target objects (Umetsu, Shirai, 2020; Nagai, 2021).

Historically, the appearance of herbicides with novel mechanisms of action can be divided into the following stages (Umetsu, Shirai, 2020):

1) Before 1980. The discovery of auxin action of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) in 1942 was followed by the studies of herbicide activity of this molecule against the broadleaf plants. Between 1956 and 1975, the photosynthesis inhibitors were found belonging to the groups of urea, triazine and triazinone herbicides. In 1970, inhibitors of cell wall synthesis (dichlobenil), microtubule polymerization (trifluralin), etc, were discovered.

2) Between 1980 and 2000. In 1980, pyridazine was shown to distort carotenoid biosynthesis due to the inhibition of phytyl desaturase (PDS). From 1982 to 1986, glutamine synthase (GS) was proven to be affected by phosphinothricin, which is the active form of glufosinate and bialaphos. In 1986–89, the action of phthalimide herbicides onto protoporphyrinogen IX oxidase (PPO) was confirmed. In 1984, sulfonylurea and imidazolinone herbicides were shown to affect acetolactate synthase (ALS). In 1992–93, the target of triketone herbicide sulcotrione was proven to be 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD). Between 1993 and 2000, it was established that chloroacetamide affects very-long-chain fatty acid elongase (VLCFAE). Clomazone, which is the inhibitor of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate (DXP) synthase in 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway, was the last herbicide developed during that period. No herbicides with novel modes of action were reported during the following 30 years between the late 1980-s to 2017.

3) After 2018. During the last three years, information concerning three herbicides with novel mechanisms of actions and molecular targets became available. These include cinmethylin that interferes with fatty acid thioesterase (FAT), cyclopyrimorate that interferes with homogentisate solanesyltransferase (HST), and tetflupyrolimet that interferes with *t* dihydroorotate dehydrogenase (DHODH). With no doubt, this is an important milestone in the herbicide development, essential for suppression of herbicide-resistant weed biotypes in the future (Umetsu, Shirai, 2020).

Currently, in spite of remarkable amount of research of the last decade in the field of pesticide development with the use of modern break-through technologies, the introduction

of new active ingredients into agricultural production remains infrequent (Kao-Kniffin et al., 2013; Umetsu, Shirai, 2020). At the same time, the global tendency of development of chemical plant protection means against weed is gradually changing from the search for novel active ingredients to the design of improved hi-tech formulations and combinations of ingredients proven to be effective, optimization of regulations (including the extension for period of application), and development of novel control technologies (including cultivation of genetically modified (GM) crops) (Nishimoto, 2019).

The goal of the present paper is the analysis of changes in the herbicide availability in Russia in 2000–2022 in the context of these changes.

Novel active ingredients

During the last decade, dozens of new herbicides with novel active compounds appeared all over the world. Most of them can be classified into the following groups according to their mechanism of action (Umetsu, Shirai, 2020):

1) inhibitors of ALS: propyrisulfuron (Sumitomo Chemical; Zeta-One®), metazosulfuron (Nissan Chemical; Altair®), pyrimisulfan (Kumiai Chemical; Best Partner®) and triafamone (Bayer; Council™ Complete). All of them are intended to protect rice (Sugiura et al., 2021).

2) inhibitors of HPPD: tefuryltrione (Bayer; Mighty-One®), enquinotrione (Kumiai Chemical; Effeeda®), ancotrione-sodium (Ishihara Sangyo Kaisha; Promise®), bicyclopyrone (Syngenta), tolypyralate (Ishihara Sangyo Kaisha; Brucia®). The three former and the two latter are for rice and maize, respectively (Yamamoto et al., 2021; Tsukamoto et al., 2021).

3) inhibitors of PPO: tiafenacil (Dongbu Hannong Chemical), trifludimoxazin (BASF; Tirezor™), cyclopyranil (Kyoyu Agri). These compounds are not in the market yet but the formulations are being developed by these companies.

4) inhibitors of VLCFAE: pyroxasulfone (Kumiai Chemical; Axeev®, Zidua®), ipfencarbazone (Hokko Chemical; Winner®, Fighter®), fenoxasulfone (Kumiai Chemical), dimesulfazet (Nissan Chemical). Pyroxasulfone is used to protect wheat, soya bean and maize, while the other three are for rice (Yamaji et al., 2014; Nakatani et al., 2016a; Nakatani et al., 2016b)

5) auxin-like herbicides: halauxifen-methyl (Dow - Corteva Agriscience; Arylex™) to protect cereals, and florpyrauxifen-benzyl (Corteva Agriscience; Rinskor™) to protect rice (Epp et al., 2016).

6) inhibitors of HST: cyclopyrimorate (Mitsui Chemicals Agro; Cyra®), devised for rice protection (Shino et al., 2018).

7) inhibitors of DHODH: tetflupyrolimet (FMC), used to protect rice (Dayan FE, 2019).

8) inhibitors of FAT: cinmethylin (BASF; Luximo™) against the weeds of cereal crops (Campe et al., 2018).

A safener designed in 2019 by Syngenta, named metcamifen, should also be mentioned. It is used in rice farming with herbicides based on clodinafop-propargyl (Brazier-Hicks et al., 2020; Umetsu, Shirai, 2020).

In Russian Federation, formulations on the basis of all these active ingredients are not allowed for industrial application yet, although many of them are the subject of intensive examination.

Among the herbicides that are currently registered for use in Russian Federation, as many as 8 active ingredients have

been introduced in Russia during the last decade. Those were developed between 2000–10 and are commonly used around the world.

Pinoxaden (available in Russia since 2012) is combined with the safener cloquintocet-mexyl in such formulations as Axial, EC (45 g/l + 11.25 g/l), Axial 50, EC (50 g/l + 12.5 g/l) by Syngenta, and others. It destroys annual monocotyledonous weeds in the stands of grain crops, including the common windgrass *Apera spica-venti* (L.) Beauv., which is among the most harmful weeds (Artemyeva et al., 2021).

Thiencarbazone-methyl (2013) is included as one of several active ingredients in multiple premix herbicides by Bayer Crop Science AG. Some of them are recommended to be used in the maize stands: Maister power®, OD (31.5 g/l foramsulfuron + 1 g/l iodosulfuron-methylsodium + 10 g/l thiencarbazone-methyl + 15 g/l safener cyprosulfamide); Adengo®, SC (225 g/l isoxaflutole + 90 g/l thiencarbazone-methyl + 150 g/l safener cyprosulfamide); Capreno®, SC (345 g/l tembotrione + 68 g/l thiencarbazone-methyl + 134 g/l safener isoxadifen-ethyl) (Bagrinceva et al., 2015; Panfilov et al., 2015; Kashukoev et al., 2019). Others are applied to protect grain crops: Velocity, OD (10 g/l thiencarbazone-methyl + 60 g/l safener mefenpyr-diethyl); Velocity power, WDG (22.5 g/kg thiencarbazone-methyl + 11.3 g/kg iodosulfuron-methylsodium + 135 g/kg safener mefenpyr-diethyl); Velocity super, EC (80 g/l fenoxaprop-P-ethyl + 7.5 g/l thiencarbazone-methyl + 30 g/l safener mefenpyr-diethyl) (Golubev, 2018; Savva et al., 2021a). In 2020, the assortment was expanded by one other herbicide – Conviso® I, OD (50 g/l foramsulfuron + 30 g/l thiencarbazone-methyl), which is intended for growing sugar beet hybrids resistant to this herbicide (see below).

Pyroxulam (2013) is combined with the safener cloquintocet-mexyl in the herbicide Pallas 45, OD (45 g/l + 90 g/l) by Dow AgroSciences. It is used to control annual cereal and some dicotyledonous weeds in the stands of winter and spring wheat (Savva et al., 2014; Kalabashkina et al., 2020).

Flucarbazone-sodium (2013) is found in the herbicides Everest®, WDG (700 g/kg) by Arysta LifeScience и Kentavr, WDG (700 g/kg) by JSC «August» Inc. They are used in winter and spring wheat stands against annual grasses (common wild oat *Avena fatua* L., *A. spica-venti*, green foxtail *Setaria viridis* (L.) Beauv.) and some dicotyledonous weeds such as redroot pigweed *Amaranthus retroflexus* L., wild mustard *Sinapis arvensis* L., back bindweed *Fallopia convolvulus* (L.) A.

Love, shepherd's purse *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik., etc (Makhankova, Golubev, 2017; Osennij et al., 2018).

Topramezone (2014) is a component of the premix formulations by BASF SE, namely Stellar®, SL and Stellar® Plus, SL, contained 160 g/l dicamba и 50 g/l topramezone. They are used in maize stands against annual and some perennial dicotyledonous weeds, including those resistant to 2,4-D, as well as against some annual monocotyledonous weeds (Zbrailov et al., 2014).

Diclosulam (2020) is included into the herbicide Plector, WDG (750 g/kg) by JSC «August» Inc., which is recommended to control annual dicotyledonous plants in the soya bean stands (Golubev, 2021).

Tembotrione (2020) is combined with the safener isoxadifen-ethyl in the herbicide Laudis®, WDG (200 g/kg + 100 g/kg) and the premix formulation Capreno®, SC (345 g/l tembotrione + 134 g/l thiencazuron-methyl + 68 g/l safener isoxadifen-ethyl) by Bayer Crop Science AG. These formulations are used in the maize stands to control annual and some perennial dicotyledonous and monocotyledonous weeds.

Metamifop (2020) is a part of the premix herbicide Nominee® Supreme, SE (100 g/l metamifop + 40 g/l bispyribac-sodium) by Kumiai Chemical Industry CO., LTD. It deserves special attention due to the problem of development of resistance in weeds of *Echinochloa spp.* to

Novel types of formulations

One of the major principles of modern herbicide formulation design is the provision of fast penetration of the active ingredients in weeds. This concerns the substances applied both during crop vegetation (POST – post-emergence) and to the soil (PRE – pre-emergence and PPI – pre-plant incorporated) (Nandula, Vencill, 2015). To provide this possibility, formulators usually exploit adjuvants that are able to increase the efficacy of herbicides belonging to various chemical groups (Stagnari et al., 2007; Marcinkowska et al., 2018; Hao et al., 2019a; Hao et al., 2019b). As a result, adjuvants became widespread in the beginning of 21st century in Russia. In particular, they are crucial for the efficacy of glyphosate and sulfonylurea herbicides. The latter were no longer protected by the copyright, making them more affordable to end users. It is common to design a ready-to-use formulation, but it is not always feasible to integrate all the necessary additives and create a universal composition. Thus, it may be optimal to provide a basic formulation of a pesticide, while specific adjuvants are added in tank mixture depending upon the conditions (Makhankova, Dolgikh, 2020).

About 16% of the total amount of the herbicides allowed to be used in Russian Federation are recommended in tank mixture with adjuvants as surface active agents (SAA). Nowadays, as many as 25 commercial names of SAA are registered on the basis of 9 active ingredients: isodecyl alcohol ethoxylate (Trend 90, L; ETD-90, L; Vivolt, L; Adyu, L; Satellit, L; Dar-90, L; Sigma-90, L; BIT 90, L; Styuart, L; Shans 90, L; Frend, L; LIP, L; PAV, L), the mixture of oil (fatty acid esters) and alkoxyated alcohols-phosphate esters (Dash®, EC), mixtures of mineral oil and fatty alcohols (Korvet, L), polyoxyethylene dodecyl ether (A-100, L), alkylethersulfate, sodium salt (Biopower, SL), ethoxylated monoalkylphenol (Neon 99, VSR; Neonol AF_{9,12}), fatty acid methyl ester mixtures (Amigo® star, EC; Fortuna, L), phosphate ester (Amigo®, SC; Khelper, SC;

the herbicide Nominee®, SE in the rice fields of the Primorye Area (Lukacheva, Kostyuk, 2021a).

Besides the aforementioned compounds, pelargonic acid appeared in Russia as part of the formulation Mohoff, O/W EC (525 g/l) by JSC «August» Inc. Herbicides based on this active ingredient are used abroad in vineyards, potatoes, pumpkins, and several other crops, as well as paths in private gardens, against a wide range of unwanted plants, including the most notorious ones, such as the creeping thistle *Cirsium arvense* (L.) Scop., catchweed bedstraw *Galium aparine* L., etc. (Webber et al., 2014; Travlos et al., 2020; Alvarez et al., 2021; Ganji et al., 2022). In Russia, application of Mohoff is currently recommended only in the private lawns to combat mosses, lichens and unwanted grassy plants.

The list of synthetic herbicides available in Russian Federation was extended in the last 20 years due to the inclusion of formulations based upon active ingredients discovered in the end of the 20th century, namely aclofenfomesafen, diflufenican, flufenacet, amicarbazone, napropamide, pyraflufen-ethyl, prosulfocarb, prosulfuron, flumioxazine, foramsulfuron, cycloxydim, cyhalofop-butyl, ethametsulfuron-methyl (Spiglazova, Dolmatova, 2014; Hryukina, Naumov, 2016; Cherkashin et al., 2016; Bernaz, Polyakov 2020; Tkach et al., 2020; Morohovec et al., 2020; Bajrambekov et al., 2020; Morohovec et al., 2021; Lukacheva, Kostyuk 2021b; Devyatkin et al., 2021).

Miks, L), pinolene (MultiMastr, EC) (Makhankova, Dolgikh, 2020). Using many of these SAA strengthen herbicide action on certain weed species. Study by Makhankova et al. (2013) showed that addition of SAA Adyu, L to the herbicide Bomba, WDG is able to significantly increase the efficiency of treatment against *C. arvense* and *S. arvensis*.

Another way to facilitate penetration of active ingredients into a leaf is the design of innovative formulations. From a historical perspective, there are several phases of herbicide assortment optimization in this direction. Between 1960 and 1980, the main herbicide formulations applied in Russia were soluble powder (sodium salt 2,4-D, DNOC, sodium trichloroacetate), wettable powder (simazine, atrazine), emulsifiable concentrate (EC), water-soluble concentrate (treflan, zellek, fusilade), and water solutions (dialen, basagran).

In the end of the 20th century, alongside with the aforementioned forms, water dispersible granules (grodil, grasp), soluble granules (harmony), suspension concentrate (pyramin, butisan), and water glycol solution (kovboy, kross) were introduced (Petunova AA, Makhankova, 2009). The beginning of the 21st century was marked by appearance of colloid solution concentrate (CSC), oil emulsion concentrate (OEC), and oil dispersion (OD). These formulations are characterized by extremely high penetrability into plant tissue. Their particle sizes are by an order of magnitude smaller compared to classical formulations, such as EC. Notably, Russian crop protection companies could achieve sustainable success in this direction.

Schelkovo Agrohimp JSC developed herbicide Betaren 22, containing 110 g/l desmedipham and 110 g/l phenmedipham, produced as an OEC. In Ryazan Province and Krasnodar Area, biological and economical efficacy of this herbicide was comparable to that of the standard (the same active ingredients

in the form of the EC) and in Volgograd Province, it was even higher, while the active ingredient dosage was decreased by more than 30% (Karakotov et al., 2015).

The same company also designed herbicide Benito containing 300 g/l bentazone in the form of the CSC. When applied under field conditions, it was more effective than the standard application of bentazone as water solution. This allowed decreasing the application rate of the active ingredient by 17.0–37.5% without losing its efficacy (Golubev, 2019).

One of the interesting herbicides that appeared several years ago for household use is Roundup Gel, containing 7.2 g/l isopropylamine salt of the glyphosate acid. It was produced by

the company “Monsanto” in the form of gel. Its distribution and application using a special applicator device improved convenience for the end user (Golubev et al., 2018a).

The need for improvement of the herbicide formulations can also be driven by new safety regulations. For instance, the use of organic solvents traditionally included into the EC became prohibited in the European countries due to stricter toxicological requirements, and this formulation is being replaced by the OD (Knowles, 2008; Gašić et al., 2015). In Russia, the herbicides in the form of OD also became widespread (Savva et al., 2021b; Savva et al., 2022).

Premix herbicides

Premix herbicide formulations that combine several active ingredients is one of the most efficient ways to expand the toolbox of available herbicides, especially in light of the extremely high costs of development, testing, and commercialization of novel active ingredients. That is why the majority of companies which do not belong to the transnational corporations chose this way, together with the design and improvement of herbicide formulations.

An alternative approach to benefit from the joint usage of several herbicides is preparation of a tank mixture prior to application under field conditions. This is, however, less convenient for a user and may cause unexpected antagonistic effects.

The main advantages of premix herbicides are:

1) Extended spectrum of activity due to combination of active ingredients with different mechanism of action (Larina, 2014; Savva et al., 2016; Telezhenko et al., 2019; Golubev, Borushko, 2020; Golubev, Borushko, 2021; Golubev, Chermenskaya, 2021). Experiments in winter wheat displayed a remarkable advantage of premix herbicide Spiker, EC (422 g/l dicamba + 18 g/l florasulam) over a single-compound standard Banvel, SL (480 g/l dicamba) in controlling flixweed *Descurainia sophia* (L.) Webb ex Prantl, common poppy *Papaver rhoeas* L., *F. convolvulus* (L.) A. Love, and *G. aparine* (Tokarev et al., 2016).

Applying combinations of different active ingredients is often helpful in overcoming the problem of herbicide resistance. For instance, extensive use of isoproturon, clodinafop-propargyl, fenoxaprop-ethyl and sulfosulfuron against little seed canarygrass *Phalaris minor* Retz. in India facilitated the appearance and dispersal of resistant populations and made it necessary to explore the suitability of both the tank mixture (pendimethalin + metribuzin) and the ready-to-use premix herbicides based on mesosulfuron-methyl and iodosulfuron (Soni et al., 2021).

2) Increased efficacy of the treatment due to the synergistic interactions between the active ingredients in premix herbicides. For example, the study of susceptibility of perennial weeds, namely bindweed *Convolvulus arvensis* L. and field sowthistle *Sonchus arvensis* L. to the herbicide Kyleo, SL (240 g/l

glyphosate + 160 g/l 2,4-D) Nufarm GmbH & Co KG allowed finding synergism between its active ingredients (Golubev et al., 2017). Noteworthy, similar tank mixtures glyphosate + 2,4-D or dicamba are applied in Canada against the common ragweed *Ambrosia artemisiifolia* L. due to the prevalence of weed populations resistant to glyphosate (Bae et al., 2017).

3) Decrease in negative side effects of each of the herbicide compounds on the environment. One such example is the premix herbicides based on sulfonylurea. Due to their high efficacy, low application rates, and high level of safety for the warm-blooded animals, herbicides of this group became prevalent in Russia at the border of the centuries (Makhankova et al., 2011). With time, however, the post-effect on the subsequent crops in the rotation due to prolonged decomposition in soil also became evident. Since the active ingredients are decomposed with different speed, those with the shorter half-life were used to partially substitute the compounds with the longer half-life. As a result, several combinations were designed such as Allay Light, VDG, containing 391 g/kg metsulfuron-methyl and 261 g/kg tribenuron-methyl, to decrease their residual effects on crops (Chernukha et al., 2011). That approach was common mainly in Russia and other former Soviet Union countries, but not in Western Europe.

Besides the sulfonylurea herbicides (amidosulfuron, metsulfuron-methyl, triasulfuron, chlorsulfuron, sulfometuron-methyl), other active ingredients such as clopyralid, picloram, imazamox, imazapyr, imazethapyr etc (Borushko et al., 2014; Stetsov, 2015; Kolupayev et al., 2019; Spiridonov et al., 2019; Saito et al., 2010) may also affect subsequent crops. Many of these compounds were exploited as the basis for effective premix herbicides (Spiridonov, Shestakov, 2013; Golubev et al., 2015; Dadayeva, Filonenko, 2016; (Makhankova et al., 2020).

It can also be noted that a combination of active ingredients may sometimes help decreasing both phytotoxicity for the crop under protection and residual effect throughout the crop rotation. One such example is Harmony Classic, WDG which is composed of thifensulfuron-methyl + chlorimuron-ethyl (Stetsov et al., 2018).

Extension of application period

As a rule, herbicide applications are recommended at the early stages of crop growth and development, or even before the seedlings' emergence because weeds at the early stages of their development are more susceptible to herbicides. Moreover, modern ideas concerning the planning of protective measures are based on the concept of critical timing of weed

removal (CTWR) when treatments need to be applied to prevent yield decrease due to competition between the crop and weed plants (Nedeljković et al., 2021; Beiermann et al., 2022; Soltani et al., 2022). As a result, developmental stages have been established for each crop when they were routinely treated with herbicides. For example, before the end of the

20th century treatments of cereals with 2,4-D and dicamba were timed to the tillering because of susceptibility of these crops. As soon as the sulfonylurea herbicides appeared, the application period became extended and the treatments against dicotyledonous weeds were performed from the stage of 2–3 true leaves to the stage of stem extension (1–2 nodes) (Makhankova, Dolzhenko, 2013).

In spite of the fact that later treatments are generally considered to be less effective compared to the earlier treatments (Grzanka et al., 2022), in the beginning of 21st century the extension for application period tended to continue. An important aspect which started to attract attention of researchers was treatment timing tied to the phenology of late appearance of some weed species (Sadovnikova et al., 2021). The aim of such treatments is the avoidance of soil contamination with weed seeds after their maturation (Hill et al., 2016), which is critically important for preventing dispersal of resistant populations (Geddes, Davis, 2021).

The longest application period for a crop being safely protected by sulfonylurea herbicides was achieved with the appearance of the combined herbicide Caliber Gold, WDG from DuPont, containing 375 g/kg thifensulfuron-methyl and 375 g/kg tribenuron-methyl. This herbicide can be applied at one of the four growth stages of the cereal crops: 2–3 true leaves, tillering, stem extension (1–2 nodes), and the flag leaf. However, its application at the flag leaf stage has been found to be effective only when weather conditions didn't allow the timely treatment or when the perennial dicotyledonous weeds emerged late (Golubev et al., 2018b).

Novel technologies

The introduction of novel technologies of growing of genetically modified (GM) crops, which drastically changed the US agriculture, is dated back to 1996. Since then, the areas planted to GM crops keep on increasing, and so do the concerns of some researchers about safety of such approaches (Zimdahl, 2018; Nishimoto, 2019; Clark, Maselko, 2020; Bourdineaud, 2022). Without going into details of this criticism, the very fact of the development of these technologies is undoubtedly a remarkable milestone in plant protection from weeds (Brookes, 2014; Gosavi et al., 2022; Brunharo et al., 2022).

Unlike the US and some other countries, no GM hybrids resistant to glyphosate are grown in Russia. Nevertheless, since the beginning of the 21st century, the technologies of growing of special hybrids resistant to the two groups imidazolinone (sunflower, rapeseed) and sulfonylurea (sunflower) are used in Russia.

This approach allows suppressing both annual and perennial weeds. Premix herbicide Hermes, OD (50 g/l quizalofop-P-ethyl + 38 g/l imazamox) Schelkovo Agrohimp JSC was tested in the stands of sunflower hybrid MAS 87 IR under the conditions of the Lower Volga region and suppressed annual, perennial and total weeds at the levels of 93–97%, 84–87%, and 93–97%, respectively. The best results in terms of the yield increase were achieved when the herbicide was applied at the stage of 4 leaves, resulting in the yield increase of 0.84 t/ha (Spiridonov et al., 2017a).

Similarly, good efficacy was reported for the premix herbicide Ilion, OD (90 g/l clopyralid + 40 g/l imazamox) in the stands of spring rapeseed hybrids Salsa CL and Solar CL. In particular, weed suppression at the application rate of

Late weed emergence necessitated a search for an herbicide with even broader application timing capabilities. As a consequence, Uniko, containing 100 g/l fluroxypyr и 2.5 g/l florasulam, was introduced by CSC Schelkovo Agrohimp JSC. This premix can be applied even in the stage of heading (depending upon the susceptibility of the crop varieties) when *G. aparine* and *C. arvensis* dominate weed communities. This is especially important for the latter species when it germinates late and its most susceptible developmental stage coincides with the heading stage of the crop. Although weeds have already compromised the yield by the time of such a late treatment, their elimination would decrease yield losses and decrease weed seed bank in the field (Golubev et al., 2020).

Extension of the application period is also applicable in maize. It is common to treat this crop at the stage of 3–5 leaves when it is most vulnerable to the weed activity. For example, it was found in the experiments with Kelvin Plus, WDG (424 g/kg dicamba + 170 g/kg diflufenzopyr + 106 g/kg nicosulfuron) by BASF that later treatments (at the stage of 7–8 leaves) the weeds are more developed and resistant to the herbicide, so that the efficiency of protective measures is decreased. This is especially obvious in the cases of the lady's thumb *Persicaria maculosa* S.F. Grey, hedge-nettle betony *Stachys annua* L., and the velvet leaf *Abutilon theophrastii* Medik. Thus, late treatments make sense only when timely herbicide application could not be performed because of the weather, time constraints, and other interferences. It is also advisable to obtain data concerning susceptibility of the varieties and hybrids grown in particular regions to the herbicides applied (Golubev et al., 2021).

0.8–1.2 l/ga reached 81.9–100% and statistically significant rapeseed seed yield increase equaled to 74% (Golubev, Zheltova, 2016).

Application of herbicide Express, WDG (750 g/kg tribenuron-methyl) in the rapeseed hybrid P 63 LE 10, resistant to this active ingredient, provided a decrease of weed infestation by 74–95% within a month after the treatment. Again, the higher economic efficiency at the level of 0.1 t/ha was achieved by the application at the phase of 4 leaves (Spiridonov et al., 2017b).

Similar technologies are being developed abroad, including the application of imazamox against weeds in the stands of resistant varieties of sunflower, rapeseed and sorghum (Currie, Geier, 2021; Delchev, 2021).

Recently, growing the hybrid 4 K 446 of the sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *saccharifera* Alef.), resistant to CONVISO ONE (50 g/l foramsulfuron + 30 g/l thiencarbazone-methyl) by Bayer was allowed in Russia. Similar approach, though exploiting the GM sugar beet hybrids, was used abroad in the beginning of the 21st century (Dewar et al., 2003). According to the experimental data obtained under the field conditions, the new technology CONVISO® SMART showed an advantage compared to the traditional approach that included treatments by herbicides in the betanal group. The main benefit was suppression of cereal weeds, primarily the cockspur *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. Moreover, in contrast to the traditional scheme of sugar beet protection, the new technology allows suppressing devastating perennial dicotyledonous weeds (Golubev, Makhankova, 2022).

Conclusion

The analysis of changes in herbicides registered in Russia since the beginning of the 21st century indicates the prominent integration of the domestic market into the global herbicide market. As a consequence, the main trends were as follows:

1) Only a limited number of active ingredients was introduced in Russia during the last decade. On the other hand, it is extremely important for the Russian market that the new products are launched fast by the developers.

2) Herbicide formulations based on established active ingredients are constantly optimized and innovative

technologies for their creation are used. The leading role of Russian companies should be mentioned in this respect.

3) Premix herbicides based on common active ingredients are developed. The latter two trends remain the main directions of new herbicide design by the Russian companies.

4) Optimal parameters of efficient herbicide application are defined with special attention to the weed phenology.

5) Novel technologies are adopted, including growing herbicide-resistant hybrids, thus allowing application of certain herbicides during crop vegetation period.

References

- Artemyeva YeA, Zakharova MN, Rozhkova LV (2021) [Efficiency of herbicides for the control of common panicle in winter wheat crops in the conditions of the Ryazan region]. *Zernovoye khozyaystvo Rossii* 2(74): 58–61 (In Russian) <https://doi.org/10.31367/2079-8725-2021-74-2-58-61>
- Bagrintseva VN, Kuznetsova SV, Guba YEI (2015) [Soil-acting post-emergence herbicides for corn]. *Kukuruza i sorgo* 21: 2–26 (In Russian)
- Bayrambekov ShB, Korneva OG, Polyakova YeV, Garyanova YeD (2020) [Control of the number of annual weeds in plantings of early potatoes] *Problemy razvitiya APK regiona* 2 (42): 21–27 (In Russian) <https://doi.org/10.15217/issn2079-0996.2020.2.21>
- Bernaz NI, Polyakov AV (2020) New herbicide Bandur for the protection of carrots. Proc. Conf. «Innovatsii v selskom khozyaystve i ekologii» [Innovations in agriculture and ecology]: 76–80 (In Russian)
- Borushko PI, Golubev AS, Makhankova TA (2014) [Alternation of crops in crop rotations, taking into account the probability of a negative aftereffect of the herbicides used]. *Agro XXI* 10–12: 9–12 (In Russian)
- Cherkashin VN, Cherkashin GV, Malykhina AN (2016) [The use of herbicides in winter rapeseed crops in autumn in the south of Russia]. *Zemledeliye* 2: 45–48 (In Russian)
- Chernukha VG, Makhankova TA, Golubev AS (2011) [The effectiveness of the use of the herbicide Ellay Light, VDG on crops of spring wheat in the conditions of the Leningrad and Saratov regions]. *Integrated plant protection: strategy and tactics. Proc. Conf.* 491–493 (In Russian)
- Dadayeva TA, Filonenko VA (2016) [Evaluation of the effectiveness of herbicides in order to protect spring rapeseed from grass weeds in the conditions of the Kaluga region]. *Rossiyskaya selskokhozyaystvennaya nauka* 2–3: 23–25 (In Russian)
- Devyatkin SA, Devyatkina TF, Obmolova YEO, Kustov MYU, Bochkarev DV (2021) [Biological and economic efficiency of herbicides on spring rapeseed in the south of the Non-Chernozem zone]. *Agrarnyy nauchnyy zhurnal* 9: 27–29 (In Russian) <https://doi.org/10.28983/asj.y2021i9pp27-29>
- Golubev AS (2018) [Study of the effectiveness of thien carbazon-methyl in the fight against wild oats (*Avena fatua* L.) in spring wheat crops]. *Vestnik zashchity rasteniy* 4(98): 63–66 (In Russian) [https://doi.org/10.31993/2308-6459-2018-4\(98\)-63-66](https://doi.org/10.31993/2308-6459-2018-4(98)-63-66)
- Golubev AS (2019) [Study of the effectiveness of the application of a new herbicide benito on soybean crops]. *Vestnik zashchity rasteniy* 4(102): 54–59 (In Russian) <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2019-4-102-54-59>
- Golubev AS, Berestetskiy AO (2021) [Future directions for use of biological and biorational herbicides in Russia]. *Selskokhozyaystvennaya biologiya* 56(5): 868–884 (In Russian) <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.5.868rus>
- Golubev AS, Borushko PI (2020) [The effectiveness of the use of a new herbicide based on bentazone and thifensulfuron-methyl in soybean crops]. *Zernobovyye i krupyanyye kultury* 3(35): 67–72 (In Russian) <https://doi.org/10.24411/2309-348X-2020-11187>
- Golubev AS, Borushko PI (2021) [The effectiveness of the combined herbicide Akris, SE based on dimethenamid-R and terbutylazine in sunflower crops]. *Maslichnyye kultury* 3(187): 65–70 (In Russian) <https://doi.org/10.25230/2412-608X-2021-3-187-65-70>
- Golubev AS, Chermenskaya TD (2021) [Efficiency and safety of the combined herbicide Akris]. *Plodorodiy* 5(122): 105–108 (In Russian) <https://doi.org/10.25680/S19948603.2021.122.26>
- Golubev AS, Makhankova TA (2022) [KONVISO® SMART – a new technology for the protection of sugar beet]. *Zashchita i karantin rasteniy* 9: 20–24. (In Russian) https://doi.org/10.47528/1026-8634_2022_9_20
- Golubev AS, Makhankova TA, Dolzhenko VI (2018b) [Sensitivity of weed plants to the herbicide Caliber Gold in different phases of their development]. *Agrokhiymiya* 10: 67–73 (In Russian) <https://doi.org/10.1134/S0002188118100083>
- Golubev AS, Makhankova TA, Karakotov SD, Zheltova KV (2015) [New combined herbicide Hermes of the imidazolinone class]. *Zemledeliye* 5: 34–36 (In Russian)
- Golubev AS, Makhankova TA, Komarova AS (2021) [Efficiency and safety of Kelvin Plus herbicide application in corn crops in different phases of crop development]. *Agrokhiymiya* 3: 38–44 (In Russian) <https://doi.org/10.31857/S000218812103008X>
- Golubev AS, Makhankova TA, Svirina NV (2017) [New Kyleo herbicide based on glyphosate and 2,4-D]. *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* 46: 80–84 (In Russian)
- Golubev AS, Makhankova TA., Borushko PI (2018a) [Gel – a new formulation of glyphosate]. *Zashchita i karantin rasteniy* 5: 17–19 (In Russian)
- Golubev AS, Zheltova KV (2016) [New combined herbicide Ilion for rapeseed protection]. *Mezhdunarodnyy selskokhozyaystvennyy zhurnal* 4: 44–45 (In Russian)
- Kalabashkina YEV, Gafurov RM, Abramkina LP, Uldina SV et al. (2020) [The effectiveness of the use of promising herbicides on crops of spring wheat cv. Agata]. *Vestnik*

- Tuvinskogo gosudarstvennogo universiteta. 2 Yestestvennyye i selskokhozyaystvennyye nauki.* 2 (61): 39–48 (In Russian) <https://doi.org/10.24411/2221-0458-2020-10035>
- Karakotov SD, Zheltova YEV, Golubev AS, Makhankova TA (2015) A new formulation of herbicides for the protection of sugar beet. *Proc. 7th Congress on Plant Protection*: 95–100 (In Russian)
- Kashukoyev MV, Khutsinova MM, Kanukova ZHO (2019) [Pre-emergence application of herbicides in corn crops]. *Vestnik Rossiyskoy selskokhozyaystvennoy nauki* 4: 22–28 (In Russian) <https://doi.org/10.30850/vrsn/2019/4/22-28>
- Khryukina YeI, Naumov MM (2016) [Pledge herbicide in sunflower crops]. *Zashchita i karantin rasteniy* 6: 51–52 (In Russian)
- Kolupayev MV, Lvov AG, Nesterova LM, Sukacheva MS, Tyumakov AYU (2019) [Comparative evaluation of the aftereffect of drugs Gorgon, VRK, Lancelot, VDG and Magnum, VDG on peas (*Pisum sativum*) in a vegetative experiment]. *Agrokimiya* 5: 48–55 (In Russian) <https://doi.org/10.1134/S0002188119050065>
- Larina GE (2014) [Efficiency of combined herbicides based on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives]. *Agrokimiya* 1: 45–56 (In Russian)
- Lukacheva NG, Kostyuk AV (2021a) [Formation of resistance by biotypes of weeds of the genus *Echinochloa* to the herbicide Nomini, SC in the rice fields of Primorsky Krai]. *Vestnik Dalnevostochnogo otdeleniya Rossiyskoy akademii nauk* 3(217): 63–69 (In Russian) https://doi.org/10.37102/0869-7698_2021_217_03_10
- Lukacheva NG, Kostyuk AV (2021b) [Study of the effectiveness of the herbicide Ristyle, MD on rice crops in Primorsky Krai]. *Risovodstvo* 2 (51): 62–66 (In Russian) <https://doi.org/10.33775/1684-2464-2021-51-2-62-66>
- Makhankova TA, Chernukha VG, Redyuk SI (2020) [Herbicides for rapeseed]. *Zashchita i karantin rasteniy* 2: 38–71 (In Russian)
- Makhankova TA, Dolgikh AV (2020) [Adjuvants and their uses]. *Zashchita i karantin rasteniy* 11: 37–64 (In Russian)
- Makhankova TA, Dolzhenko VI (2013) [A modern range of herbicides for the protection of crops]. *Zashchita i karantin rasteniy* 10: 46–50 (In Russian)
- Makhankova TA, Golubev AS (2017) [Herbicides for cereals]. *Zashchita i karantin rasteniy* 5: 46–67 (In Russian)
- Makhankova TA, Golubev AS, Chernukha VG, Dolzhenko VI (2013) [Protection of grain crops from dicotyledonous weeds with a new herbicide Bomba]. *Doklady Rossiyskoy akademii selskokhozyaystvennykh nauk* 5: 24–28 (In Russian)
- Makhankova TA, Kirilenko YEI, Golubev AS (2011) [Assortment of herbicides for cereals]. *Zashchita i karantin rasteniy* 3: 16–18 (In Russian)
- Morokhovets VN, Basay ZV, Morokhovets TV, Baymukhanova AA et al. (2021) [Herbicides for the control of maria white in soybean crops]. *Sibirskiy vestnik selskokhozyaystvennoy nauki* 51(4): 33–41 (In Russian) <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2021-4-4>
- Morokhovets VN, Basay ZV, Morokhovets TV, Shterbolova TV et al. (2020) [Study of the effectiveness of soil herbicides in relation to the common barnyard grass]. *Sibirskiy vestnik selskokhozyaystvennoy nauki* 50(4): 40–47 (In Russian) <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2020-4-5>
- Osenniy NG, Ilin AV, Veselova LS (2018) [Efficiency of Everest and Irbis (Ovsyugen) herbicides in winter wheat sowing]. *Izvestiya selskokhozyaystvennoy nauki Tavriy* 15(178): 34–41
- Panfilov AE, Saitov SB, Gaynitdinova LA, Yusupova GE (2015) [Soil effect of some post-emergence herbicides in corn crops]. *APK Rossii* 74: 145–151 (In Russian)
- Petunova AA, Makhankova TA (2009) [Varietal resistance of plants to herbicides]. St. Petersburg: VIZR. 364 p. (In Russian)
- Sadovnikova NN, Stetsov GYA, Sadovnikov GG, Peshkov SA (2021) [Timing of control of dicotyledonous weeds in spring wheat crops]. *Vestnik KraSGAU* 12 (177): 81–87 (In Russian) <https://doi.org/10.36718/1819-4036-2021-12-81-87>
- Savva AP, Telezhenko TN, Kovalev SS, Suvorova VA (2021b) [Domestic combined herbicide Superkorn, OD for the protection of corn crops]. *Zemledeliye* 4: 40–43 (In Russian) <https://doi.org/10.24411/0044-3913-2021-10410>
- Savva AP, Telezhenko TN, Suvorova VA (2021a) [Combined herbicide Velocity Power, VDG for the protection of winter wheat crops]. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK* 35 (5): 40–44 (In Russian) <https://doi.org/10.24411/0235-2451-2021-10506>
- Savva AP, Telezhenko TN, Suvorova VA, Kovalev SS (2022) [Domestic three-component herbicide Pixel, MD for the protection of winter barley crops in the Krasnodar Territory]. *Rossiyskaya selskokhozyaystvennaya nauka* 3: 19–23 (In Russian) <https://doi.org/10.31857/S2500262722030048>
- Savva AP, Telezhenko TN, Taranenko VV (2014). [Pallas 45 – a new promising drug for weed control in winter wheat crops]. *Biological protection of plants – the basis for the stabilization of agroecosystems. Proc. Conf.* 331–332 (In Russian)
- Savva AP, Yesipenko LP, Telezhenko TN, Yesaulenko YEA (2016) [Puma Gold, EC – a new promising drug for weed control in winter wheat crops]. *Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* 61: 128–131 (In Russian) <https://doi.org/10.21515/1999-1703-61-128-131>
- Spiglazova SYU, Dolmatova NA (2014) [Hard to eradicate weeds in potato plantings are no longer a problem!] *Kartofel i ovoshchi* 5: 24–26 (In Russian)
- Spiridonov YuYa, Budynkov NI, Avtayevev RA, Strizhkov NI et al. (2017a) [The use of the Hermes in the cultivation of sunflower]. *APK Rossii* 24(2): 303–307 (In Russian)
- Spiridonov YuYa, Budynkov NI, Avtayevev RA, Strizhkov NI et al. (2017b) [The use of Express in the cultivation of sunflower]. *APK Rossii* (3): 631–635 (In Russian)
- Spiridonov YuYa, Budynkov NI, Strizhkov NI, Suminova NB et al. (2019) [The aftereffect of herbicides and the dynamics of their decomposition in various agricultural landscapes]. *Agrarnyy nauchnyy zhurnal* 4: 27–31 (In Russian) <https://doi.org/10.28983/asj.y2019i4pp27-31>
- Spiridonov YuYa, Shestakov VG (2013) [The practice of creating and effectively using combined domestic herbicides in the fight against weeds in cereal crops]. *Agrokimiya* 1: 35–49 (In Russian)
- Stetsov GYA (2015) [Aftereffect of herbicides in Western Siberia]. *Zashchita i karantin rasteniy* 3: 17–19 (In Russian)
- Stetsov GYA, Dolmatova LS, Sadovnikov GG (2018) [The use of Harmony classic, VDG on soybeans in the Altai Ob

- region]. *Vestnik Altayskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* 7(165): 5–12 (In Russian)
- Telezhenko TN, Savva AP, Suvorova VA (2019) [New post-emergence herbicide Geyser, KKR for the control of dicotyledonous and cereal weeds on soybean crops]. *Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* 79: 131–134 (In Russian) <https://doi.org/10.21515/1999-1703-79-131-134>
- Tkach AS, Golubev AS, Svirina NV (2020) [The effect of the new herbicide Artist on annual weeds in potato plantings]. *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* 59: 27–32 (In Russian) <https://doi.org/10.24411/2078-1318-2020-12027>
- Tokarev YeV, Khilevskiy VA, Makhankova TA, Zverev AA (2016) [Weed control in winter wheat crops using new combined preparations]. *Vestnik zashchity rasteniy* 1 (87): 45–48 (In Russian)
- Zbrailov MA, Poyda VB, Falynskov YEM, Pleshakova MYU (2014) [The effectiveness of the herbicide Stellar on corn crops in the Azov zone of the Rostov region]. Modern technologies of agricultural production and priority areas for the development of agricultural science. Proc. Conf. 2: 55–58 (In Russian)
- Alvarez F, Arena M, Auteri D, Borroto J et al. (2021) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance pelargonic acid (nonanoic acid). *EFSA Journal* 19(8): 6813. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6813>
- Bae J, Nurse R, Simard M, Page E (2017). Managing glyphosate-resistant common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*): Effect of glyphosate-phenoxy tank mixes on growth, fecundity, and seed viability. *Weed Science* 65(1): 31–40. <https://doi.org/10.1614/WS-D-16-00094.1>
- Beckie HJ, Ashworth MB, Flower KC (2019) Herbicide resistance management: recent developments and trends. *Plants* 8(6):161. <https://doi.org/10.3390/plants8060161>
- Beiermann C, Miranda J, Creech C, Knezevic S et al (2022). Critical timing of weed removal in dry bean as influenced by the use of preemergence herbicides. *Weed Technology* 36(1): 168–176. <https://doi.org/10.1017/wet.2021.99>
- Bourdineaud JP (2022) Toxicity of the herbicides used on herbicide-tolerant crops, and societal consequences of their use in France. *Drug and Chemical Toxicology* 45(2): 698–721. <http://doi.org/10.1080/01480545.2020.1770781>
- Brazier-Hicks M, Howell A, Cohn J, Hawkes T et al (2020) Chemically induced herbicide tolerance in rice by the safener metcamifen is associated with a phased stress response. *J Exp Bot* 71(1): 411–421. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz438>
- Brookes G. (2014) Weed control changes and genetically modified herbicide tolerant crops in the USA 1996–2012. *GM Crops & Food* 5(4): 321–332. <http://doi.org/10.4161/21645698.2014.958930>
- Brunharo CACG, Gast R, Kumar V, Mallory-Smith CA et al (2022). Western United States and Canada perspective: are herbicide-resistant crops the solution to herbicide-resistant weeds? *Weed Sci* 70(3): 272–286. <https://doi.org/10.1017/wsc.2022.6>
- Campe R, Eva Hollenbach E, Kammerer L, Hendriks J et al (2018) A new herbicidal site of action: Cinmethylin binds to acyl-ACP thioesterase and inhibits plant fatty acid biosynthesis. *Pestic Biochem Physiol* 148: 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.04.006>
- Clark M, Maselko M (2020) Transgene biocontainment strategies for molecular farming. *Front Plant Sci* 11: 210–221. <http://doi.org/10.3389/fpls.2020.00210>
- Currie RS, Geier PW. (2021) Weed control with imazamox rates and timings in herbicide-tolerant grain sorghum. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports* 7(7): 1–8. <https://doi.org/10.4148/2378-5977.8111>
- Davis AS, Frisvold GB (2017) Are herbicides a once in a century method of weed control? *Pest Manag Sci* 73(11):2209–2220. <https://doi.org/10.1002/ps.4643>
- Dayan FE (2019) Current status and future prospects in herbicide discovery. *Plants* 8(9): 341. <https://doi.org/10.3390/plants8090341>
- Delchev G. (2021) Selectivity and stability of herbicides, herbicide tank mixtures and herbicide combinations on seed yield of Clearfield oilseed rapeseed (*Brassica napus* L.). *Agricultural science and technology* 13(3): 280–284. <http://doi.org/10.15547/ast.2021.03.045>
- Dewar AM, May MJ, Woiwod IP, Haylock LA et al (2003) A novel approach to the use of genetically modified herbicide tolerant crops for environmental benefit. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 270: 335–340. <http://doi.org/10.1098/rspb.2002.2248>
- Epp JB, Alexander AL, Balko TW, Buysse AM et al (2016) The discovery of Arylex™ active and Rinskor™ active: Two novel auxin herbicides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 24(3): 362–371. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.08.011>
- Gage KL, Schwartz-Lazaro LM (2019) Shifting the paradigm: an ecological systems approach to weed management. *Agriculture* 9(8):179. <https://doi.org/10.3390/agriculture9080179>
- Ganji E, Andert S, Gerowitt B (2022). The herbicidal potential of Pelargonic Acid to control *Cirsium arvense* (L.) Scop. in relation to the timing of application and the application volume. Tagungsband: 30. Deutsche Arbeitsbesprechung über Fragen der Unkrautbiologie und -bekämpfung, Julius-Kühn-Archiv. <https://doi.org/10.5073/20220117-074121>
- Gašić S, Radivojević L, Brkić D, Stevanović M, Tomašević A (2015) Development of herbicide formulations based on quizalofop-p-ethyl. *Proc of the 7th Congress on Plant Protection*. 383–387
- Geddes CM, Davis AS (2021) The critical period for weed seed control: A proposed framework to limit weed seed return. *Weed Research* 61(4): 282–287. <https://doi.org/10.1111/wre.12480>
- Golubev AS (2021) Weed control with diclosulam in soybean. *Emir J Food Agric*. 33(3): 187–193. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2021.v33.i3.2644>
- Golubev AS, Makhankova TA, Dolzhenko VI, Karakotov SD (2020) Biological justification for the applicability of herbicides at different stages of cereal crop development. *Russian Agricultural Sciences* 46(2): 133–138. <https://doi.org/10.3103/S1068367420020068>
- Gosavi G, Ren B, Li X, Zhou X et al (2022) A new era in herbicide-tolerant crops development by targeted genome editing. *ACS Agricultural Science & Technology* 2(2): 184–191. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.1c00254>
- Grzanka M, Sobiech Ł, Idziak R, Skrzypczak G (2022) Effect of the time of herbicide application and the properties of the spray solution on the efficacy of weed control in maize (*Zea mays* L.) cultivation. *Agriculture* 12(3):353. <https://doi.org/10.3390/agriculture12030353>

- Hao Y, Zhang N, Xu W, Gao J et al (2019a) A natural adjuvant shows the ability to improve the effectiveness of glyphosate application. *J Pestic Sci* 44(2):106–111. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D18-066>
- Hao Y, Zhang Y, Xu W, Gao J, Tao L (2019b) Synergistic effects of adjuvant A-134 on the herbicidal effects of glyphosate. *J Pestic Sci* 44(4): 249–254. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D19-030>
- Hill E, Renner K, VanGessel M, Bellinder R, Scott B (2016). Late-season weed management to stop viable weed seed production. *Weed Science* 64(1): 112–118. <https://doi.org/10.1614/WS-D-15-00096.1>
- Jin F, Wang J, Shao H, Jin M (2010) Pesticide use and residue control in China. *J Pestic. Sci* 35(2):138–142. <https://doi.org/10.1584/jpestics.G10-15>
- Kao-Kniffin J, Carver S, DiTommaso A (2013) Advancing weed management strategies using metagenomic techniques. *Weed Sci* 61(2):171–184. <https://doi.org/10.1614/WS-D-12-00114.1>
- Knowles A (2008) Recent developments of safer formulations of agrochemicals. *Environmentalist* 28:35–44. <https://doi.org/10.1007/s10669-007-9045-4>
- Marcinkowska K, Praczyk T, Łęgosz B, Biedziak A, Pernak J (2018) Bioionic liquids as adjuvants for sulfonylurea herbicides. *Weed Sci* 66:404–414. <https://doi.org/10.1017/wsc.2017.85>
- Nagai T (2021) Ecological effect assessment by species sensitivity distribution for 38 pesticides with various modes of action. *J Pestic Sci* 46(4):366–372. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D21-034>
- Nakatani M, Ito M, Yoshimura T, Miyazaki M et al. (2016b) Synthesis and herbicidal activity of 3-[(hetero)aryl]methanesulfonyl]-4,5-dihydro-1,2-oxazole derivative; Discovery of the novel pre-emergence herbicide pyroxasulfone. *Pestic Sci* 41(4): 133–144. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D15-078>
- Nakatani M, Yamaji Y, Honda H, Uchida Y (2016a) Development of the novel pre-emergence herbicide pyroxasulfone. *J Pestic Sci* 41(3): 107–112. <https://doi.org/10.1584/jpestics.J16-05>
- Nandula V, Vencill W (2015) Herbicide absorption and translocation in plants using radioisotopes. *Weed Sci* 63(SP1):140–151. <https://doi.org/10.1614/WS-D-13-00107.1>
- Nedeljković D, Knežević S, Božić D, Vrbničanin S (2021) Critical time for weed removal in corn as influenced by planting pattern and PRE herbicides. *Agriculture* 11(7): 587. <https://doi.org/10.3390/agriculture11070587>
- Nishimoto R (2019) Global trends in the crop protection industry. *J Pestic Sci* 44(3):141–147. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D19-101>
- Owen MD (2016) Diverse approaches to herbicide-resistant weed management. *Weed Sci* 64:570–584. <https://doi.org/10.1614/WS-D-15-00117.1>
- Peterson MA, Collavo A, Ovejero R, Shivrain V, Walsh MJ (2018) The challenge of herbicide resistance around the world: a current summary. *Pest Manag Sci* 74(10):2246–2259. <https://doi.org/10.1002/ps.4821>
- Saito R, Ikenaga O, Ishihara S, Shibata H (2010) Determination of herbicide clopyralid residues in crops grown in clopyralid-contaminated soils. *J Pestic Sci* 35(4): 479–482. <https://doi.org/10.1584/jpestics.G10-09>
- Shino M, Hamada T, Shigematsu Y, Hirase K, Banba S (2018) Action mechanism of bleaching herbicide cyclopyrimorate, a novel homogentisate solanesyltransferase inhibitor. *J Pestic Sci* 43(4): 233–239. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D18-008>
- Soltani N, Shropshire C, Sikkema P (2022). Impact of delayed postemergence herbicide application on corn yield based on weed height, days after emergence, accumulated crop heat units, and corn growth stage. *Weed Technology* 36(2): 283–288. <https://doi.org/10.1017/wet.2022.10>
- Soni JK, Amarjeet, Punia SS, Choudhary VK (2021) Herbicide combinations for management of resistance in Phalaris minor. *Indian Journal of Weed Science* 53(1): 41–48. <https://doi.org/10.5958/0974-8164.2021.00005.8>
- Stagnari M, Chiarini M, Pisante M (2007) Influence of fluorinated surfactants on the efficacy of some postemergence sulfonylurea herbicides. *J Pestic Sci* 32(1):16–23. <https://doi.org/10.1584/jpestics.G06-29>
- Sugiura K, Yamaoka T, Ito M, Okabayashi R et al (2021) Development of triafamone as a paddy rice herbicide. *J Weed Sci Tech*. 66(2): 72–76. <https://doi.org/10.3719/weed.66.72>
- Travlos I, Rapti E, Gazoulis I, Kanatas P et al. (2020) The herbicidal potential of different pelargonic acid products and essential oils against several important weed species. *Agronomy* 10(11):1687. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111687>
- Triolet M, Guillemin J, Andre O, Steinberg C (2020) Fungal-based bioherbicides for weed control: a myth or a reality? *Weed Research* 1: 60–77. <https://doi.org/10.1111/wre.12389>
- Tsukamoto M, Kikugawa H, Nagayama S, Suganuma T et al (2021) Discovery and structure optimization of a novel corn herbicide, tolpyralate. *J Pestic Sci* 46(2): 152–159. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D20-031>
- Umer M, Khan NM, Razaq Z, Nissa M et al (2022) Bio-herbicides: development, use and elucidation of the factors affecting their efficacy. *Plant Protection* 06(01):75–84. <https://doi.org/10.33804/pp.006.01.3946>
- Umetsu N, Shirai Y (2020) Development of novel pesticides in the 21st century. *J Pestic Sci* 45(2):54–74. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D20-201>
- Webber CL, Taylor JM, Shrefler JW (2014) Weed control in yellow squash using sequential postdirected applications of pelargonic acid. *HortTechnology* 24(1): 25–29. <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.24.1.25>
- Yamaji Y, Honda H, Kobayashi M, Hanai R, Inoue J (2014) Weed control efficacy of a novel herbicide, pyroxasulfone. *J Pestic Sci* 39(3): 165–169. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D14-025>
- Yamamoto S, Tanetani Y, Uchiyama C, Nagamatsu A et al (2021) Mechanism of action and selectivity of a novel herbicide, fenquinotrione. *J Pestic Sci* 46(3): 249–257. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D21-019>
- Zimdahl RL (2018) Agriculture's moral dilemmas and the need for agroecology. *Agronomy* 8(7):116. <https://doi.org/10.3390/agronomy8070116>

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ АССОРТИМЕНТА ГЕРБИЦИДОВ В РОССИИ В НАЧАЛЕ 21 ВЕКА

А.С. Голубев

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

e-mail: golubev100@mail.ru

Анализ изменений ассортимента гербицидов, рекомендованных для использования в Российской Федерации с 2000 по 2022 годы, позволяет выявить основные направления его совершенствования, обусловленные глубокой интеграцией отечественного рынка химических средств защиты сельскохозяйственных культур от сорных растений в мировой рынок гербицидов: 1) появление небольшого количества новых действующих веществ гербицидов в последнее десятилетие: пиноксаден, тиенкарбазон-метил, пироксулам, флукарбазон натрия, топрамезон, диклосулам, темботрион, метамифоп; 2) совершенствование препаративных форм гербицидов и использование новых (в том числе, инновационных) технологий при их создании (концентрат коллоидного раствора (ККР), масляный концентрат эмульсии (МКЭ) и другие); 3) создание комбинированных препаратов на основе трибенурон-метила, метсульфурон-метила, флорасулама, клопиралида, пиклорама, имазамокса, имазапира, имазетапира и других; 4) определение оптимальных регламентов применения гербицидов с учетом фенологии развития сорных растений: обработки в фазу колошения зерновых при преобладании в посевах подмаренника цепкого и вьюнка полевого; 5) развитие новых технологий, таких как возделывание специальных гибридов, проявляющих устойчивость к действующим веществам гербицидов, что позволяет проводить обработку в период вегетации культуры.

Ключевые слова: гербициды, сорные растения, действующие вещества, препаративные формы, комбинированные препараты

Поступила в редакцию: 30.06.2022

Принята к печати: 30.08.2022

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ИНСЕКТИЦИДАМ КОМНАТНОЙ МУХИ *MUSCA DOMESTICA* В ЦЕНТРЕ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

Т.А. Давлианидзе, О.Ю. Еремина*, В.В. Олифер

Институт дезинфектологии «ФНЦГ им. Ф.Ф.Эрисмана» Роспотребнадзора, Московская обл., г. Мытищи

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

В лабораторных условиях проведена оценка устойчивости к инсектицидам из различных химических классов нескольких культур комнатной мухи *Musca domestica*, полученных из популяций, собранных на объектах в Московской и Калужской областях (КСК-1 — в коровнике и КСК-2 — в конюшне конно-спортивного клуба, Красногорск — на пищевом объекте, Калуга — в компосте садового некоммерческого товарищества). Установлено, что при топикальном нанесении комнатные мухи всех изученных культур обладали наибольшей устойчивостью к циперметрину (ПР=75–900х) и к соединениям класса неоникотиноидов тиаметоксаму и клотианидину (ПР=95–330х). Установлена высокая резистентность к фипронилу у двух культур мух (ПР=46–75х). К хлорпирифосу культура КСК-1 оказалась слабо толерантной (ПР=3.7х), а остальные культуры – чувствительными. К индоксакарбу и хлорфенапиру все изученные культуры комнатной мухи оказались более чувствительными, чем лабораторная культура S-НИИД. Накопленные нами данные свидетельствуют о мультирезистентности комнатной мухи практически ко всем традиционно применяемым инсектицидам. Обсуждаются возможные механизмы резистентности насекомых к инсектицидам. Частота использования инсектицидов тех или иных химических классов приводит к резистентности целевого объекта. Широкое применение пиретроидов в животноводстве привело к высокой устойчивости к ним комнатной мухи – места вылода личинок постоянно загрязняются этими инсектицидами. Высокая устойчивость к неоникотиноидам обусловлена частым применением их в виде отравленных приманок на объектах животноводства. К новым для нашей страны представителям классов оксадиазинов и пирролов исследованные культуры комнатной мухи чувствительны.

Ключевые слова: пиретроиды, неоникотиноиды, фосфорорганические соединения, фенилпиразолы, оксадиазины, пирролы

Поступила в редакцию: 26.05.2022

Принята к печати: 03.09.2022

Введение

Комнатная муха *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) имеет большое медицинское, ветеринарное и санитарно-эпидемиологическое значение как насекомое, которое механически переносит более 100 видов патогенов человека, домашней птицы и скота (Davies et al., 2016; Khamesipour et al., 2018; Wang et al., 2019). Комнатная муха выступает в качестве одного из наиболее важных переносчиков возбудителей болезней человека во всем мире (Zhang et al., 2018). Ежегодные экономические потери от этого насекомого в США оцениваются в 375 млн. долларов (Biale et al., 2017). Препятствием для эффективной борьбы служит формирование резистентных популяций комнатной мухи к инсектицидам из различных классов химических соединений. Имеются сведения об 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. 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).

Показатели резистентности (ПР) комнатной мухи за рубежом высоки. Так к пиретроидам встречаются популяции, имеющие ПР > 500х, к хлорорганическим соединениям (ХОС) – ПР > 900х, к фосфорорганическим соединениям (ФОС) ПР > 7000х, к карбаматам ПР > 1300х, к регуляторам развития насекомых ПР > 60х и т. д. При селекции в лабораторных условиях достигнуты и более высокие значения устойчивости (цит. по Давлианидзе, Еремина, 2021). В России в период 1990–2020 гг. установлены высокие уровни резистентности комнатной мухи к ХОС (ПР > 30х), ФОС (ПР=100–500х), пиретроидам (ПР > 400х), неоникотиноидам (ПР=57х), авермектинам (ПР=10х) (цит. по Давлианидзе, Еремина, 2021; Левченко, 2019; Левченко, 2020).

Целью нашей работы является исследование уровней резистентности комнатной мухи к широко применяемым инсектицидам из химических классов пиретроидов, фенилпиразолов, ФОС и неоникотиноидов и новым для нашей страны инсектицидам из классов пирролов и оксадиазинов.

Материалы и методы

При выполнении исследования использована комнатная муха *M. domestica* лабораторной чувствительной культуры S-НИИД и выборки, собранные на объектах в Московской и Калужской областях. Выборки из популяций комнатной

мухи КСК-1 собраны в коровнике и КСК-2 в конюшне конно-спортивного клуба (Московская область, Можайский городской округ, 55.387459 с.ш. 35.986661 в.д., сбор 14–17.07.2020). Выборка Красногорск собрана на пищевом

объекте (Московская область, городской округ Красногорск, 55.896277 с.ш. 37.297835 в.д., сбор 09.06.2020). Выборка Калуга собрана в компосте садового некоммерческого товарищества (Калужская обл., 54.586849942399496 с.ш. 36.23018088787358 в.д., сбор 05–06.09.2020). На указанных объектах проводились дезинсекционные мероприятия, однако нам не удалось получить документальное подтверждение о примененных инсектицидах.

Отловленные родительские выборки из указанных популяций комнатной мухи введены в лабораторную культуру в 2020 г. В дальнейшем эти искусственные лабораторные культуры содержали в инсектарии института в отсутствие пресса инсектицидов. В экспериментах использовали 3–5 суточных имаго мух поколения F3–F5, средней массой 16–19 мг/особь, без разделения по полу.

Инсектициды: технические продукты (ТП) циперметрина, фипронила, хлорпирифоса, тиаметоксама и клотианидина, индоксакарба (рацемическая смесь 75% активного S-энантиомера и 25% неактивного R-энантиомера) и хлорфенапира (95–97%) – синтез Китая.

Инсектицидность ТП определяли топикальным методом, нанося ацетоновые растворы ДВ инсектицидов в 5–7

логарифмически снижающихся концентрациях по 1 мкл на среднеспинку анестезированных мух. Учет поражения и гибели насекомых проводили через 24, 48 и 72 ч после начала эксперимента и определяли показатели $СК_{50}$ и $СК_{95}$, (%) — концентрации, при которых погибает 50% и 95% насекомых, соответственно. Показатель резистентности (ПР) рассчитывали как отношение $СК_{50}$ для резистентной культуры к $СК_{50}$ для чувствительной культуры. Уровни резистентности характеризовали, используя следующую шкалу: ПР: ≤ 1 — насекомые высокочувствительны к инсектициду; 1–2 — чувствительны; 3–10х — толерантны; от 11х до 30х — средне резистентны; от 31х до 100х — высоко резистентны; $> 100х$ — экстремально высоко резистентны (Методы лабораторных исследований и испытаний..., 2020). Повторность опытов трехкратная. Эксперименты проводили при температуре 22–25 °С. Результаты экспериментов обрабатывали статистически с использованием компьютерного приложения Microsoft Office Excel 2007. Математическая обработка данных и вычисление эффективных концентраций при доверительном интервале 95% проведена методом пробит-анализа по методу Финни (Finney, 1971).

Результаты

К широко применяемым инсектицидам, таким как пиретроиды, комнатная муха исследуемых культур высоко резистентна. Наименьшей устойчивостью к циперметрину характеризовалась культура КСК-1 — ПР составил 75х, остальные культуры были экстремально высоко устойчивы (ПР=500–900х). К фенилпиразолу фипронилу высоко устойчивыми оказались культуры Калуга и Красногорск (ПР 46–75х), тогда как культуры КСК-1 и КСК-2 сохраняли толерантность (ПР 5–8х). К хлорпирифосу (ФОС) изученные культуры оказались чувствительными или слаботорерантными (КСК-1 ПР=3.7х) (табл. 1).

К веществам класса неоникотиноидов комнатная муха оказалась высоко резистентной. Так, к тиаметоксаму

устойчивость разных культур составила от 100х до $> 333х$. Уровень резистентности подобного рода характеризуется как очень высокий и экстремально высокий. Клотанидин является активным метаболитом тиаметоксама и к нему все культуры демонстрировали также экстремально высокую резистентность (табл. 2).

В нашей стране новые для медицинской дезинсекции классы инсектицидов включают оксадиазины (индоксакарб) и пирролы (хлорфенапир). Весьма интересно, что к индоксакарбу и хлорфенапиру все изученные культуры комнатной мухи оказались более чувствительными, чем лабораторная чувствительная культура S-НИИД (табл. 3).

Таблица 1. Резистентность комнатной мухи к пиретроидам, фенилпиразолам и ФОС (N=300, учет через 48 ч)

Культура	$СК_{50}$, %	$СК_{95}$, %	$\chi^2(df)$	ПР по $СК_{50}$
Циперметрин				
S-НИИД	0.00020 (0.00015–0.00026)	0.0012 (0.0009–0.0016)	2.7 (5)	-
КСК-1	0.015 (0.011–0.020)	0.10 (0.08–0.13)	3.1 (5)	75
КСК-2	0.120 (0.092–0.156)	>1.0	3.6 (5)	600
Красногорск	0.100 (0.071–0.140)	>1.0	2.8 (5)	500
Калуга	0.180 (0.138–0.248)	>1.0	3.9 (5)	900
Фипронил				
S-НИИД	0.00012 (0.00008–0.00018)	0.0076 (0.0052–0.0114)	6.8 (5)	-
КСК-1	0.0006 (0.0004–0.0009)	0.009 (0.006–0.014)	7.5 (5)	5.0
КСК-2	0.0010 (0.0008–0.0012)	0.026 (0.021–0.033)	4.6 (5)	8.3
Красногорск	0.0090 (0.0064–0.0126)	0.100 (0.071–0.140)	12.6 (7)	75
Калуга	0.0055 (0.0042–0.0069)	0.066 (0.050–0.086)	5.6 (5)	46
Хлорпирифос				
S-НИИД	0.015 (0.010–0.023)	0.040 (0.027–0.060)	5.1 (5)	-
КСК-1	0.055 (0.040–0.075)	0.100 (0.073–0.137)	4.8 (5)	3.7
КСК-2	0.010 (0.008–0.013)	0.550 (0.440–0.688)	5.5 (5)	0.7
Красногорск	0.021 (0.016–0.028)	0.100 (0.076–0.131)	4.3 (5)	1.4
Калуга	0.009 (0.006–0.013)	0.600 (0.400–0.900)	7.1 (5)	0.6

Примечание: доверительные интервалы при вероятности 95%.

Table 1. Resistance of the house fly to pyrethroids, phenylpyrazoles, and OPs (N=300, counted after 48 hours)

Strain	LC ₅₀ (95% CL) %	(LC ₉₅ , (95% CL) %)	$\chi^2(df)$	RF ₅₀
Cypermethrin				
S-NIID	0.00020 (0.00015–0.00026)	0.0012 (0.0009–0.0016)	2.7 (5)	-
KSK-1	0.015 (0.011–0.020)	0.10 (0.08–0.13)	3.1 (5)	75
KSK-2	0.120 (0.092–0.156)	>1.0	3.6 (5)	600
Krasnogorsk	0.100 (0.071–0.140)	>1.0	2.8 (5)	500
Kaluga	0.180 (0.138–0.248)	>1.0	3.9 (5)	900
Fipronyl				
S-NIID	0.00012 (0.00008–0.00018)	0.0076 (0.0052–0.0114)	6.8 (5)	-
KSK-1	0.0006 (0.0004–0.0009)	0.009 (0.006–0.014)	7.5 (5)	5.0
KSK-2	0.0010 (0.0008–0.0012)	0.026 (0.021–0.033)	4.6 (5)	8.3
Krasnogorsk	0.0090 (0.0064–0.0126)	0.100 (0.071–0.140)	12.6 (7)	75
Kaluga	0.0055 (0.0042–0.0069)	0.066 (0.050–0.086)	5.6 (5)	46
Chlorpyrifos				
S-NIID	0.015 (0.010–0.023)	0.040 (0.027–0.060)	5.1 (5)	-
KSK-1	0.055 (0.040–0.075)	0.100 (0.073–0.137)	4.8 (5)	3.7
KSK-2	0.010 (0.008–0.013)	0.550 (0.440–0.688)	5.5 (5)	0.7
Krasnogorsk	0.021 (0.016–0.028)	0.100 (0.076–0.131)	4.3 (5)	1.4
Kaluga	0.009 (0.006–0.013)	0.600 (0.400–0.900)	7.1 (5)	0.6

Note: 95% confidence limits of the mean value.

Таблица 2. Резистентность комнатной мухи к неоникотиноидам (N=300, учет через 48 ч)

Культура	СК ₅₀ , %	СК ₉₅ , %	$\chi^2(df)$	ПП по СК ₅₀
Тиаметоксам				
S-НИИД	0.0030 (0.0022–0.0041)	0.021 (0.015–0.029)	2.8 (5)	-
КСК-1	>1.0	>1.0	27.8 (6)	>333
КСК-2	0.60 (0.43–0.81)	>1.0	13.1 (6)	200
Красногорск	1.0 (0.62–1.61)	>1.0	12.4 (6)	333
Калуга	0.30 (0.19–0.47)	1.0 (0.77–1.30)	1.1 (6)	100
Клотинанидин				
S-НИИД	0.004 (0.003–0.005)	0.023 (0.018–0.030)	2.5 (6)	-
КСК-1	>1.0	>1.0	23.9 (6)	>250
КСК-2	0.38 (0.29–0.72)	>1.0	4.1 (6)	95
Красногорск	1.0 (0.77–1.31)	>1.0	9.4 (6)	263
Калуга	0.42 (0.32–0.54)	>1.0	4.1 (6)	105

Примечание: доверительные интервалы при вероятности 95%.

Table 2. Resistance of the house fly to neonicotinoids (N=300, counted after 48 hours)

Strain	LC ₅₀ (95% CL) %	(LC ₉₅ , (95% CL) %)	$\chi^2(df)$	RF ₅₀
Thiamethoxam				
S-NIID	0.0030 (0.0022–0.0041)	0.021 (0.015–0.029)	2.8 (5)	-
KSK-1	>1.0	>1.0	27.8 (6)	>333
KSK-2	0.60 (0.43–0.81)	>1.0	13.1 (6)	200
Krasnogorsk	1.0 (0.62–1.61)	>1.0	12.4 (6)	333
Kaluga	0.30 (0.19–0.47)	1.0 (0.77–1.30)	1.1 (6)	100
Clothianidin				
S-NIID	0.004 (0.003–0.005)	0.023 (0.018–0.030)	2.5 (6)	-
KSK-1	>1.0	>1.0	23.9 (6)	>250
KSK-2	0.38 (0.29–0.72)	>1.0	4.1 (6)	95
Krasnogorsk	1.0 (0.77–1.31)	>1.0	9.4 (6)	263
Kaluga	0.42 (0.32–0.54)	>1.0	4.1 (6)	105

Note: 95% confidence limits of the mean value.

Таблица 3. Резистентность комнатной мухи к оксадиазинам и пирролам (N=300, учет через 72 ч)

Культура	СК ₅₀ , %	СК ₉₅ , %	$\chi^2(df)$	ПР по СК ₅₀
Индоксакарб				
S-НИИД	0.0041 (0.0036–0.0047)	0.014 (0.012–0.016)	7.8 (4)	
KCK-1	0.0018 (0.0013–0.0025)	0.026 (0.019–0.036)	1.7 (5)	0.44
KCK-2	0.0015 (0.0012–0.0019)	0.140 (0.112–0.175)	7.4 (5)	0.37
Красногорск	0.0060 (0.0040–0.0090)	0.067 (0.045–0.092)	8.0 (4)	1.46
Калуга	0.0010 (0.0007–0.0015)	0.022 (0.016–0.031)	3.9 (5)	0.24
Хлорфенапир				
S-НИИД	0.0040 (0.0035–0.0046)	0.020 (0.014–0.023)	35.1 (6)	-
KCK-1	0.0030 (0.0022–0.0045)	0.026 (0.017–0.039)	33.9 (5)	0.75
KCK-2	0.0050 (0.0038–0.0065)	0.012 (0.009–0.016)	7.6 (4)	1.25
Красногорск	0.0010 (0.0008–0.0013)	0.015 (0.012–0.019)	1.98 (5)	0.25
Калуга	0.0013 (0.0009–0.0018)	0.027 (0.019–0.038)	10.5 (5)	0.33

Примечание: доверительные интервалы при вероятности 95 %.

Table 3. Resistance of the house fly to oxadiazines and pyrroles (N=300, counting after 72 hours)

Strain	LC ₅₀ (95% CL) %	(LC ₉₅ , (95% CL) %)	$\chi^2(df)$	RF ₅₀
Indoxacarb				
S-NIID	0.0041 (0.0036–0.0047)	0.014 (0.012–0.016)	7.8 (4)	
KSK-1	0.0018 (0.0013–0.0025)	0.026 (0.019–0.036)	1.7 (5)	0.44
KSK-2	0.0015 (0.0012–0.0019)	0.140 (0.112–0.175)	7.4 (5)	0.37
Krasnogorsk	0.0060 (0.0040–0.0090)	0.067 (0.045–0.092)	8.0 (4)	1.46
Kaluga	0.0010 (0.0007–0.0015)	0.022 (0.016–0.031)	3.9 (5)	0.24
Chlorfenapyr				
S-NIID	0.0040 (0.0035–0.0046)	0.020 (0.014–0.023)	35.1 (6)	-
KSK-1	0.0030 (0.0022–0.0045)	0.026 (0.017–0.039)	33.9 (5)	0.75
KSK-2	0.0050 (0.0038–0.0065)	0.012 (0.009–0.016)	7.6 (4)	1.25
Krasnogorsk	0.0010 (0.0008–0.0013)	0.015 (0.012–0.019)	1.98 (5)	0.25
Kaluga	0.0013 (0.0009–0.0018)	0.027 (0.019–0.038)	10.5 (5)	0.33

Note: 95% confidence limits of the mean value.

Обсуждение

Пиретроиды: циперметрин. Отловленные нами на объектах выборки популяций комнатной мухи оказались высоко (KCK-1 ПР=75х) и экстремально высоко (Калуга ПР=900х, Красногорск ПР=500х, KCK-2 ПР=600х) устойчивыми к циперметрину – широко применяемому в сельском хозяйстве и в медицинской дезинсекции пиретроиду. Препараты на основе циперметрина применяют в ветеринарии для профилактики и лечения арахноэнтомозов животных, в т.ч. крупного рогатого скота, овец, коз, свиней, для борьбы с эктопаразитами пушных зверей, собак и декоративных птиц, а также для дезинсекции животноводческих помещений (https://galen.vetrf.ru/#/registry/pharm/registry?page=1&f_chemicalName. Дата обращения 31.08.2022). Следует отметить, что высокую устойчивость комнатной мухи к пиретроидам регистрируют во многих странах мира с начала 80-х годов XX века (Рославцева, 2006). Существуют несколько мутаций натриевых каналов, которые обеспечивают устойчивость комнатной мухи к пиретроидам — *kdr*, *kdr-his* и *super-kdr*. Наличие мутации *kdr-his* обуславливает толерантность комнатной мухи в пределах ПР=10х. Наличие мутации *kdr* приводит к более высоким ПР=11–35х. И, наконец, комплекс двух мутаций *super-kdr* служит причиной более высоких уровней устойчивости к пиретроидам ПР = 37–400х (Scott, 2017). Сопоставив полученные нами ПР с приведенными выше, мы пришли к выводу о наличии у исследованных культур комнатных мух мутации *super-kdr*. К тому же, при обработке средствами в аэрозольной

упаковке, содержащими 0.1% циперметрина, обратимость паралича резистентных культур мух составила для культур: Калуга 37%, Красногорск 93%, KCK-1 87%, KCK-2 99%, в то время как мухи чувствительной лабораторной культуры S-НИИД погибали полностью (обратимость паралича 0%) (Давлианидзе, 2021).

Фенилпирозолы: фипронил. Две изученные нами культуры KCK-1 и KCK-2 оказались толерантными к фипронилю (ПР=5.0–8.3х). Устойчивость комнатной мухи культур Калуга и Красногорск к фипронилю оказалась высокой (ПР=46–75х) и превышала таковую, известную из литературы. Известен 10-кратный уровень в трех популяциях мух Пакистана (Khan et al., 2013) и чувствительность или слабая толерантность 11 популяций мух (ПР=0.9–2.4х) в Дании (Kristensen et al., 2004). Анализ механизмов резистентности показал, что устойчивость к фипронилю связана с микросомальными оксидазами и эстеразами (Abbas et al., 2014), а также с появлением мутантного A302S в аллеле Rdl в ГАМК-зависимых хлор-ионных каналах насекомых (Gao et al., 2007). В ветеринарии фипронил применяется в нескольких препаративных формах (спот-он, пур-он, спрей, ошейник) при борьбе с эктопаразитами мелких домашних животных (собак, кошек, декоративных грызунов и птиц) (https://galen.vetrf.ru/#/registry/pharm/registry?page=1&f_chemicalName. Дата обращения 31.08.2022). В сельском хозяйстве проводят опрыскивание растений в период вегетации против насекомых из отрядов прямокрылых и

жесткокрылых и др., а также обработку семян и клубней от почвообитающих вредителей.

Установленную нами у двух культур комнатной мухи толерантность можно отнести за счет комплексных механизмов резистентности, возникших в связи с резистентностью к пиретроидам – увеличенной детоксикации, изменения состава кутикулы и др. Так, например, на Тайване исследователи предоставили первые доказательства перекрестной устойчивости к имидаклоприду и фипронилю у устойчивых к пиретроидам культур рыжего таракана *Blattella germanica* (L.) (Blattodea: Ectobiidae) из-за сверхэкспрессии CYP4G19 (Hu, et al 2021).

У комнатной мухи культур Калуга и Красногорск, согласно принятой нами схеме, резистентность характеризуется как высокая — ПР превышает 46–75 х. Такие уровни должны сопровождаться мутациями в аллеле Rdl. Поскольку явных причин такого высокого уровня ПР не выявлено, остается предположить возможность несанкционированного применения на объектах ветеринарного надзора препаратов, разрешенных для применения против вредителей сельскохозяйственных культур. Определенно, у этих культур имеются и перечисленные выше механизмы резистентности — такие как перекрестная резистентность, увеличение активности детоксицирующих ферментов, увеличение толщины и состава кутикулы, повышение роли ABC-транспортеров. Также имеются сведения о том, что, например, в Пакистане *M. domestica*, являясь нецелевым видом, присутствующим в системе выращивания риса, имеет высокую резистентность к карбаматам (ПР к карбофурану 28–46х, картапу гидрохлориду 31–48х), пиретроидам (ПР к гамма-цигалотрину 19–43х), диамидам (ПР к хлорантранилипролу 12–27х), аналогам нереистоксина (ПР к моносультапу 14–26х) и фенилпиразолам (ПР к фипронилю 13–40х), ФОС (ПР к триазофосу 11–20х) и пиридинам (ПР к флониамиду 8–13х) (Khan, 2020).

ФОС: хлорпирифос. В наших экспериментах две культуры комнатной мухи оказались чувствительными к хлорпирифосу (ПР=0.6–0.7х), а две культуры – толерантными (ПР=1.4–3.7х). В Пакистане установлена толерантность комнатной мухи к хлорпирифосу (ПР=2.5–7.4х) (Khan et al., 2013), а в Италии найдены высокие показатели резистентности (ПР=42.3х) (Pezzi et al., 2011). Многие исследователи показывают, что мутация V260L АХЭ комнатной мухи придает относительно ограниченный уровень нечувствительности к инсектицидам (Kozaki et al., 2001, Walsh et al., 2001). Эта мутация обнаружена в устойчивых к ФОС культур мух YPRN и YBOL (Kozaki et al., 2001), у культуры 571ab (Kristensen et al., 2006) и у культуры SH-CBR, устойчивой к карбаматам (Liming et al. 2006). Полиморфизм АХЭ комнатной мухи установлен в Турции (Başkurt, et al., 2011). ФОС достаточно часто применяются в медицинской дезинсекции для борьбы с синантропными насекомыми и в ветеринарии для борьбы с эктопаразитами животных. Так, например, препараты на основе диазинона применяют для уничтожения эктопаразитов животных методом опрыскивания и купания в пропывной ванне, а также для обработки животноводческих помещений. Многолетнее применение хлорофоса для обработок мест выплода личинок комнатной мухи также могло отразиться на чувствительности имаго мух к ФОС.

Неоникотиноиды: тиаметоксам и клотианидин. Тиаметоксам относительно новый инсектицид, который

эффективно используется против комнатной мухи, однако к нему уже сформировалась устойчивость во всем мире. Результаты исследований, проведенные в Пакистане в 2015 г., продемонстрировали различный уровень устойчивости комнатной мухи к тиаметоксаму: от толерантности (ПР=7.7х) до умеренной резистентности (ПР=20х) (Khan, et al., 2015; Abbas et al., 2015). В Дании диапазон устойчивости к тиаметоксаму полевых популяций комнатной мухи был еще шире: от толерантности (ПР=6х) до высокой резистентности (ПР=76–100х) (Kristensen, Jespersen 2008; Markussen, Kristensen, 2010). К тиаметоксаму и его активному метаболиту клотианидину все изученные нами культуры проявили экстремально высокую резистентность (ПР=100–333х и 95–250х, соответственно). Столь высокая устойчивость насекомых может сопровождаться и мутациями в никотин-ацетилхолиновом рецепторе (nAChR) (Xu et al., 2022; Sial et al., 2022). Так, аминокислотная мутация (R81T) в субъединице beta1 nAChR была обнаружена в Китае у резистентных к имидаклоприду полевых популяций бахчевой тли *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). Частоты аллелей R81T составили от 38.1%, до 48.2% (Zhang et al., 2015).

Близкие цифры ПР для обоих инсектицидов можно объяснить быстрым превращением тиаметоксама в клотианидин. Показано, что в теле таракана *Periplaneta americana* L. (Blattodea: Blattidae) тиаметоксам в течение 1 часа превращается в клотианидин (Benzidane et al., 2010). Данные по сравнительной инсектицидности тиаметоксама и клотианидина противоречивы. Для нимф клопа *Blissus occiduus* Barber (Hemiptera: Blissidae) контактная инсектицидность клотианидина в 20 раз выше, чем тиаметоксама. Для взрослых особей, наоборот, тиаметоксам в три раза более токсичен. При оценке системного действия на взрослых *B. occiduus* тиаметоксам оказался в пять раз более токсичным, чем клотианидин (Stamm et al., 2011). Неоникотиноиды широко применяют в медицинской дезинсекции, ветеринарии и растениеводстве. Для борьбы с мухами широко применяется препарат, содержащий 10% тиаметоксама, что и могло привести к высокой устойчивости изученных нами культур комнатной мухи.

Оксадиазины: индосакарб. Комнатная муха изученных культур в целом оказалась более чувствительна к индосакарбу, чем муха чувствительной лабораторной культуры S-НИИД и только муха культуры Красногорск – слабо толерантна (ПР=1.46х). Известно, что индосакарб инсектициден для широкого круга насекомых, включая комнатную муху. Он показал умеренную токсичность для чувствительной лабораторной культуры и трёх природных популяций комнатной мухи в Японии (ПР=0.5–1.9х) (Shono et al., 2004). Несколько выше устойчивость комнатной мухи в Пакистане – ПР варьируют от 3.0х до 7.1х (Khan et al., 2013). Предполагается, что индосакарб эффективен в борьбе с насекомыми, у которых развилась устойчивость к карбаматам, ФОС, фенилпиразолам и пиретроидам (McCann et al., 2001; Chai, Lee, 2010). В настоящее время в России в области медицинской дезинсекции зарегистрировано несколько эффективных в отношении мультирезистентных культур комнатной мухи пищевых приманок, содержащих индосакарб (Еремина и др., 2022).

Пирролы: хлорфенапир. Культура КСК-2 оказалась слабо толерантна (ПР=1.25х) к хлорфенапиру, тогда как три остальные культуры комнатной мухи проявили в несколько

раз большую чувствительность, чем культура S-НИИД. Имеются данные литературы о перекрестной устойчивости к хлорфенапиру резистентной к имидаклоприду (ПР=78х) культуры комнатной мухи (Ma et al., 2017). Известно, что хлорфенапир в 5 раз более инсектициден для резистентной к пиретроидам мухи-жигалки *Haematobia irritans* (L.), (Diptera: Muscidae), чем для чувствительной мухи. Авторы связывают этот факт с повышенным уровнем монооксигеназы у резистентной мухи, которые участвуют в превращении проинсектицида в активный метаболит (Sheppard, Joise, 1998).

В России в области медицинской дезинсекции зарегистрировано 3 инсектицидных средства, содержащих смесь хлорфенапира и пиретроида (альфациперметрина или бифентрина), эффективных в отношении мультирезистентных рас синантропных тараканов (<https://portal.eaeunion.org>, дата обращения 22.09.2022; Еремина, Олифер, 2020).

Заключение

Резистентность к пестицидам у комнатных мух, как и у других насекомых, возникает при жестком отборе, когда популяция контактирует с инсектицидом на стадии личинок (обработка мест выплода) или имаго (при посадке насекомых на обработанные поверхности или при поедании отравленных приманок). Применение инсектицидных препаратов в сфере медицинской дезинсекции регламентируется при помощи системы регистрации в Евразийской Экономической Комиссии. В едином реестре свидетельств о государственной регистрации приведены сведения о всех зарегистрированных в установленном порядке и разрешенных для применения инсектицидных средствах (<https://portal.eaeunion.org>. Дата обращения 22.09.2022). В сельском хозяйстве необходимо следовать справочнику пестицидов и агрохимикатов (<https://www.agroxxi.ru/goshandbook>. Дата обращения 22.09.2022).

Накопленные нами данные свидетельствуют о мультирезистентности комнатной мухи практически ко всем традиционно применяемым инсектицидам. Отбор устойчивых насекомых в популяциях идет, по-видимому, сразу по всем направлениям: накопление мутаций, приводящих к нечувствительности места действия; изменение активности ферментов, принимающих участие в детоксикации пестицидов; изменение скорости выведения инсектицидов из клеток с помощью АВС-транспортёров. Снижается проникновение инсектицидов в организм резистентных насекомых в результате усиления экспрессии метаболической устойчивости в покровах, повышенного присутствия связывающих белков, липидов, склеротизации, задерживающей инсектициды, толстой кутикулы, сочетания некоторых или всех этих механизмов вместе (цит. по Lilly et al., 2016; Balabanidou et al., 2016). Механизмы резистентности описываемых в настоящем исследовании культур комнатной мухи нуждаются в дальнейшем изучении.

Частота использования инсектицидов тех или иных химических классов приводит к резистентности целевого объекта. Широкое применение пиретроидов в животноводстве привело к высокой устойчивости к ним комнатной мухи – места выплода личинок постоянно загрязняются этими инсектицидами. Кроме того, подавляющее число средств, применяемых в медицинской дезинсекции в отношении имаго, например, средства в аэрозольных упаковках, содержат пиретроиды. Высокая устойчивость к неоникотиноидам обусловлена частым применением их в виде отравленных приманок на объектах животноводства. К новым для нашей страны представителям классов оксадиазинов и пирролов исследованные культуры комнатной мухи чувствительны.

Библиографический список (References)

- Давлианидзе ТА (2021) Обратимость нокдаун-эффекта при применении аэрозолей против резистентных к пиретроидам комнатных мух. *Дезинфекционное Дело*. 116(2):30–36. DOI: 10.35411/2076-457X-2021-2-30-36
- Давлианидзе ТА, Еремина ОЮ (2021) Санитарно-эпидемиологическое значение и резистентность к инсектицидам природных популяций комнатной мухи *Musca domestica*. *Вестник Защиты растений*. 104(2):72–86. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2021-104-3-15037>
- Еремина ОЮ, Олифер ВВ (2020) Обоснование количественных соотношений действующих веществ при создании двухкомпонентных инсектицидных средств для преодоления резистентности насекомых *Дезинфекционное Дело*. 112(2):34–43. DOI: 10.35411/2076-457X-2020-2-34-43
- Еремина ОЮ, Олифер ВВ, Давлианидзе ТА (2022) Перспективы применения приманок на основе современных действующих веществ для борьбы с комнатными мухами. *Дезинфекционное Дело*. 119(1):24–28. DOI: 10.35411/2076-457X-2022-1-33-37
- Левченко МА (2020) Оценка эффективности фипронила и хлорфенапира против *Musca domestica* L. на объектах ветеринарного надзора. *Вестник Красноярского Государственного Аграрного Университета*. 12:147–151.
- Левченко МА, Силиванова ЕА, Плашкина ВА, Шумилова ПА (2019) Резистентность природных популяций *Musca domestica* L. к современным инсектицидам. *Российский журнал Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии*. (4):407–412.
- Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности. Руководство Р 4.2.3676-20. п. 4.16.4. С. 303.
- Рославцева СА (2006) Резистентность к инсектоакарицидам членистоногих, имеющих эпидемиологическое и санитарно-гигиеническое значение. М.: Компания Спутник+. 130 с.
- 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 (2015) Resistance status of *Musca domestica* L. populations to neonicotinoids and insect growth regulators in Pakistan poultry facilities. *Pakistan J Zool* 47(6):1663–1671.
- Balabanidou V, Kampouraki A, MacLean M, Blomquist GJ, Tittiger C, et al (2016) Cytochrome P450 associated with insecticide resistance catalyzes cuticular hydrocarbon production in *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(33):9268–9273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608295113>.

- Başkurt S, Taşkın BG, Doğaç E, Taşkın V (2011) Polymorphism in the acetylcholinesterase gene of *Musca domestica* L. field populations in Turkey. *J Vector Ecol* 36(2):248–257. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2011.00165.x>
- Benzidane Y, Touinsi S, Motte E, Jadas-Hécart A, Communal PY, et al (2010) Effect of thiamethoxam on cockroach locomotor activity is associated with its metabolite clothianidin. *Pest Manag Sci* 66(12):1351–1359. <https://doi.org/10.1002/ps.2022>
- 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>
- Burgess ER, Geden CJ, Lohmeyer KH, King BH, Machtinger ET, 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(1):11166. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68121-z>
- Chai RY, Lee CY (2010) Insecticide resistance profiles and synergism in field populations of the German cockroach (Diptera: Blattellidae) from Singapore. *J Econ Entomol* 103(2):460–471. <https://doi.org/10.1603/ec09284>
- 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>
- Finney DJ (1971) Probit analysis. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Gao JR, Kozaki T, Leichter CA, Rinkevich FD, Shono T, 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.
- Hu IH, Tzeng HY, Chen ME, Lee CY, Neoh KB (2021) Association of CYP4G19 expression with gel bait performance in pyrethroid-resistant German cockroaches (Blattodea: Ectobiidae) from Taiwan. *J Econ Entomol* 114(4):1764–1770. <https://doi.org/10.1093/jee/toab104>
- 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 (2020) Side effects of insecticidal usage in rice farming system on the non-target house fly *Musca domestica* in Punjab, Pakistan. *Chemosphere* 241:125056. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125056>
- 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, Shad SA, Akram W (2013) 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>
- Kozaki T, Shono T, Tomita T, Kono Y (2001) Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the house fly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect Biochem Mol Biol* 31:991–997. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(01\)00047-9](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(01)00047-9)
- Kristensen M, Huang J., Qiao CL, Jespersen JB (2006) Variation of *Musca domestica* L. acetylcholinesterase in Danish house fly populations. *Pest Manag Sci* 62:738–745. <https://doi.org/10.1002/ps.1231>
- 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>
- 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>
- Liming T, Míngan S, Jiangzhong Y, Peijun Z, Chuanxi Z, et al (2006) Resistance pattern and point mutations of insensitive acetylcholinesterase in a carbamate-resistant strain of house fly (*Musca domestica*). *Pest Biochem Physiol* 86:1–6. doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.12.004
- Ma Z, Li J, Zhang Y, Shan C, Gao X (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>
- 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.
- McCann SA, Annis GD, Shapiro R, Piotrowski DW, Lahm GP, et al (2001) The discovery of indoxacarb: oxadiazines as a new class of pyrazoline-type insecticides. *Pest Manag Sci* 57(2):153–164. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200102\)57:2<153::AID-PS288>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200102)57:2<153::AID-PS288>3.0.CO;2-O)
- Pezzi M, Lanfredi M, Chicca M, Tedeschi P, Brandolini V, 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 Env Sci Health* 46(6):480–485. <https://doi.org/10.1080/03601234.2011.583866>
- 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>
- Sheppard CD, Joyce JA (1998) Increased susceptibility of pyrethroid-resistant horn flies (Diptera: Muscidae) to chlorfenapyr. *J Econ Entomol* 91(2):398–400.
- Shono T, Zhang L, Scott JG (2004) Indoxacarb resistance in the house fly, *Musca domestica*. *Pestic Biochem Physiol* 80(2):106–112.
- Sial MU, Mehmood K, Saeed S, Husain M, Rasool KG, et al (2022) Neonicotinoid's resistance monitoring, diagnostic mechanisms and cytochrome P450 expression in green peach aphid [*Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae)]. *PLoS One* 7(1):e0261090.
- 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>
- Stamm MD, Baxendale FP, Heng-Moss TM, Siegfried BD, Blankenship EE, et al (2011) Dose-response relationships of clothianidin, imidacloprid, and thiamethoxam to *Blissus*

- occidius* (Hemiptera: Blissidae). *J Econ Entomol* 104(1):205–210. <https://doi.org/10.1603/ec10268>
- Walsh SB, Dolden TA, Moores GD, Kristensen M, Lewis T, et al (2001) Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem J* 359:175–181. <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>
- Xu X, Ding Q, Wang X, Wang R, Ullah F, et al (2022) V101I and R81T mutations in the nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit are associated with neonicotinoid resistance in *Myzus persicae*. *Pest Manag Sci* 78(4):1500–1507. <https://doi.org/10.1002/ps.6768>
- Zhang J, Cui L, Xu X, Rui C (2015) Frequency detection of imidacloprid resistance allele in *Aphis gossypii* field populations by real-time PCR amplification of specific-allele (rtPASA). *Pestic Biochem Physiol* 125:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.06.001>
- 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>

Translation of Russian References

- Davlianidze TA (2021) [Reversibility of the knockdown effect in the application of aerosols against pyrethroid-resistant houseflies]. *Dezinfektsionnoye Delo*. 2:30–36. (In Russian)
- Davlianidze TA, Eremina OYu (2021) [Sanitary and epidemiological significance and resistance to insecticides of natural populations of the *Musca domestica* housefly]. *Vestnik Zashchity rasteniy* 104(2):72–86. (In Russian)
- Eremina OYu, Olifer VV (2020) [Substantiation of the quantitative ratios of active substances in the creation of two-component insecticidal agents to overcome insect resistance]. *Dezinfektsionnoye Delo* 2:34–43. (In Russian)
- Eremina OYu, Olifer VV, Davlianidze TA (2022) [Prospects for the use of baits based on modern active ingredients to control house flies]. *Dezinfektsionnoye Delo* 1:24–28. (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]. *Rossiyskiy zhurnal Problemy veterinarnoy sanitarii, gigiyeny i ekologii*. No. 4: 407–412 (In Russian)
- [Methods of laboratory research and testing of disinfectants to assess their effectiveness and safety. Guide R 4.2.3676-20]. paragraph 4.16.4. P.303 (In Russian)
- Roslavtseva SA (2006) [Resistance to insectoacaricides of arthropods of epidemiological and sanitary-hygienic importance]. M.: Kompaniya Sputnik+, 130 p. (In Russian)
- Plant Protection News, 2022, 105(3), p. 114–121
- OECD+WoS: 1.06+IY (Entomology) <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-3-15346>

Full-text article

RESISTANCE TO INSECTICIDES OF HOUSEFLY *MUSCA DOMESTICA* IN THE CENTER OF THE EUROPEAN PART OF RUSSIA

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

Institute of Disinfectology, Mytishi town, Moscow Province, Russia

*corresponding author; e-mail: eremina_insect@mail.ru

Under laboratory conditions, resistance to insecticides from various chemical classes of several strains of the housefly, *Musca domestica*, obtained from populations collected at facilities in the Moscow and Kaluga regions (KSK-1 in a cowshed and KSK-2 in the stable of an equestrian sports club, Krasnogorsk – at a food facility, Kaluga – in the compost of a garden non-profit partnership). It was found that when insecticides were applied topically, houseflies of all the studied strains had the highest resistance to cypermethrin (RF=75–900x) and to neonicotinoid compounds thiamethoxam and clothianidin (RF=95–330x). High resistance to fipronil was found in two strains of fly (RF= 46–75x). Strain KSK-1 was weakly tolerant to chlorpyrifos (RF=3.7x), while the other strains were susceptible. All the studied house fly strains were more susceptible to indoxacarb and chlorfenapyr than the laboratory strain S-NIID. The data indicate that studied housefly strains are multiresistant to almost all commonly used insecticides. Possible mechanisms of insect resistance to insecticides are discussed. Frequent use of insecticides of various chemical classes led to resistance in the target pest. Widespread use of pyrethroids in animal facilities has led to high resistance to them in the house fly because places where larvae hatch are constantly polluted with these insecticides. High resistance to neonicotinoids is also due to their frequent use as poisoned baits in livestock facilities. To the contrary, the studied housefly strains remained susceptible to the tested oxadiazines and pyrroles, chemical classes that were recently introduced to Russia.

Keywords: pyrethroid, neonicotinoid, organophosphate, phenylpyrazole oxadiazines, pyrroles

Submitted: 26.05.2022

Accepted: 03.09.2022

© Davlianidze T.A., Eremina O.Yu., Olifer V.V., published by All-Russian Institute of Plant Protection (St. Petersburg). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ФАКТОРЫ ПОВЫШЕНИЯ ИНДУЦИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ДВУХ ШТАММОВ *BACILLUS SUBTILIS* В ЗАЩИТЕ ПШЕНИЦЫ ОТ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ТЕМНО-БУРОЙ ПЯТНИСТОСТИ (*BIPOLARIS SOROKINIANA*) И БУРОЙ РЖАВЧИНЫ (*PUCCINIA TRITICINA*)

И.И. Новикова, Э.В. Попова, Н.М. Коваленко*, И.Л. Краснобаева

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

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

Цель работы состояла в оценке культуральной жидкости (КЖ) штаммов *Bacillus subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D и ее компонентов (супернатанта и бактериальных клеток) в формировании индуцированной устойчивости пшеницы по отношению к темно-бурой пятнистости и бурой ржавчине, а также в установлении оптимальной концентрации бактериальных клеток и времени применения, определяющих эффективность лабораторных образцов, содержащих 0.1%-ный салицилат хитозана (СХ). Предполагается, что в составе КЖ и ее супернатанта присутствуют биологически активные метаболиты, обладающие элиситорной активностью и ответственные за проявление индуцированной устойчивости пшеницы к темно-бурой пятнистости и бурой ржавчине. Обработка листьев КЖ и СН уменьшала пораженность листьев пшеницы *Bipolaris sorokiniana* в 1.5–2 раза, а *Puccinia triticina* – на 20 и 10% по сравнению с контролем, соответственно, в то время как суспензия бактериальных клеток не подавляла развитие симптомов болезней. Наибольший индуцирующий эффект все образцы КЖ показали с титром 10^9 КОЕ/мл. Выявлено, что из всех вариантов применения образцов (за 1 и 2 суток до заражения и через 1 и 2 суток после заражения) наиболее эффективной была предварительная обработка растений пшеницы за одни сутки до инокуляции патогеном. Наиболее существенно повышала устойчивость пшеницы к болезням обработка растений пшеницы композицией КЖ + 0.1% СХ, что выразилось в снижении площади поражения листьев темно-бурой пятнистостью в 6 раз и бурой ржавчиной – в 10 раз по сравнению с контролем.

Ключевые слова: биологическая защита растений, лабораторный образец, Витаплан, культуральная жидкость, фунгистатический эффект, индуцированная устойчивость, салицилат хитозана

Поступила в редакцию: 29.04.2022

Принята к печати: 13.09.2022

Современное растениеводство ориентировано на разработку и внедрение экологически безопасных ресурсосберегающих технологий фитосанитарной оптимизации агроэкосистем. Такие агротехнологии предусматривают широкое использование комплекса полифункциональных биопрепаратов разного целевого назначения на основе штаммов микроорганизмов в качестве альтернативы химическим средствам защиты растений (Павлюшин и др., 2020). Биологический контроль наиболее перспективен для защиты сельскохозяйственных культур от болезней, повышения урожайности и улучшения качества продуктов питания при переходе к органическому и устойчивому сельскому хозяйству (Syed et al., 2018) Механизмы подавления фитопатогенных микроорганизмов обусловлены полифункциональностью действия штаммов микробов-антагонистов – способностью синтезировать биологически активные вещества (БАВ) различной природы (антибиотики, сидерофоры, гидролитические ферменты, летучие органические соединения, цианистый водород и др.). Они обеспечивают как прямой антагонизм в отношении фитопатогенов, так и индукцию системной болезнестойчивости растений (Павлюшин и др., 2020; Santoyo et al., 2012; Yu et al., 2015; Singh et al., 2017; Sehrawat et al., 2019; Jiao et al., 2021; Zehra et al., 2021; Wang et al., 2022).

Показано, что биологически активные вещества (БАВ) штаммов-продуцентов биопрепаратов подавляют развитие

фитопатогенных видов, снижая их вирулентность и агрессивность и, тем самым, сохраняют урожай (Sasirekha et al., 2016; Kumar et al., 2017; Ghazy et al., 2021).

Благодаря полифункциональности штаммов-продуцентов, современные биологические препараты сочетают в себе свойства биоудобрений, биостимуляторов и биопестицидов, обеспечивая устойчивое повышение урожайности сельскохозяйственных культур (De los Santos-Villalobos et al., 2020, 2021; Sendi et al., 2020; Pathak et al., 2021; Sehrawat et al., 2022). Применение полифункциональных биопрепаратов улучшает качество урожая, способствуя накоплению углеводов, белков, витаминов, макро- и микроэлементов в сельскохозяйственной продукции (Chakraborty et al., 2021).

Эффективность биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* в борьбе с болезнями растений на основных сельскохозяйственных культурах продемонстрирована во многих работах в нашей стране и за рубежом. Например, штаммы бацилл эффективно подавляли распространение и развитие фузариозной и офиоболезной гнили, мучнистой росы, желтой и бурой ржавчины зерновых культур (Yang et al., 2015; Gao et al., 2015; Hui et al., 2013; Reiss et al., 2017).

Эффективность разработанных во Всероссийском институте защиты растений биопрепаратов в отношении распространения и развития основных вредоносных заболеваний сельскохозяйственных культур достигает 60–90%, что обеспечивает повышение продуктивности на 20–25%

и улучшение качества растениеводческой продукции (Новикова и др., 2017). С перспективами и проблемами применения биопрепаратов на основе штаммов *B. subtilis* в сельском хозяйстве для борьбы с болезнями растений можно ознакомиться в недавно опубликованных обзорах (Павлюшин и др., 2020; Chowdhury et al., 2015; Wang et al., 2018).

Биологическая эффективность препаратов на основе штаммов микробов-антагонистов обусловлена сложными механизмами, регулируемыми взаимоотношениями микроорганизмов в природе. Прямое биоцидное действие штаммов *B. subtilis* связывают с синтезом ими различных метаболитов с антибиотической активностью – антибиотиков, биосурфактантов, сидерофоров и др. (Сидорова и др., 2018; Zhi et al., 2017; Wang et al., 2018). Штаммы бацилл характеризуются многообразием метаболических процессов и способностью к синтезу БАВ, различающихся по химической природе и механизму действия (Павлюшин и др., 2020; Сидорова и др., 2018; Максимов и др., 2020). Показано, что штаммы *B. subtilis* образуют индивидуальный набор антибиотиков (полимиксин, циркулин и колистин), активный против фитопатогенных грибов *Alternaria solani*, *Aspergillus flavus*, *Botryosphaeria ribis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Bipolaris maydis*, *Septoria arcuata* (Fira et al., 2018). Антимикробные вещества, как правило, действуют синергетически, обуславливая выраженный антипатогенный эффект (Duan et al., 2021). Например, высокая антагонистическая активность штамма *B. velezensis* FJAT-46737 в отношении нескольких фитопатогенов, включая бактерию *Ralstonia solanacearum* и гриб *F. oxysporum*, обусловлена секрецией липопептидов, состоящих из итуринов, фенгицинов и сурфактинов (Chen et al., 2020). Многие изоляты р. *Bacillus* продуцируют несколько противогрибных циклических липопептидов (CLP), включая представителей семейств сурфактина, итурина и фенгицина (Togges et al., 2016). Показано, что липопептиды, принадлежащие семействам итурина, фенгицина и сурфактина, наиболее важны в антагонистической активности ряда изолятов *Bacillus* в отношении фитопатогенных грибов у разных видов растений (Максимов и др., 2020; Masmoudi et al., 2017; Abdallah et al., 2017). Таким образом, важная составляющая защитного эффекта биопрепаратов – прямая антагонистическая активность штаммов-продуцентов в отношении фитопатогенных видов, обусловленная синтезом метаболитов, препятствующих заселению растений патогенами.

Все больше накапливается данных, свидетельствующих о том, что штаммы микробов-антагонистов могут подавлять заражение листьев фитопатогенами не только за счет антибиоза, но и за счет индукции системной устойчивости (Черепанова и др., 2019). Показано, что, помимо прямого антагонистического действия на клетки возбудителя, бациллы способны повышать болезнеустойчивость растений синтезируя соединения – элиситоры, благодаря которым происходит активация системной индуцированной устойчивости (induced systemic resistance (ISR) и системной приобретенной устойчивости (systemic acquired resistance (SAR)). (Максимов и др., 2020, 2015; Pieterse et al., 2014; Wang, 2018, Abdallah et al., 2017). Ассоциированные с растениями полезные сапротрофные микроорганизмы (*Bacillus* spp. и *Pseudomonas* spp.) индуцируют иммунную систему растений в ответ на внедрение патогена

через механизм активации запуска жасмонат-этиленового сигнального пути (JA/ET), опосредованного сигнальным белком NRP-1, и пути салициловой кислоты (SA) (Максимов и др., 2020; Llorens et al., 2017; Chowdhury и др., 2015; Alkoogane et al., 2017). Жасмоновая, салициловая кислоты и этилен составляют основу сигнальной сети, ответственной за координированный биохимический и физиологический защитный ответ на заражение патогеном (ISR или SAR). Элиситорами, запускающими защитные механизмы растения, могут быть белки, липопептиды, флагеллин, полисахариды и другие соединения, ассоциированные с клеточной стенкой *B. subtilis* (Максимов и др., 2015; Maksimov et al., 2014). В потоке работ, характеризующих способность бактерий индуцировать защитные системы растений, особый интерес представляет информация о регуляции липопептидами функционирования компонентов фитозащитной системы (Максимов и др., 2020).

В настоящее время усилия многих исследователей направлены на разработку методов повышения эффективности биопрепаратов. По нашему мнению, этой цели можно достичь за счет усиления индуцирующей активности штамма – продуцента путем включения в состав препаративной формы природных или синтетических активаторов болезнеустойчивости. Это направление исследований активно развивается в лаборатории микробиологической защиты ВИЗР. В основание такого подхода легло предположение, что высокий защитный эффект таких комплексных биопрепаратов будет обусловлен сочетанием антагонистических свойств штамма микроорганизма со способностью индуктора устойчивости совместно с биологически активными веществами активизировать механизмы естественной устойчивости растений к патогенам.

В нашей стране широко известен биопрепарат Витаплан, СП, разработанный в ВИЗР на основе высокоактивных штаммов *B. subtilis* (ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D), который используется для защиты сельскохозяйственных культур от грибных и бактериальных болезней (Новикова и др., 2011, 2013; Novikova et al., 2017). Для усиления биологической активности биопрепаратов, на наш взгляд, целесообразно включить в препаративную форму в качестве индуктора устойчивости природный полисахарид хитозан или его производное. Для создания таких комплексных биопрепаратов в качестве индуктора был использован салицилат хитозана. В ранее проведенных исследованиях была выявлена высокая активность салицилата хитозана, индуцирующая устойчивость к бурой ржавчине и темно-бурой пятнистости пшеницы (Попова и др., 2018). Обработка салицилатом хитозана (0.1%) вегетирующих растений пшеницы уменьшала степень поражения растений корневой гнилью на 79.0%, желтой ржавчиной – на 29.1% и полностью подавляла развитие мучнистой росы в период вегетации растений (Колесников и др., 2022).

Учитывая потребность сельского хозяйства в расширении ассортимента микробиологических средств защиты растений, проблема повышения биологической эффективности биопрепаратов представляется актуальной.

В нашей работе для оценки перспективности включения в состав препаративной формы индуктора болезнеустойчивости использован лабораторный образец в виде культуральной жидкости (КЖ), полученный при глубинном культивировании штаммов-продуцентов *B. subtilis*

ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D на среде с добавлением салицилата хитозана (СХ).

Цель работы состоит в том, чтобы оценить вклад КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D и ее отдельных компонентов (супернатант и суспензия

бактериальных клеток) в формирование индуцированной устойчивости пшеницы по отношению к темно-бурой пятнистости и бурой ржавчине, а также определить оптимальный срок применения изучаемых лабораторных образцов.

Материалы и методы

В работе использовали яровую пшеницу *Triticum aestivum* L. сорта Саратовская 29. Для заражения использовали возбудителей темно-бурой пятнистости *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker и бурой ржавчины *Puccinia triticina* Erikss. – наиболее вредоносных болезней пшеницы. Штаммы фитопатогенных микромицетов взяты из «Государственной коллекции микроорганизмов, патогенных для растений и их вредителей» Центра коллективного пользования научным оборудованием «Инновационные технологии защиты растений» ФГБНУ ВИЗР.

В работе использовали КЖ, полученную при глубинном культивировании штаммов-продуцентов препарата Витаплан, СП – *B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D на среде с добавлением СХ.

Глубинное культивирование штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D проводили при 28 °С в течение 72 ч на питательной среде следующего состава (г/л): кукурузный экстракт – 30, меласса – 15, рН – 7.2 в колбах объемом 750 мл с 100 мл среды на круговой качалке при 220 об./мин. Титр полученной культуральной жидкости составил 10^{10} КОЕ/мл.

Схема опыта предусматривала следующие варианты:

1. Контроль (вода).
2. КЖ штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и *B. subtilis* ВКМ В-2605D при соотношении 1:1 (КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D).
3. КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1 % СХ. При получении образца в питательную среду для глубинного культивирования добавляли 0.1 % СХ.
4. Композиция КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1 % СХ. К 72-часовой культуральной жидкости, разведенной дистиллированной водой в 10 раз (титр 10^9 КОЕ/мл), добавляли СХ до концентрации 0.1 %.
5. СХ 0.1 %.

СХ получали из хитозана с молекулярной массой 60 кДа со степенью деацетилирования 85 % («Биопрогресс», Россия) согласно методу (Попова и др., 2021). Титр жизнеспособных клеток в образцах определяли стандартным методом десятикратных серийных разведений с высевом на СПА (сухой питательный агар для культивирования микроорганизмов (АО «НПО «Микроген») и последующим подсчетом числа выросших колоний (ОФС.1.7.2.0008.15).

Изучение прямого фунгистатического действия исследуемых образцов проводили *in vitro* методом агаровых блоков. В стерильные чашки Петри разливали охлажденную до 40 °С агаризованную среду Чапека. После застывания на поверхность среды равномерно наносили суспензию испытуемых образцов препаратов (0.2 мл), а затем помещали блоки 10-суточных культур *B. sorokiniana* диаметром 6 мм, вырезанные стерильным сверлом из мицелиальных газонов грибов, выращенных на агаре Чапека в течение 8–10 суток. В качестве контроля использовали чашки с агаризованной средой Чапека с блоками тест-культуры без испытуемых образцов препаратов. Чашки инкубировали

в темноте при 25 °С. Диаметр колоний гриба измеряли на 7-е сутки культивирования, после чего оценивали фунгистатическое действие образцов по формуле Эббота (Андреева, 1990).

Опыты по оценке иммуномодулирующей активности исследуемых образцов проводили методом отделенных листьев (Михайлова и др., 2012). Семисуточные проростки мягкой пшеницы восприимчивого сорта Саратовская 29 опрыскивали растворами лабораторных образцов (из расчета 30 мл на 100 растений), согласно схеме опыта, за 24 ч до инокуляции патогеном – гембиотрофом *B. sorokiniana* (4×10^3 ; 2×10^4 спор/мл) или биотрофом *P. triticina* (2000 пу-стул/мл). Концентрация клеток (титр) штаммов *B. subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D в образцах составляла от 10^7 до 10^9 КОЕ/мл). На следующий день готовили газоны, нарезая и укладывая листья плотным слоем в кювете (30×30 см) на стеклянной пластине, покрытой фильтровальной бумагой. Затем кювету опрыскивали взвесью спор по 10 мл, и оставляли в темноте на сутки. Время заражения считали началом опыта. На следующий день аккуратно добавляли раствор бензимидазола (0.004%), который поддерживает метаболизм в отрезках листьев пшеницы на уровне, при котором тип реакции к возбудителю соответствует таковому для интактных растений. Пораженность листьев оценивали на 4-е сутки после заражения *B. sorokiniana* и на 7-е сутки после заражения *P. triticina* по интенсивности развития болезни в % согласно описанию (Михайлова и др., 2012). В контроле растения обрабатывали водой.

Влияние полученных лабораторных образцов на прорастание конидий *B. sorokiniana* изучали в капле раствора образца (200 мкл). Для этого 0.1 мл раствора образца наносили на предметное стекло, добавляли 0.1 мл спор *B. sorokiniana* и выдерживали в темноте при 22 °С во влажной камере в течение 24 ч. Прорастание конидий оценивали микроскопированием, просматривая не менее 200 конидий в варианте и в контроле (в воде) и определяя долю проросших спор.

КЖ высокоактивных штаммов *Bacillus subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D получали методом глубинного культивирования. КЖ состоит из вегетативных клеток и спор *B. subtilis*, остатков питательной среды, а также метаболитов, выделенных в среду микроорганизмами в процессе ферментации.

Супернатант (СН) – бесклеточная надосадочная жидкость, полученная путем центрифугирования КЖ при 7000 об/мин. в течение 15 минут и отделения осадка клеток.

Суспензия бактериальных клеток (СБК) – водная суспензия промытых стерильной водой клеток, полученных центрифугированием КЖ с титром 10^9 КОЕ/мл.

Все опыты проводили в 3-кратной повторности, полученные данные обрабатывали с использованием методов описательной статистики на основе, наименьшей существенной разности НСР при $p < 0.05$.

Результаты

В ранее проведенных нами исследованиях обнаружена способность КЖ высокоактивных штаммов *Bacillus subtilis* ВКМ В-2604D и ВКМ В-2605D индуцировать системную устойчивость пшеницы по отношению к темно-бурой пятнистости. Опрыскивание растений пшеницы КЖ этих штаммов с титром 10^9 КОЕ/мл, предшествующее последующему заражению возбудителем темно-бурой

пятнистости *B. sorokiniana* снижало площадь поражения листьев на 20% (Новикова и др., 2021). В настоящей работе использование данной концентрации бактериальных клеток позволило подтвердить данный результат и показать аналогичный эффект в отношении бурой ржавчины (табл. 1).

Таблица 1. Влияние культуральной жидкости (КЖ) *Bacillus subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D (КЖ), супернатанта (СН) и суспензии бактериальных клеток (СБК) на устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости и бурой ржавчине (опрыскивание за одни сутки до заражения)

№ п/п	Вариант	Титр бактериальных клеток, КОЕ/мл	Пораженность листьев, %		
			Темно-бурая пятнистость		Бурая ржавчина
			2×10^4 спор/мл	4×10^3 спор/мл	
1	Контроль (вода)	-	60	30	60
2	КЖ	10^9	40	15	40
3	СН	-	40	15	50
4	СБК	10^9	50	30	60
	$HCP_{0.05}$		4.5	5.0	6.0

Table 1. The influence of the cultural liquid (CL) of *Bacillus subtilis* VKM B-2604D + VKM B-2605D, cell-free supernatant (CFS) and bacterial cell suspension (BCS) on wheat resistance to spot blotch and leaf rust, spraying one day before the inoculation

#	Experimental variant	Bacterial cell concentration, CFU/mL	Leaf infestation, %		
			spot blotch		Leaf rust
			2×10^4 spore/ml	4×10^3 spore/ml	
1	Control (water)	-	60	30	60
2	CL	10^9	40	15	40
3	CFS	-	40	15	50
4	BCS	10^9	50	30	60
	$LSD_{0.05}$		4.5	5.0	6.0

Установлено, что развитие темно-бурой пятнистости и бурой ржавчины на листьях пшеницы снижалось после предварительной обработки растений КЖ и СН. В обоих вариантах опыта пораженность листьев возбудителем *B. sorokiniana* снижалась в 1.5–2 раза в зависимости от инфекционной нагрузки по сравнению с контролем. Обработка листьев КЖ и СН также уменьшала пораженность листьев пшеницы бурой ржавчиной на 20 и 10% по сравнению с контролем, соответственно (табл. 1). СБК не подавляла развитие симптомов болезней.

Согласно поставленной цели, было проведено сравнительное изучение биологической эффективности новых лабораторных образцов, содержащих в своем составе, помимо биологически активных бактериальных метаболитов, СХ или его олигомеры: КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ и композиция КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ.

Известно, что при оценке качества биопрепарата главный показатель – антагонистическая активность, которая определяется соединениями, подавляющими или замедляющими рост и развитие фитопатогенных грибов и других микроорганизмов. Поэтому, в первую очередь, была проведена оценка антагонистической активности полученных новых образцов с титром 10^9 КОЕ/мл по отношению к возбудителю темно-бурой пятнистости пшеницы *in vitro* (табл. 2).

Установлена высокая фунгистатическая активность КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D, которая составляла 73.3% на 7-е сутки опыта. При добавлении в среду для глубинного культивирования 0.1% СХ (КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ) высокая антигрибная активность сохранялась (70.8%). Композиция КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ, полученная путем включения СХ в КЖ, ингибировала мицелиальный рост аскомицета до 57.5%. Снижение фунгистатической активности композиции по сравнению с КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D на 7-е сутки культивирования, во-видимому, связано с влиянием 0.1% СХ, обладающим невысоким фунгистатическим эффектом (38.6%).

Поскольку споры грибов – главный источник инфицирования растений, то для развития болезни большое значение имеет доля проросших спор. Данные, представленные в таблице 2, показывают, что КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D в 1.8 раз снижала прорастание конидий *B. sorokiniana* (47.6%) по сравнению с контролем (85.2%). Образец КЖ + 0.1% СХ также ингибировал прорастание конидий аскомицета на 50.0% по сравнению с контролем. Экспериментально установлен высокий ингибирующий эффект на прорастание конидий *B. sorokiniana* для композиции КЖ + 0.1% СХ, которая практически в 10 раз снижала количество проросших конидий гриба. Если в контроле через 24 ч. проросло 85.2%, то в опыте

Таблица 2. Фунгистатическая активность лабораторных образцов культуральной жидкости (КЖ) *Bacillus subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D и салицилата хитозана (СХ) по отношению к возбудителю темно-бурой пятнистости пшеницы *Bipolaris sorokiniana*

№ п/п	Вариант опыта	Ингибирование роста мицелия <i>B. sorokiniana</i> , % к контролю, 7 сут.	Доля проросших конидий <i>B. sorokiniana</i> за 24 ч, %
1	Контроль (вода)	–	85.2
2	0.1 % СХ	38.6	3.3
2	КЖ	73.3	47.6
3	КЖ + 0.1 % СХ*	70.8	50.0
4	Композиция КЖ + 0.1 % СХ**	57.5	9.0
	НСР _{0.5}	3.8	4.3

* СХ включали в среду при глубинном культивировании бактерий.

** СХ добавляли в КЖ.

Table 2. Fungistatic activity of laboratory samples of *Bacillus subtilis* strains VKM B-2604D + VKM B-2605D culture liquid (CL) and chitosan salicylate (CS) against the agent spot blotch of wheat *Bipolaris sorokiniana*

№ п/п	Experimental variant	<i>B. sorokiniana</i> mycelium growth inhibition, % in relation to the control, 7 th day	Proportion of germinated conidia of <i>B. sorokiniana</i> , 24 h, %
1	Control (water)	–	85.2
2	0.1 % CS	38.6	3.3
2	CL	73.3	47.6
3	CL + 0.1 % CS*	70.8	50.0
4	The composition CL + 0.1 % CS**	57.5	9.0
	LSD _{0.5}	3.8	4.3

* CS added during submerged cultivation of the bacteria.

** CS added to CL.

обнаружено только 9.0% проросших конидий (табл. 2). По-видимому, такая высокая ингибирующая активность композиции обусловлена включением в КЖ данной композиции 0.1% СХ, который активно сдерживал прорастание конидий аскомицета – количество проросших спор в варианте опыта с СХ через сутки составило всего 3.3%.

Предварительные результаты исследования показали, что новые образцы проявляют повышенную фунгистатическую активность в отношении аскомицета *B. sorokiniana*.

Известно, что биологическая активность биопрепаратов зависит от плотности бактериальных клеток и времени их применения (до заражения патогеном или после) (Zhang, 2010). Поэтому следующим этапом наших исследований было определение оптимальной концентрации бактериальных клеток в новых образцах и оптимального

времени для проявления их биологической эффективности в отношении темно-бурой пятнистости и бурой ржавчины пшеницы.

Выявлена зависимость индуцирующей активности опытных образцов от концентрации бактериальных клеток. Из всех испытанных концентраций бактериальных клеток (10^7 – 10^9 КОЕ/мл) КЖ была наиболее эффективной (титр клеток 10^9 КОЕ/мл) и подавляла развитие темно-бурой пятнистости и бурой ржавчины на 20% по отношению к контролю (табл. 3). Образец КЖ + 0.1% СХ показал наибольшую индуцирующую активность также при плотности клеток 10^9 КОЕ/мл. Высокий индуцирующий эффект композиции КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ сохранялся в диапазоне концентрации клеток 10^7 – 10^9 КОЕ/мл, снизив развитие темно-бурой пятнистости

Таблица 3. Влияние плотности клеток *Bacillus subtilis* на индуцирующую активность опытных образцов культуральной жидкости (КЖ) (опрыскивание за 1 сут до заражения), в том числе в присутствии салицилата хитозана (СХ)

№ п/п	Вариант опыта	Плотность клеток, КОЕ/мл	Поражение листьев, %	
			Темно-бурая пятнистость	Бурая ржавчина
1	Контроль (вода)	–	50	70
2	КЖ (1:10)	10^9	30	50
3	КЖ (1:100)	10^8	50	70
4	КЖ (1:1000)	10^7	60	75
5	КЖ (1:10) + 0.1 % СХ*	10^9	20	40
6	КЖ (1:100) + 0.1 % СХ*	10^8	40	60
7	КЖ (1:1000) + 0.1 % СХ*	10^7	50	60
8	Композиция КЖ (1:10) + 0.1 % СХ**	10^9	10	10
9	Композиция КЖ (1:100) + 0.1 % СХ**	10^8	15	15
10	Композиция КЖ (1:1000) + 0.1 % СХ**	10^7	20	15
	НСР _{0.05}		4.5	9.0

Обозначения, как в таблице 2.

Table 3. Effect of *Bacillus subtilis* cell density on the inducing activity of experimental samples of culture liquid (CL) sprayed one day before inoculation, including the addition of chitosan salicylate (CS)

#	Experimental variant	Cell density, CFU/mL	Leaf infestation, %	
			Spot blotch	Leaf rust
1	Control (water)	-	50	70
2	CL (1:10)	10 ⁹	30	50
3	CL (1:100)	10 ⁸	50	70
4	CL (1:1000)	10 ⁷	60	75
5	CL (1:10) + 0.1 % CS*	10 ⁹	20	40
6	CL (1:100) + 0.1 % CS*	10 ⁸	40	60
7	CL (1:1000) + 0.1 % CS*	10 ⁷	50	60
8	The composition CL (1:10) + 0.1 % CS**	10 ⁹	10	10
9	The composition CL (1:100) + 0.1 % CS**	10 ⁸	15	15
10	The composition CL (1:1000) + 0.1 % CS**	10 ⁷	20	15
	LSD _{0.05}		4.5	9.0

Designations as in Table 2.

в 3–5 раз, а бурой ржавчины – в 5–7 раз, но наибольшую эффективность образец показал также в варианте с титром клеток 10⁹ КОЕ/мл.

При оценке влияния времени обработки новыми образцами на развитие листовых болезней пшеницы выявлены различия в индуцирующей активности образцов в отношении устойчивости пшеницы к темно-бурой пятнистости и бурой ржавчине при их применении за 1 и 2 дня до заражения и через 1 и 2 день после заражения (табл. 4). Из всех вариантов применения образцов (до и после заражения) предварительная обработка за одни сутки до инокуляции патогеном была наиболее эффективной, значительно снижающей развитие болезней.

Предварительная (за одни сутки до инокуляции патогеном) обработка растений пшеницы КЖ с последующим заражением снижала площадь поражения листьев темно-бурой пятнистостью на 30%, а бурой ржавчиной – на 20% по сравнению с контролем. Добавление СХ к КЖ значительно повысило индуцирующую активность

культуральной жидкости. Опрыскивание растений пшеницы образцом КЖ + 0.1 % СХ сокращало пораженность листьев темно-бурой пятнистостью на 40%, а бурой ржавчиной – на 30%. Для улучшения индуцирующей активности композиции нами был использован СХ, который способен индуцировать системную устойчивость к патогенам самостоятельно или в сочетании с метаболитами КЖ. Результаты подтвердили наше предположение. Композиция КЖ + 0.1 % СХ наиболее эффективно повышала устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости, что выразилось в снижении площади поражения листьев в 6 раз, а бурой ржавчиной – в 10 раз по отношению к контролю. Использование СХ также существенно снизило площадь поражения листьев при опрыскивании за сутки до заражения, однако хорошо известно, что применение индукторов болезнеустойчивости на уже зараженных растениях неэффективно (Васюкова, Озерецковская, 2007, Васюкова и др., 2010).

Таблица 4. Влияние времени обработки лабораторными образцами культуральной жидкости (КЖ) *Bacillus subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D и салицилата хитозана (СХ) на устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости и бурой ржавчине при концентрации бактериальных клеток 10⁹ КОЕ/мл

№ п/п	Вариант опыта	Время опрыскивания растений	Площадь поражения листьев, %	
			Темно-бурая пятнистость	Бурая ржавчина
1	Контроль (без опрыскивания)	-	60	50
2	КЖ	За 2 суток до заражения	50	40
3	КЖ	За 1 сутки до заражения	30	30
4	КЖ	Через 1 сутки после заражения	50	40
5	КЖ	Через 2 суток после заражения	60	50
6	КЖ + 0.1 % СХ*	За 2 суток до заражения	30	25
7	КЖ + 0.1 % СХ*	За 1 сутки до заражения	20	20
8	КЖ + 0.1 % СХ*	Через 1 сутки после заражения	40	30
9	КЖ + 0.1 % СХ*	Через 2 суток после заражения	60	50
10	Композиция КЖ + 0.1 % СХ**	За 2 суток до заражения	25	10
11	Композиция КЖ + 0.1 % СХ**	За 1 сутки до заражения	10	5
12	Композиция КЖ + 0.1 % СХ**	Через 1 сутки после заражения	40	30
13	Композиция КЖ + 0.1 % СХ**	Через 2 суток после заражения	50	40
14	0.1 % СХ	За 1 сутки до заражения	5	3
	НСР _{0.05}		4.5	9.0

Обозначения, как в таблице 2.

Table 4. Effect of treatment time of laboratory samples of *Bacillus subtilis* strains VKM B-2604D + VKM B-2605D culture liquid (CL) and chitosan salicylate (CS) on resistance of wheat to spot blotch and leaf rust at the bacterial cell concentration 10^9 CFU/mL

#	Experimental variant	Plant spraying timing	Square of leaf infestation, %	
			Spot blotch	Leaf rust
1	Control (no spraying)	-	60	50
2	CL	2 days before inoculation	50	40
3	CL	1 day before inoculation	30	30
4	CL	1 day after inoculation	50	40
5	CL	2 days after inoculation	60	50
6	CL + 0.1 % CS*	2 days before inoculation	30	25
7	CL + 0.1 % CS*	1 day before inoculation	20	20
8	CL + 0.1 % CS*	1 day after inoculation	40	30
9	CL + 0.1 % CS*	2 days after inoculation	60	50
10	The composition CL + 0.1 % CS**	2 days before inoculation	25	10
11	The composition CL + 0.1 % CS**	1 day before inoculation	10	5
12	The composition CL + 0.1 % CS**	1 day after inoculation	40	30
13	The composition CL + 0.1 % CS**	2 days after inoculation	50	40
14	0.1 % CS	1 day before inoculation	5	3
LSD _{0.05}			4.5	9.0

Designations as in Table 2.

Обсуждение

Результаты сравнительной оценки участия КЖ штаммов *B. subtilis* VKM B-2604D и VKM B-2605D и ее компонентов (СН и СБК) показали, что обработка пшеницы СН и КЖ снижала пораженность листьев темно-бурой пятнистостью в 1.5–2 раза, а бурой ржавчиной на 20 и 10% по сравнению с контролем. СБК не оказала влияния на развитие болезней. Это позволяет предположить, что изучаемые штаммы-продуценты *B. subtilis* способны синтезировать метаболиты, обладающие индуцирующей активностью. По всей видимости, в составе КЖ и ее СН присутствуют биологически активные метаболиты, обладающие элиситорной активностью и ответственные за проявление индуцированной устойчивости пшеницы к темно-бурой пятнистости и бурой ржавчине. Важно отметить, что наибольшей индуцирующей активностью обладала именно КЖ.

Полученные данные согласуются с исследованиями Крючковой (Kriuchkova, 2017), которая показала, что предварительная обработка культуральным фильтратом штамма *Bacillus amyloliquefaciens* IMV B-7404 снижает пораженность листьев ячменя грибом *B. sorokiniana*, а применение СБК не уменьшает развития болезни. Аналогичные результаты получены в других работах, где авторы установили, что именно в бесклеточном культуральном фильтрате *B. subtilis* содержатся метаболиты, обладающие элиситорной активностью и вызывающие индуцированную устойчивость томата к фузариозному вилту (Акрам, 2014) и риса к бактериальной пятнистости (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Akhtar, 2020).

Новые образцы КЖ *B. subtilis* VKM B-2604D + VKM B-2605D + 0.1 % СХ и композиция КЖ *B. subtilis* VKM B-2604D + VKM B-2605D + 0.1 % СХ были получены в виде КЖ, которая содержала комплекс активных бактериальных метаболитов и, дополнительно, СХ и олигомеры хитозана. Все новые образцы КЖ *B. subtilis* VKM B-2604D + VKM B-2605D проявляли повышенную ингибирующую активность в отношении прорастания конидий аскомицета

B. sorokiniana. Однако стоит отметить, что существуют значительные различия между испытанными вариантами в эффективности подавления прорастания спор гриба *B. sorokiniana*, которые играют главную роль в инфекционном процессе. Композиция КЖ *B. subtilis* VKM B-2604D + VKM B-2605D + 0.1 % СХ в 10 раз эффективнее ингибировала прорастание конидий по отношению к контролю, тогда как исходный КЖ *B. subtilis* VKM B-2604D + VKM B-2605D без СХ и образец КЖ *B. subtilis* VKM B-2604D + VKM B-2605D + 0.1 % СХ только вдвое снижали прорастание конидий по сравнению с контролем.

Согласно исследованиям Шенина с соавт. (1995) и Новиковой с соавт. (2011), высокая биологическая эффективность биопрепарата Витаплан обусловлена синтезом штаммами *B. subtilis* метаболитных комплексов сложного состава, включающего пептидные и полиеновые антибиотики, обладающие антибактериальной и антигрибной активностью. Установленная в работе высокая фунгистатическая активность всех образцов КЖ по отношению к *B. sorokiniana* (табл. 2), по видимому, определяется синтезом штаммами *B. subtilis* антибиотических веществ, подавляющих или замедляющих рост фитопатогена. Высокая способность подавлять прорастание конидий, очевидно, обусловлена наличием в КЖ метаболитов с фунгицидной активностью. Повышенная активность композиции КЖ *B. subtilis* VKM B-2604D + VKM B-2605D, проявляющаяся в ингибировании прорастания конидий патогена, усиливается добавлением в состав КЖ салицилатом хитозана.

Скорее всего, этот эффект связан с тем, что СХ также может обладать прямым действием на патогена, блокируя прорастание спор, поскольку хитозан – пленкообразующий полимер. Нанесенный на листья растений, он может задерживать проникновение и развитие микроорганизмов (Луньков, 2019). Это согласуется с проведенными ранее гистологическими исследованиями, которые показали, что на поверхности плодов цитрусовых, обработанных хитозаном, наблюдалось ограничение роста патогена и

нарушение структуры его гиф (Benhamou, 2004), и подтверждено нашими результатами по ингибированию прорастания конидий *B. sorokiniana*.

В литературе накапливается все больше данных, свидетельствующих о том, что микробы-антагонисты могут подавлять инвазию патогенов как за счет антибиоза, так и за счет активации системной индуцированной устойчивости (ISR) и системной приобретенной устойчивости (SAR) (Черепанова и др., 2019; Vlot et al., 2020). Эти два защитных механизма используют разные пути метаболизма растений; SAR требует синтеза салициловой кислоты (SA), которая, в свою очередь, запускает экспрессию хорошо известного набора генов, связанных с патогенезом (PR), в то время как ISR зависит от передачи сигналов жасмоновой кислоты (JA) и этилена (ET) (Vlot et al., 2009; Pieterse et al., 2014).

Индукцированный иммунитет базируется на активации элиситорами каскада защитных реакций самого растения – хозяина. Индуцируемые элиситорами защитные реакции включают генерацию активных форм кислорода (АФК) (Smith et al., 2014), синтез каллозы, укрепление клеточной стенки лигнином, развитие реакции сверхчувствительности, которая вызывает гибель растительных клеток и патогена в зоне его внедрения (Shen et al., 2019), индукцию генов, вовлеченных в синтез защитных белков (PR-белков) с антимикробной (тионины, дефензины, ингибиторы протеиназ) и литической активностью (хитиназы, глюканазы) (Park et al., 2016), повышение активности многих ферментов, связанных с защитой, особенно оксидоредуктаз (пероксидаз, липоксигеназ, полифенолоксидаз, фенилаланин-лиаз) (Rais et al., 2017), а также индукцию фенол-пропаноидного пути и повышение уровня фитоалексинов (Reis et al., 2004). Все известные молекулярные механизмы формирования фитоиммунитета обсуждаются в следующих обзорах (Карпун и др., 2015; Шафикова и др., 2015; Максимов и др., 2015; Кабашников, 2020; Park et al., 2016; Azmina et al., 2020).

Проблема эффективного применения элиситоров заключается в необходимости быстрой индукции собственных защитных механизмов растения. Следовательно, стратегия применения индукторов устойчивости должна осуществляться путем предварительной обработки вегетирующих растений таким образом, чтобы активировать в растениях реакции защиты, развитие которых зависит от времени их применения. Установлено, что из всех вариантов применения образцов КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D с титром 10^9 КОЕ/мл обработка за сутки до инокуляции фитопатогеном оказалась наиболее эффективной. Предварительная обработка растений пшеницы КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D с последующим заражением возбудителем темно-бурой пятнистости снижала площадь поражения листьев темно-бурой пятнистостью на 30%, а бурой ржавчиной – на 20% по сравнению с контролем. Опрыскивание растений пшеницы образцом КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СК сокращало пораженность листьев болезнями на 30%. Композиция КЖ *B. subtilis* ВКМ В-2604D + ВКМ В-2605D + 0.1% СХ проявила наибольшую эффективность в защите пшеницы от темно-бурой пятнистости и бурой ржавчины, что выразилось в снижении площади поражения листьев в 6 раз и в 10 раз по отношению к контролю.

Многочисленные биохимические реакции, индуцируемые элиситорами, протекают в определенной последовательности. Развитие защитных реакций, несомненно, связано с индукцией транскрипционной активности генов, кодирующих определенные защитные белки. Уровень накопления продуктов и скорость индукции этих защитных генов в растении-хозяине коррелируют со степенью его устойчивости к болезням. Формирование индуцированной устойчивости зависит от скорости активации защитных реакций, поэтому важен интервал времени между применением индуцирующего агента и развитием ответных биохимических реакций у растения. Так, в листьях арабидопсиса, обработанных бактериальным флагеллином flg22, в ответ на заражение *Pseudomonas syringae* уже через 20 мин. резко возрастала продукция активных форм кислорода (АФК), достигая максимума через 35–40 мин. (Smith et al., 2014). В растениях перца чили, обработанных штаммом *Bacillus vallismortis* EXTN-1, уже через 12 ч после заражения *Pseudomonas capsici* резко повышалась экспрессия связанных с защитой маркерных генов PR1 (хитиназы), PR4 (пероксидазы) и PR10 (β -1,3-глюканазы), которые участвуют в снижении развития болезни, активируя ISR (Park et al., 2016). В растениях пшеницы, обработанных продуцирующим сурфактин штаммом *B. subtilis* 24Д, инфицирование грибом *Parastagonospora nodorum* способствовало активации транскрипции гена PR-9, кодирующего анионную пероксидазу. Уже через 24 ч уровень фермента был в 3 раза выше по сравнению с контрольными растениями. Существенно возрастала экспрессия гена, кодирующего липоксигеназу (LOX), а транскрипционная активность гена PR-6 (ингибитора протеиназ) была более, чем в 200 раз выше по сравнению с контрольными растениями (Черепанова и др., 2019).

Как правило, микроорганизмы активируют у растений защитные механизмы ISR, но некоторые штаммы способны включать и SAR. Обработка растений кукурузы штаммом *B. subtilis* через 24 ч индуцировала активацию защитных генов белков, а именно, PR-1 и PR-4 антимикробных белков, которые обеспечивали полную защиту от *Fusarium moniliforme* благодаря механизмам SAR (Gond et al., 2015). Белковый элиситор (АМЕР412) из *B. subtilis* BU412 индуцировал SAR табака к *P. syringae*: запускал реакцию гиперчувствительности) в листьях табака, стимулировал образование АФК и активировал индукцию защитных ферментов, включая супероксиддисмутазу (SOD), пероксидазу (POD), полифенолоксидазу (PPO) и фенилаланин-аммиак лиазу (PAL) уже через 8 ч. после обработки. Пик активности ферментов наблюдался через 24 ч (Shen et al., 2019). Чаще всего все эти защитные реакции возникали примерно через 24 ч после обработки бактериальными штаммами. Однако некоторым элиситорам требовалось более 2 дней, чтобы индуцировать защитные реакции. Снижение развития пирикулярриоза в растениях риса, обработанных штаммами *Bacillus* spp., коррелировало с резким увеличением активности антиоксидантных ферментов, связанных с механизмами защиты: SOD (в 1.7 раза), POD (в 3.5 раза), PPO (в 3 раза), ФАЛ (в 3.9 раз). Активность ферментов достигала максимума на 4-е сутки после инокуляции *Pyricularia oryzae*, что свидетельствовало о запуске ISR к *P. oryzae* (Rais et al., 2017). Индуцируемая эндифитами и их метаболитами устойчивость сохраняется

в растениях долгое время, описываемая в научной литературе термином «прайминг», эффективно функционирует против патогенов наряду с прямым биоцидным действием метаболитов (Lastochkina et al., 2019).

Кроме того, уровень активации индуцированных защитных реакций зависит от концентрации элиситора, что показано на примере растений томата, обработанных бесклеточным фильтратом *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* MBI60024 (Dimopoulou et al., 2019). Косвенно

о концентрации метаболитов с элиситорной активностью в культуральной жидкости биопрепарата можно судить по титру бактериальных клеток. В настоящей работе анализ результатов изучения индуцирующей активности всех испытанных вариантов показал, что их способность повышать устойчивость пшеницы к темно-бурой пятнистости и бурой ржавчине зависит от титра бактериальных клеток и сроков обработки растений пшеницы.

Заключение

Таким образом, из всех испытанных образцов с разной плотностью клеток от 10^7 до 10^9 КОЕ/мл наиболее эффективным был вариант с максимальным титром, который подавлял развитие темно-бурой пятнистости и бурой ржавчины на 20% по отношению к контролю. Образец КЖ с добавлением 0.1% СХ также эффективно снижал развитие болезней, его высокий защитный эффект композиции сохранялся в диапазоне более низких значений концентрации клеток (10^7 – 10^8 КОЕ/мл). Это можно объяснить тем, что к действию метаболитов микроба-антагониста присоединяется действие СХ. Как было сказано выше, эффективность СХ как индуктора в защите пшеницы от комплекса болезней установлена нами в последних работах (Попова и др., 2021; Колесников и др., 2022). Механизм такого действия может быть обусловлен наличием в КЖ олигомеров

хитозана, образующихся при гидролизе СХ хитинолитическими ферментами бактерии в процессе ферментации (San-Lang et al., 2006). Олигомеры хитина и хитозана, как известно, эффективные элиситоры индуцированной устойчивости растений (Yin et al., 2013; Deepmala et al., 2014). Ранее опубликованные работы позволяют предположить, что различные метаболиты с биоцидной и элиситорной активностью, продуцируемые бактериальными штаммами, активизируют механизмы естественной устойчивости растений к патогенам совместно с хитозановыми индукторами устойчивости. Оптимальная концентрация бактериальных клеток в новых образцах и время их применения – важные элементы, определяющие их биологическую эффективность.

Библиографический список (References)

- Андреева ЕИ, ред (1990) Методические рекомендации по испытанию химических веществ на фунгицидную активность. Черкассы: НИИТЭХИМ. 67 с.
- Варламов ВП., Немцев СВ., Тихонов ВЕ (2010) Хитин и хитозан: природа, получение и применение. М. 292 с.
- Васюкова НИ, Озерецковская ОЛ (2007) Индуцированная устойчивость растений и салициловая кислота. *Прикладная биохимия и микробиология* 43(4): 405–411
- Васюкова НИ, Озерецковская ОЛ, Чаленко ГИ, Герасимова НГ и др. (2010) Иммуномодулирующая активность производных хитозана с салициловой кислотой и ее фрагментами. *Прикл. биохимия и микробиология* 46(3):379–384
- Кабашникова ЛФ (2020) Прайминг защитных реакций в растениях при патогенезе: приобретенный иммунитет. *Журнал Белорусского государственного университета. Экология* 4:19–29 <https://doi.org/10.46646/2521-683X/2020-4-19-29>
- Карпун НН, Янушевская ЭБ, Михайлова ЕВ (2015) Механизмы формирования неспецифического индуцированного иммунитета у растений при биогенном стрессе (обзор). *Сельскохозяйственная биология* 50(50):540–549. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.5.540rus>
- Колесников ЛЕ, Попова ЭВ, Новикова ИИ, Колесникова ЮР и др. (2022) Применение хитозана в защите пшеницы от болезней и повышении урожайности. *Прикладная биохимия и микробиология* 58(3):1–8 <https://doi.org/10.31857/S0555109922030072>
- Куликов СН, Тюрин ЮА, Фассахов РС, Варламов ВП (2009) Антибактериальная и антимикотическая активность хитозана: механизмы действия и роль структуры. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии* 5:91–97
- Луньков АП, Ильина АВ, Варламов ВП (2018) Антиоксидантные, антибактериальные и фунгицидные свойства пленок на основе хитозана (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология* 54(5):444–454
- Максимов ИВ, Веселова СВ, Нужная ТВ, Сарварова ЕР и др. (2015) Стимулирующие рост растений бактерии в регуляции устойчивости растений к стрессовым факторам. *Физиология растений* 62(6):763–775 <http://doi.org/10.7868/s0015330315060111>
- Максимов ИВ, Хайруллин РМ (2019) Фитоиммунитет и микробиом растений. *Аграрная наука* 2:40–44 <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2019-326-2-40-44>
- Максимов ИВ, Сингх БП, Черепанова ЕА, Бурханова ГФ и др (2020) Перспективы применения бактерий – продуцентов липопептидов для защиты растений (обзор) *Прикладная биохимия и микробиология* 56(1):19–34 <https://doi.org/10.31857/S0555109920010134>
- Михайлова ЛА, Мироненко НВ, Коваленко НМ (2012) Желтая пятнистость пшеницы. Методические указания по изучению популяций возбудителя желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis* и устойчивости сортов. СПб: ВИЗР. 56 с.
- Новикова ИИ, Бойкова ИВ, Павлюшин ВА, Зейрук ВН и др. (2013) Перспективы использования биопрепаратов на основе микробов-антагонистов для защиты картофеля от болезней при хранении. *Вестник защиты растений* 4:12–21
- Новикова ИИ, Попова ЭВ, Краснобаева ИЛ, Коваленко НМ (2021) Биологическое обоснование использования индукторов устойчивости на основе хитозана для повышения эффективности биофунгицидов. *Сельскохозяйственная биология* 56(3):511–522 <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.3.511rus>
- Павлюшин ВА, Новикова ИИ, Бойкова ИВ (2020) Микробиологическая защита растений в технологиях фитосанитарной оптимизации агроэкосистем: теория и

- практика. *Сельскохозяйственная биология* 55(3):421–438 <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2020.3.421rus>
- Попова ЭВ, Коваленко НМ, Сокорнова СВ, Домнина НС и др. (2017) Влияние салициловой кислоты и ванилина на устойчивость пшеницы к возбудителю темно-бурой пятнистости *Cochliobolus sativus*. *Микология и фитопатология* 51(3):178–182
- Попова ЭВ, Коваленко НМ, Сокорнова СВ, Тютюрев СЛ и др. (2018) Влияние гибридных производных хитозана на устойчивость пшеницы к патогенам с разной стратегией питания. *Прикл. биохимия и микробиология* 54(5):540–545 <https://doi.org/10.1134/S055510991805015X>
- Попова ЭВ, Домнина НС, Сокорнова СВ, Коваленко НМ и др. (2021) Инновационные гибридные иммуномодуляторы растений на основе хитозана и биоактивных антиоксидантов и прооксидантов. *Сельскохозяйственная биология* 56(1):158–170 <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2021.1.158rus>
- Сидорова ТМ, Асатурова АМ, Хомяк АИ (2018) Биологически активные метаболиты *Bacillus subtilis* и их роль в контроле фитопатогенных микроорганизмов (обзор). *Сельскохозяйственная биология* 53(1):29–37 <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2018.1.29rus>
- Тютюрев СЛ (2014) Природные и синтетические индукторы устойчивости растений к болезням. СПб: ВИЗР. 212 с.
- Черепанова ЕА, Благова ДК, Бурханова ГФ, Сарварова ЕС и др. (2019) Сурфактин *Bacillus subtilis* 26Д в защите пшеницы от фитопатогенного гриба *Stagonospora nodorum* (Berk.) *Экобиотех* 2(3):339–346 <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-339-346>
- Шафикова ТН, Омеличкина ЮВ (2015) Молекулярно-генетические аспекты иммунитета растений к фитопатогенным бактериям и грибам. *Физиология растений* 62(5):611–627 <https://doi.org/10.7868/S0015330315050140>
- Шенин ЮД, Новикова ИИ, Кругликова ЛФ, Калько ГВ (1995) Характеристика Алирина Б, основного компонента фунгицидного препарата, продуцируемого штаммом *Bacillus subtilis*-10-ВИЗР. *Антибиотики и химиотерапия* 40(5):3–7
- Abdallah RAB, Stedel C, Garagounis C, Nefzi A, Jabnoun-Khiareddine H et al. (2017) Involment of lipopeptide antibiotics and chitinase genes and induction of host defense in suppression of *Fusarium* wilt by endophytic *Bacillus* spp. in tomato. *Crop Protection* 99:45–58 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.008>
- Chen M, Wang J, Liu B, Zhu Y, Xiao R et al. (2020) Biocontrol of tomato bacterial wilt by the new strain *Bacillus velezensis* FJAT-46737 and its lipopeptides. *BMC Microbiol* 20(1):160 <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01851-2>
- Akhtar S, Sultana A, Shupta SA, Chakrabortyand S, Khokon MAR (2020) Evaluation of foliar spraying of bacillus subtilis and achromobacter xylosoxidans for management of bacterial leaf blight (blb) of rice under field condition. *Bangladesh J Plant Pathol* 36(1–2):39–48
- Akram W, AnjumT, Ali B (2015) Searching ISR determinant/s from *Bacillus subtilis* IAGS174 against *Fusarium* wilt of tomato. *BioControl* 60(2):271–280 <https://doi.org/10.1007/s10526-014-9636-1>
- Alkooranee JT, Aledan TR, Ali AK, Lu G, Zhang X et al. (2017) Detecting the hormonal pathways in oilseed rape behind induced systemic resistance by *Trichoderma harzianum* TH12 to *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLoS ONE* 12(1):e0168850 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168850>
- Alkooranee JT, Kadhum NN (2019) Induce systemic resistance in cucumber by some bio-elicitors against alternaria leaf blight disease caused by *Alternaria cucumerina* fungus. *Plant Archives* 19(1):747–755
- Azmina N, Malik A, Kumar LS, Nadarajah K (2020) Elicitor and receptor molecules: orchestrators of plant defense and immunity. *Int J Mol Sci* 21(3): 963 <https://doi.org/10.3390/ijms21030963>
- Badawy MEI, Rabea EI (2011) A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *Int J Carbohydr Chem* 2011: 1–29 article ID 460381 <https://doi.org/10.1155/2011/460381>
- Benhamou N (2004) Potential of the mycoparasite, verticillium lecanii, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mold: a comparison with the effect of chitosan. *Phytopathology* 94(7):693–705. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.7.693>
- Cawoy H, Debols D, Franzill L, De Pauw E (2015) Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnol* 8(2):281–295. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12238>
- Chakraborty T, Akhtar N (2021) Biofertilizers: Prospects and challenges for future. In: Ahamed M, Boddula R, Rezakazemi M (eds.) *Biofertilizers Biofertilizers: Study and Impact* Scrivener Publishing LLC 575–590. <https://doi.org/10.1002/9781119724995.ch20>
- Chowdhury SP, Hartmann A, Gao XW, Borriss R (2015) Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Front Microbiol* 6:780 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>
- De los Santos-Villalobos S, Parra-Cota FI (2020) Current trends in plant growth-promoting microorganisms research for sustainable food security. *Cur Res Microbial Sci* 2:100016 <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2020.100016>
- De los Santos-Villalobos S, Díaz-Rodríguez AM, Ávila-Mascareño MF, Martínez-Vidales AD, Parra-Cota FI (2021) COLMENA: a culture collection of native microorganisms for harnessing the agro-biotechnological potential in soils and contributing to food security. *Diversity* 13:337 <https://doi.org/10.3390/d13080337>
- Dimopoulou A, Theologidis I, Liebmann B, Kalantidis K, Vassilakos N et al. (2019) *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 differentially induces tomato defense signaling pathways depending on plant part and dose of application. *Sci Rep* 9(1):191–200 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55645-2>
- Deepmala K, Hemantaranjan A, Bharti S, Bhanu AN (2014) A future perspective in crop protection: chitosan and its oligosaccharides. *Adv Plants Agriculture Res* 1(1):23–30 <https://doi.org/10.15406/apar.2014.01.00006>
- Duan Y, Chen R, Zhang R, Jiang W, Chen X et al. (2021) Isolation, identification, and antibacterial mechanisms of bacillus amyloliquefaciens QSB-6 and its effect on plant roots. *Front Microbiol* 12:746–799 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.746799>
- Fira D, Dimkić I, Berić T, Lozo J, Stanković S (2018) Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J Biotechnol* 285:44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>

- Gao X, Gong Y, Huo Y, Han Q, Kang Z, Huang L. (2015) Endophytic *Bacillus subtilis* strain e1r-j is a promising biocontrol agent for wheat powdery mildew. *J Biomed Biotechnol* 6: 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/462645>
- Ghazy N, El-Nahrawy S (2021) Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. *Arch Microbiol* 203:1195–1209. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02113-5>
- Gond S, Bergen M, Torres M, White JF (2015) Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiol Res* 172:79–87. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.11.004>
- Hui Li, Jie Zhao, Hao Feng, Lili Huang (2013) Biological control of wheat stripe rust by an endophytic *Bacillus subtilis* strain E1R-j in greenhouse and field trials. *Crop Prot* 43:201–206. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.09.008>
- Hyakumachi M, Nishimura M, Arakawa T, Asano S, Yoshida S et al. (2013) *Bacillus thuringiensis* suppresses bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* with systemic induction of defense-related gene expression in tomato. *Microbes and environments* 28(1):128–134 <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12162>
- Jiao X, Takishita Y, Zhou G, Smith DL (2021) *Plant associated rhizobacteria* for biocontrol and plant growth enhancement. *Front Plant Sci* 12:1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.634796>
- Kriuchkova LO (2017) Biological control of leaf disease of barley with *Bacillus* strain. *Biologija* 63(3):289–295. <https://doi.org/10.6001/biologija.v63i3.3584>
- Kumar S, Diksha, Sindhu SS; Kumar R (2022) Biofertilizers: An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability. *Curr Res Microbial Sci* 3:1–26. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100094>
- Lastochkina O, Seifikalhor M, Aliniaiefard S, Baymiev A, Pusenkova L et al. (2019) *Bacillus* spp.: efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plants* 8(4):97 <https://doi.org/10.3390/plants8040097>
- Llorens E, García-Agustín P, Lapeña L (2017) Advances in induced resistance by natural compounds: towards new options for woody crop protection. *Sci Agric* 74(1):90–100. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2016-0012>
- Maksimov IV, Abizgildina PP, Sorokan AV, Burkhanova GF (2014) Regulation of peroxidase activity under the influence of signaling molecules and *Bacillus subtilis* 26d in potato plants infected with *Phytophthora infestans*. *Appl Biochem Microbiol* 50(2):173–178. <https://doi.org/10.7868/S0555109914020135>
- Masmoudi F, Khedher SB, Kamoun A, Zouari N, Tounsi S et al. (2017) Combinatorial effect of mutagenesis and medium component optimization on *Bacillus amyloliquefaciens* antifungal activity and efficacy in eradicating *Botrytis cinerea*. *Microbiol Res* 197:29–38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.01.001>
- Novikova II, Shenin YD (2011) Isolation, identification, and antifungal activity of a Gamair complex formed by *Bacillus subtilis* M-22, a producer of a biopreparation for plant protection from mycoses and bacterioses *Appl Biochem Microbiol* 47(9):817–826. <https://doi.org/10.1134/S0003683811090031>
- Novikova II, Titova YuA, Boykova IV, Zeyruk VN, Krasnobaeva IL et al. (2017) Biological justification for the optimization of preparative forms of biological preparations based on antagonist microbes to control populations of phytopathogenic fungi and bacteria – causative agents of plant diseases. *Plant Protection News* 3:16–23
- Park K, Park Y-S, Ahamed J, Dutta S, Ryu H et al. (2016) Elicitation of induced systemic resistance of chili pepper by iturin A analogs derived from *Bacillus vallismortis* EXTN-1 *Can J Plant Sci* 96(4):564–570. <https://doi.org/10.1139/cjps-2015-0199>
- Pathak E, Sanjyal A, Regmi CR, Paudel S, Shrestha A (2021) Screening of potential plant growth promoting properties of *Bacillus* species isolated from different regions of Nepal. *Nepal J Biotechnol* 9: 79–84. <https://doi.org/10.3126/njb.v9i1.38672>
- Pieterse C, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, van Wees S et al. (2014) Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu Rev Phytopathol* 52:347–375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Rais A, Jabeen Z, Shair F, Hafeez FY, Hassan MN (2017) *Bacillus* spp., a bio-control agent enhances the activity of antioxidant defense enzymes in rice against *Pyricularia oryzae*. *PLoS ONE* 12(11): e0187412. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187412>
- Reis J, Yi H, Liang GH, Muthukrishnan S, Velazhahan R (2004) Foliar application of *Bacillus subtilis* AUBS1 reduces sheath blight and triggers defense mechanisms in rice. *J Plant Dis Prot* 111(2):115–125
- Reiss A., Jorgensen L.N. (2017) Biological control of yellow rust of wheat (*Puccinia striiformis*) with Serenade®ASO (*Bacillus subtilis* strain QST713). *Crop Prot* 93:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.009>
- San-Lang W, Tzu-Yin L, Yue-Hong Y, Hui-Fen L, Yu-Jen C (2006) Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydr Res* 341(15):2507–2515. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.06.027>
- Santoyo G, Orozco-Mosqueda MC, Govindappa M (2012) Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontr Sci Technol* 22:855–872. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>
- Sasirekha B, Srividya S (2016) Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in Chillii. *Agric Nat Resour* 50:250–256. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2016.02.003>
- Shrawat A, Sindhu SS (2019) Potential of biocontrol agents in plants disease control for improving food safety. *Def Life Sci J* 4:220–225. <https://doi.org/10.14429/dlsj.4.14966>
- Sendi Y, Pfeiffer T, Koch E, Mhadhbi H, Mrabet M (2020) Potential of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) root micro-biome in the biocontrol of root rot disease and traits of performance. *J Plant Dis Prot* 127:453–462. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00338-6>
- Shrawat A, Sindhu SS, Glick BR (2022) Hydrogen cyanide production by soil bacteria: Biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. *Pedosphere* 32:15–38. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60058-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60058-9)

- Singh A, Chauhan PS (2017) Ecological significance of soil-associated plant growth-promoting biofilm-forming microbes for stress management. In: Ahmad I., Husain FM (eds) *Biofilms in Plant and Soil Health* (Chapter 16). John Wiley & Sons Ltd. 291–326. <https://doi.org/10.1002/9781119246329.ch16>
- Shen Y, Li J, Xiang J, Wang J, Yin K et al (2019) Isolation and identification of a novel protein elicitor from a *Bacillus subtilis* strain BU412. *AMB Expr* 9(1):117. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0822-5>
- Smith JM, Heese A (2014) Rapid bioassay to measure early reactive oxygen species production in Arabidopsis leaf tissue in response to living *Pseudomonas syringae*. *Plant Methods* 10(1):6 <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-6>
- Syed AB, Rahman SF, Singh E, Pieterse CM, Schenk PM (2018) Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Sci* 267:102–111. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>
- Torres MJ, Brandan C, Petroselli G, Erra-Balsells R, Audisio M (2016) Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiol Res* 182:31–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.09.005>
- Toyota M, Spencer D, Sawai-Toyota S, Jiaqi W, Zhang T (2018) Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science* 361:1112–1115. <https://doi.org/10.1126/science.aat7744>
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol* 47:177–206. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
- Vlot A C, Sales J H, Lenk M, Bauer K, Brambilla A et al. (2020) Systemic propagation of immunity in plants. *New Phytologist* 229(3):1234–1250. <https://doi.org/10.1111/nph.16953>
- Wang XQ, Zhao DL, Shen LL, Jing CL et al (2018) Application and mechanisms of *Bacillus subtilis* in biological control of plant disease. In: Meena VS (ed) *Role of rhizospheric microbes in soil*. Springer Singapore. 225–250. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-8402-7-9>
- Wang Y, Liu H, Shen Z, Miao Y, Wang J et al. (2022) Richness and antagonistic effects co-affect plant growth promotion by synthetic microbial consortia. *Appl Soil Ecol* 170(104300):1–5. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104300>
- Yang L, Quan X, Xue B, Goodwin PH, Lu S et al. (2015) Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Biol Control* 85:52–58. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.12.010>
- Yin H, Li Y, Zhang HY, Wang WX, Lu H et al (2013) Chitosan oligosaccharides – triggered innate immunity contributes to oilseed rape resistance against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Int J Plant Sci* 174(4):722–732. <https://doi.org/10.1086/669721>
- Yu C, Fan L, Gao J, Wang M, Wu Q et al. (2015) The platelet activating factor acetyl hydrolase gene derived from *Trichoderma harzianum* induces maize resistance to *Curvularia lunata* through the jasmonic acid signaling pathway. *J Environ Sci Health* 50(10):708–17. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1048104>
- Zehra A, Raytekar NA, Meena M, Swapnil P (2021) Efficiency of microbial bio-agents as elicitors in plant defense mechanism under biotic stress: A review. *Cur Res Microb Sci* 2:1–14. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100054>
- Zhang JX, Xue AG (2010) Biocontrol of sclerotinia stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of soybean using novel *Bacillus subtilis* strain SB24 under control conditions. *Plant Pathol* 59(2):382–391. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02227.x>
- Zhi Y, Wu Q, Xu Y (2017) Production of surfactin from waste distillers' grains by co- culture fermentation of two *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *Bioresource Technol* 235:96–103. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.090>

Translation of Russian References

- Andreeva EI, ed (1990) [Guidelines for testing chemicals for fungicidal activity]. Cherkassy: NIITEKHIM 67p. (In Russian)
- Cherepanova EA, Blagova DK, Burkhanova GF, Sarvarova ES et al. (2019) [Surfactin *Bacillus subtilis* 26D in wheat protection from the phytopathogenic fungus *Stagonospora nodorum* (Berk.)]. *Ekobiotekh* 2(3):339–346. <https://doi.org/10.31163/2618-964X-2019-2-3-339-346> (In Russian)
- Kabashnikova LF (2020) [Priming of protective reactions in plants during pathogenesis: acquired immunity]. *Journal of the Belarusian State University. Ecology* 4:19–29. <https://doi.org/10.46646/2521-683X/2020-4-19-29> (In Russian)
- Karpun N N, Yanushevskaya EB, Mikhailova EV (2015) [Mechanisms of formation of nonspecific induced immunity in plants under biogenic stress (review)]. *Agricultural biology* 50(50):540–549. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2015.5.540rus> (In Russian)
- Kolesnikov LE, Popova E V, Novikova I, Kolesnikova JUR et al (2022) [The use of chitosan in protecting wheat from diseases and increasing yields]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 58(3):1–8 <https://doi.org/10.31857/S0555109922030072> (In Russian)
- Lunkov AP, Il'ina AV, Varlamov VP (2018) [Antioxidant, antibacterial and fungicidal properties of chitosan-based films (review)]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 54(5):444–454 (In Russian)
- Maksimov IV, Veselova SV, Nuzhny TV, Sarvarova EP et al (2015) [Stimulating plant growth bacteria in the regulation of plant resistance to stress factors]. *Fiziologiya rasteniy* 62(6):763–775 (In Russian)
- Maximov IV, Singh BP, Cherepanova EA, Burkhanova GF et al. (2020) [Prospects for the use of lipopeptide-producing bacteria for plant protection (review)] *Prikl Biokhim Mikrobiol* 56(1):19–34. <https://doi.org/10.31857/S0555109920010134> (In Russian)
- Mikhailova LA, Mironenko NV, Kovalenko NM (2012) [Yellow spot of wheat. Guidelines for the study of populations of the yellow spotted pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* and the resistance of varieties]. St. Petersburg: VIZR. 56 p. (In Russian)
- Novikova I, Popova E V, Krasnobaeva IL, Kovalenko NM (2021) [Biological justification of the use of chitosan-based resistance inducers to increase the effectiveness of biofungicides]. *Agricultural Biology* 56(3):511–522. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2021.3.511rus> (In Russian)

- Novikova II, Boykova IV, Pavlyushin VA, Zeyruk VN et al (2013) [Prospects for the use of biological products based on antagonist microbes to protect potatoes from diseases during storage]. *Plant Protection News* 4:12–21 (In Russian)
- Pavlyushin V, Novikova I, Boikova I (2020) [Microbiological plant protection in technologies of phytosanitary optimization of agroecosystems: theory and practice]. *Agricultural Biology* 55(3):421–438. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2020.3.421rus> (In Russian)
- Popova EV, Domnina NS, Sokornova SV, Kovalenko NM et al (2021) [Innovative hybrid plant immunomodulators based on chitosan and bioactive antioxidants and prooxidants]. *Agricultural Biology* 56(1):158–170. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2021.1.158rus> (In Russian)
- Popova EV, Kovalenko NM, Sokornova SV, Domnina NS et al. (2017) [The effect of salicylic acid and vanillin on wheat resistance to the causative agent of dark brown spotting *Cochliobolus sativus*]. *Mikol Fitopatol* 51(3):178–182 (In Russian)
- Popova EV, Kovalenko NM, Sokornova SV, Tyuterev SL et al (2018) [The effect of hybrid chitosan derivatives on wheat resistance to pathogens with different nutrition strategies]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 54(5):540–545. <https://doi.org/10.1134/S055510991805015X> (In Russian)
- Shafikova TN, Omelichkina YuV (2015) [Molecular genetic aspects of plant immunity to phytopathogenic bacteria and fungi]. *Russian Journal of Plant Physiology* 62(5):611–627 <https://doi.org/10.7868/S0015330315050140> (In Russian)
- Shenin YuD, Novikova II, Kruglikova LF, Kalko GV (1995) [Characteristics of Alirin B, the main component of a fungicide produced by the *Bacillus subtilis* strain 10-VIZR]. *Antibiotiki i khimioterapiya* 40(5):3–7 (In Russian)
- Sidorova TM, Asaturova AM, Homyak AI (2018) [Biologically active metabolites of *Bacillus subtilis* and their role in the control of phytopathogenic microorganisms (review)]. *Agricultural Biology* 53(1):29–37. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.1.29rus> (In Russian)
- Tyuterev SL (2014) [Natural and synthetic inducers of plant disease resistance]. St. Petersburg: VIZR 212 p. (In Russian)
- Varlamov VP, Nemtsev SV, Tikhonov VE (2010) [Chitin and chitosan: nature, preparation and application]. Moscow. 292 p. (In Russian)
- Vasyukova NI, Ozeretskovskaya OL (2007) [Induced plant resistance and salicylic acid]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 43(4): 405–411 (In Russian)
- Vasyukova NI, Ozeretskovskaya OL, Chalenko GI, Gerasimova NG et al. (2010) [Immunomodulatory activity of chitosan derivatives with salicylic acid and its fragments]. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 46(3):379–384 (In Russian)

Plant Protection News, 2022, 105(3), p. 122–134

OECD+WoS: 4.01+AM (Agronomy)

<https://doi.org/10.31993/2308-6459-2022-105-3-15320>

Full-text article

THE FACTORS INCREASING THE INDUCING ACTIVITY OF TWO *BACILLUS. SUBTILIS* STRAINS IN THE PROTECTION OF WHEAT AGAINST PATHOGENS OF SPOT BLOTCH *BIPOLARIS SOROKINIANA* AND LEAF RUST *PUCCINIA TRITICINA*

I.I. Novikova, E.V. Popova, N.M. Kovalenko*, I.L. Krasnobaeva

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

*corresponding author; e-mail: nadyakov@mail.ru

The purpose of this work was to evaluate the contribution of the culture liquid of *Bacillus subtilis* strains VKM B-2604D and VKM B-2605D and its components (cell-free supernatant and bacterial cell suspension) to the formation of induced resistance to spot blotch and leaf rust in wheat plants, as well as to establish the optimal cell concentration and application time which determine the effectiveness of the laboratory samples containing 0.1 % chitosan salicylate (CS). It is assumed that the culture liquid and its supernatant contain biologically active metabolites possessing elicitor activity and responsible for the manifestation of induced wheat resistance to spot blotch and leaf rust. Treatment of wheat leaves with culture liquid and supernatant reduced the *B. sorokiniana* infection level by 1.5–2 times, and *P. tritricina* by 20% and 10%, respectively, as compared to the control. Meanwhile, the suspension of bacterial cells did not suppress the development of the disease symptoms. It has been experimentally shown that all culture liquid samples tested showed the greatest inducing effect at the concentration of 10⁹ CFU/ml. It was found that among the application timing variants (1 and 2 days before and 1 and 2 days after the inoculation), pre-treatment of wheat plants one day before the pathogen inoculation was the most effective, significantly reducing the disease development. As a result, the area of leaf damage by the spot blotch and the leaf rust was decreased 6- and 10-fold, respectively, as compared to the control.

Keywords: microbial control, laboratory sample, Vitaplan, cultural liquid, fungistatic activity, induced resistance, chitosan salicylate

Submitted: 29.04.2022

Accepted: 13.09.2022

PLENODOMUS SPECIES INFECTING OILSEED RAPE IN RUSSIA**M.M. Gomzhina*, E.L. Gasich***All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia*

*corresponding author, e-mail: gomzhina91@mail.ru

The Phoma disease (Phoma stem canker, black leg, Phoma leaf spot) is one of the most harmful diseases of oilseed rape and other *Brassicaceae* in the world, particularly in Russia. The causal agents of this disease are *Plenodomus biglobosus* and *Plenodomus lingam*. Since 2005, a number of subclades have been described within *P. biglobosus* and *P. lingam* (2 and 7, respectively). These subclades can be identified by multilocus sequence analysis. So far, biodiversity and geographic distribution of *Plenodomus* spp. infecting oilseed rape in Russia, have not been comprehensively analyzed. For this study, as many as 18 *Plenodomus* spp. isolates were obtained from the samples of stem canker and leaf spot of oilseed rape from four regions of Russia in 2004–2021. The aims of this study were to identify the isolates by phylogenetic analyses inferred from 3 gene sequences: nuclear ribosomal internal transcribed spacer, actin, and β -tubulin, and to assess pathogenicity of the isolates. The phylogenetic reconstructions revealed two well-supported monophyletic clades corresponding to the two species of the genus *Plenodomus*, *P. lingam* ‘brassicae’ and *P. biglobosus* ‘brassicae’. This paper provides robust phylogeny of the *Plenodomus* spp. clade, accompanied with the detailed description of morphological features of both species, and results of pathogenicity tests.

Keywords: *Brassica*, *Leptosphaeria*, molecular phylogeny, pathogenicity, *Phoma*, Phoma leaf spot, Phoma stem canker

Submitted: 20.07.2022

Accepted: 08.09.2022

The oilseed rape (*Brassica napus* L.) is a valuable food, fodder and industrial crop. The growing demand for high protein feed for farm animals and biodiesel fuel is the reason for the rising interest in this crop. Expanding the areas of the oilseed rape in crop rotation lead to an increase of known and emergence of novel diseases. In Russia, spring oilseed rape is predominantly cultivated, whereas in the North Caucasus and Kaliningrad Province, winter oilseed rape prevails. In recent years, the area occupied by winter oilseed rape has been expanding also in other regions of Russia.

Phoma disease in *Brassicaceae* (Phoma stem canker, black leg, Phoma leaf spot) is one of the most harmful diseases of the oilseed rape in the world (Fitt et al., 2006). The causal agents of this disease are the two closely related *Phoma*-like fungi, *Plenodomus biglobosus* (Shoemaker & H. Brun) Gruyter, Aveskamp & Verkley (syn. *Leptosphaeria biglobosa* Shoemaker & H. Brun) and *P. lingam* (Tode) Höhn. (syn. *Phoma lingam* (Tode) Desm.). They belong to the family of *Leptosphaeriaceae* (Mendes-Pereira et al., 2003; Liu et al., 2014; Zou et al., 2019). *Plenodomus biglobosus* and *P. lingam* can infect *Brassica oleracea* L. cultivated forms (kale, broccoli, brussels sprouts, cauliflower, Chinese cabbage, mustard, oilseed rape, rutabaga, turnip, and white cabbage), *Eutrema japonicum* (Miq.) Koidz., *Raphanus* (radish and daikon), and *Sinapis* (black and white mustard). Several wild *Brassicaceae* (*Descurainia*, *Sisymbrium*, and *Thlaspi*) can also be infected with these fungi (West et al., 2001; Fitt et al., 2006; 2008; Zou et al., 2019; King, West, 2022). *Plenodomus biglobosus* and *P. lingam* differ from each other by micromorphological, cultural, physiological, biochemical and molecular phylogenetic features (Mendes-Pereira et al., 2003; Liu et al., 2014; Frac et al., 2022). It was considered that

P. lingam is more aggressive than *P. biglobosus* and causes higher crop losses (West et al., 2001; Lob et al., 2013; Zou et al., 2019). *Plenodomus lingam* is a fungus of quarantine concern in China (Chen et al., 2010; Zhao et al., 2021).

Phoma-like fungi including the species of the *Leptosphaeriaceae* family display a limited range of morphological features useful for the species identification, and the latter is to be based on multilocus sequencing (de Gruyter et al., 2013). For rapid and accurate identification of *P. biglobosus* and *P. lingam*, PCR with species-specific primers was developed (Xue et al., 1992; Mahuku et al., 1995).

Intraspecific diversity has been described for both of these species. Two subclades have been identified for *P. lingam*, the subclade ‘brassicae’ (widely distributed) and the subclade ‘lepidii’ (the sole isolate IBCN84 derived from *Lepidium*, Canada) (Mendes-Pereira et al., 2003; Voigt et al., 2005). *Plenodomus biglobosus* was characterized by a greater genetic diversity. Seven subclades have been identified for *P. biglobosus* within the subclade ‘brassicae’ occurring mostly in *Brassicaceae* crops (Mendes-Pereira et al., 2003; Zou et al., 2019). The representatives of this subclade was also found in wasabi in the UK (King, West, 2022). In Oregon, USA, the subclade *P. biglobosus* ‘americensis’ was recorded in oilseed rape (Zou et al., 2019). In Australia, Canada, China, Mexico, the UK and the USA, *P. biglobosus* ‘canadensis’ was recorded in the *Brassicaceae* species, such as *E. japonicum* and *Thlaspi arvense* L. (Dilmaghani et al., 2009; 2010; Mendes-Pereira et al., 2003; Van de Wouw et al., 2008; Luo et al., 2021; King, West, 2022). In Australia and the USA, *P. biglobosus* ‘australensis’ was recorded in *B. napus* and *B. juncea* (L.) Czern. (Plummer et al., 1994; Voigt et al., 2005). In Australia, Chile and Georgia, *P. biglobosus* ‘occiaustralensis’ was

recorded in oilseed rape and wild radish (Vincenot et al., 2008; Dilmaghani et al., 2009) and in Canada, *P. biglobosus* ‘*thlaspii*’ and *P. biglobosus* ‘*erysimii*’ were recorded in the wild *Brassicaceae* species, *T. arvense* and *Erysimum* sp., respectively (Mendes-Pereira et al., 2003).

To reconstruct phylogeny and identify subclades within *P. biglobosus* and *P. lingam*, the nucleotide sequences of the regions of internal transcribed rDNA spacers (ITS-locus) and genes coding for actin (*act*) and β -tubulin (*tub*) have been used (Mendes-Pereira et al., 2003; Voigt et al., 2005; Van de Wouw et al., 2008).

In Russia, occurrence of Phoma disease (black leg and leaf spot) has been reported in the North Caucasus and Krasnodar Area (Serdyuk et al., 2011) since 1933. However, this disease was recorded more recently in Russian Far East (Ussuriysk, Amur Province, and Khabarovsk Area), Siberia, Non-Chernozem and Central Chernozem zones (Bilay et al., 1988; Fedotov et al., 2008). Also, All-Russian Research Institute of Oilseed Rape (Lipetsk, Russia), All-Russian Research Institute of Oil Crops named after V.S. Pustovoit (Krasnodar, Russia), and some other scientific institutions assess oilseed rape genotypes for resistance to these diseases (Bochkareva et al., 2006; Bochkareva, Aliferova, 2009; Artamonov, Gorshkov, 2009; Artamonov, 2012; 2014). Even though it has been known

for many years that these diseases of oilseed rape are caused by two *Plenodomus* species, only one of them, namely *Phoma lingam*, is usually mentioned as a causative agent in Russian literature. Moreover, there are only few Russian reports which include species identification of the causative agent of Phoma stem canker (black leg) and Phoma leaf spot.

Plenodomus biglobosus was isolated from winter oilseed rape in the Stavropol Area (Kachlicki et al., 2001), Krasnodar Area, Moscow and Lipetsk Provinces (Dakowska, personal communication, Gasich., 2004), and in spring oilseed rape – in the Lipetsk and Leningrad Provinces (Artamonov, Gorshkov, 2009; Artamonov, 2012). Several *Phoma*-like isolates that failed to produce sirodesmins typical of *P. lingam* were obtained from the seedlings of spring oilseed rape in the Leningrad Province (Kachlicki et al., 2001). When cultured on solid and liquid media, these isolates did not produce yellow-brown pigment, normally synthesized by *P. biglobosus*. Thus, most likely, these isolates belong to other *Phoma*-like species (Jedryczka et al., 2002).

The aim of this study was to unambiguously identify the *Plenodomus* isolates collected from oilseed rape in various locations across Russia according to the species recognition concept currently used for this genus.

Material & Methods

During extensive studies of fungal biodiversity in oilseed rape in Russia and neighboring countries from 1990 to 2021, plants with symptoms of Phoma leaf spot and Phoma stem canker were collected (Fig. 1). Samples of infected plants were deposited in the Mycological Herbarium (LEP) of All-Russian Institute of Plant Protection (VIZR).

To isolate pure cultures of fungus from the plant tissues, fragments of infected material were surface sterilized with 20 ml of 5% NaClO. After surface sterilization, the samples were placed on potato-sucrose agar (PSA) (Samson et al., 2002) containing antibiotics (100 μ g/ml ampicillin, streptomycin, penicillin, HyClone, GE Healthcare Life Science, Austria) and 0.4 μ l/l Triton X-100 (Panreac, Barcelona, Spain). Petri dishes were incubated at 24 °C in the dark and were examined after 7–10 days (Fig. 2). All isolates were stored in plastic microtubes on PSA at 4 °C in VIZR pure culture collection. From this collection, 18 isolates of local geographical origins were selected for study (Table 1). Isolates from various regions of Russia, collected in different years and represent diversity of *Plenodomus* species.

DNA isolation, PCR and sequencing

The mycelia were obtained from the cultures incubated on PSA and macerated with 0.3 mm glass beads in a MM400 mixer mill (Retsch, Haan, Germany). The genomic DNA was extracted according to the standard CTAB and chloroform protocol (Doyle, Doyle, 1990).

The isolates were identified at the species level using PCR with species-specific primer pairs WV17S, WV5.8C and HV17S, HV26C to ITS locus of *P. biglobosus* and *P. lingam* DNA, respectively (Mahuku et al., 1995). Identification of subclades in *P. biglobosus* and *P. lingam* was implemented by sequencing the taxonomic informative DNA loci, such as ITS region, and partial *act* and *tub* genes. The primers ITSF (PN3) and ITSR (PN10) (Mendes-Pereira et al., 2003), ActinF and ActinR (Van de Wouw et al., 2008), and β tubulinF and β

tubulinR (Van de Wouw et al., 2008) were used to amplify the ITS region, and partial *act* and *tub* genes, respectively. The amplification reactions had a total volume of 25 μ l, including dNTPs (200 μ M), forward and reverse primers (0.5 μ M each), *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ L), 10 \times PCR buffer with Mg²⁺ and NH⁴⁺, and 1–10 ng of total genomic DNA. The PCR conditions were: 95 °C for 5 min; followed by 35 cycles of 92 °C for 50 s; 55 °C, 40 s, (HV17S and HV26C), 56 °C (β tubulinF, β tubulinR and ActinF, ActinR), 40 s, 58 °C, 40 s WV17S, WV5.8C and ITSF, ITSR; 72 °C for 75 s; and a final elongation for 5 min at 72 °C.

The PCR amplification products were checked by electrophoresis in 1% agarose gel stained with ethidium bromide. The amplicons were purified according to the standard method (Boyle, Lew, 1995). Single-strand DNA of amplicons was sequenced by Sanger’s method (Sanger et al., 1977) on an ABI Prism 3500 analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer’s instructions. The obtained nucleotide sequences of the ITS region, as well as partial *act* and *tub* genes, were deposited in the GenBank database (Table 1).

Phylogenetic analysis

The sequences were assembled using Vector NTI advance v. 11.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) and aligned with ClustalX 1.8 (Thompson et al., 1997). The alignments were optimized with Molecular Evolutionary Genetics Analysis 10 (MEGA X; Kumar et al., 2018) and concatenated using Sequence Matrix (Vaydia et al., 2011).

The phylogenetic analysis was based on the alignment of concatenated sequences of the ITS region, and partial *act* and *tub* genes. 54 sequences from local isolates obtained in this study and 84 GenBank sequences of all known genetic subclades of *P. biglobosus* (subclades ‘*americensis*’, ‘*australensis*’,

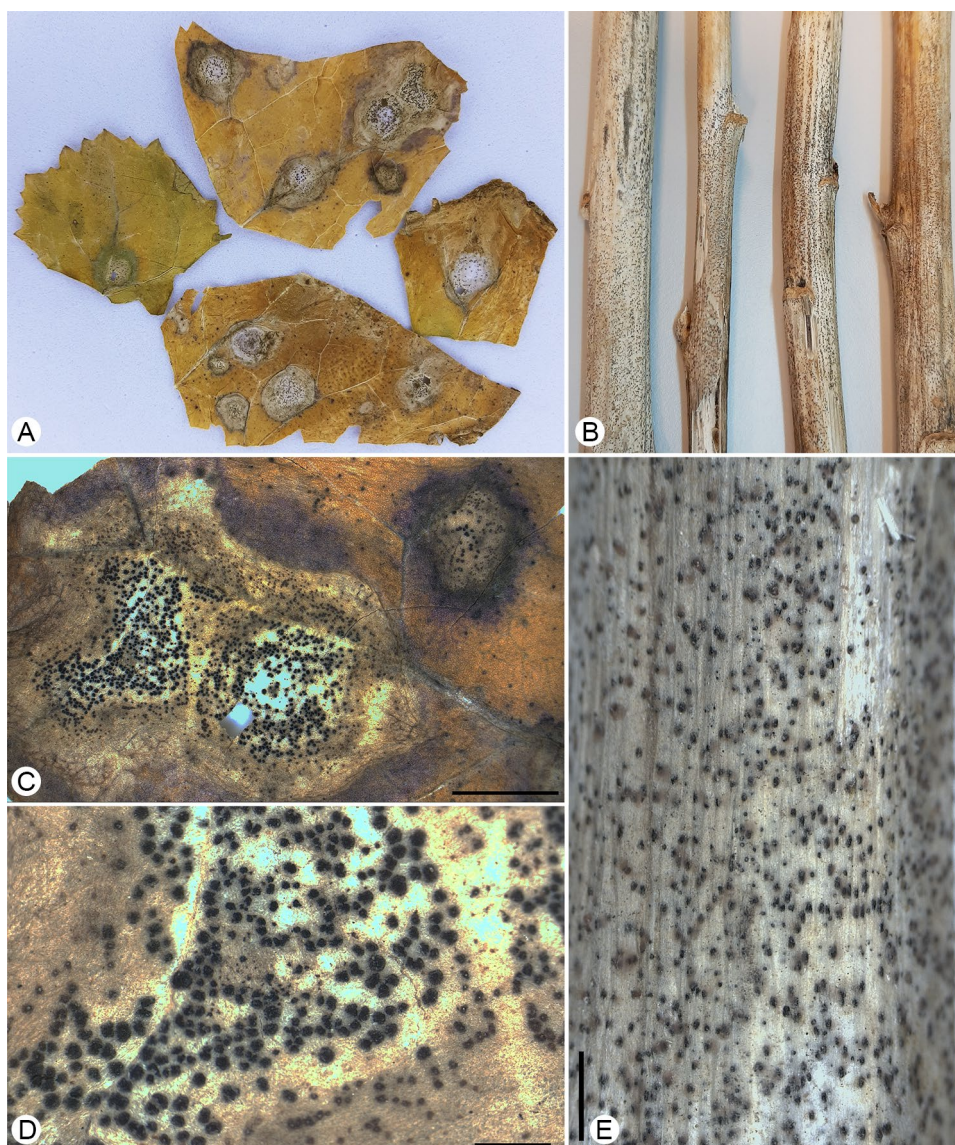


Figure 1. Leaves with symptoms of Phoma leaf spot (A, C, D) from the herbarium specimen LEP 109937. Stems with symptoms of Phoma stem canker (B, E) from the herbarium specimen LEP 92901. Scale bars: C, 5 mm; D, 1 mm; and E, 2 mm

Рисунок 1. Листья (A, C, D), гербарный образец LEP 109937 и стебли (B, E), гербарный образец LEP 92901 рапса с симптомами фомоза. Масштабная линейка: C, 5 мм; D, 1 мм; и E, 2 мм

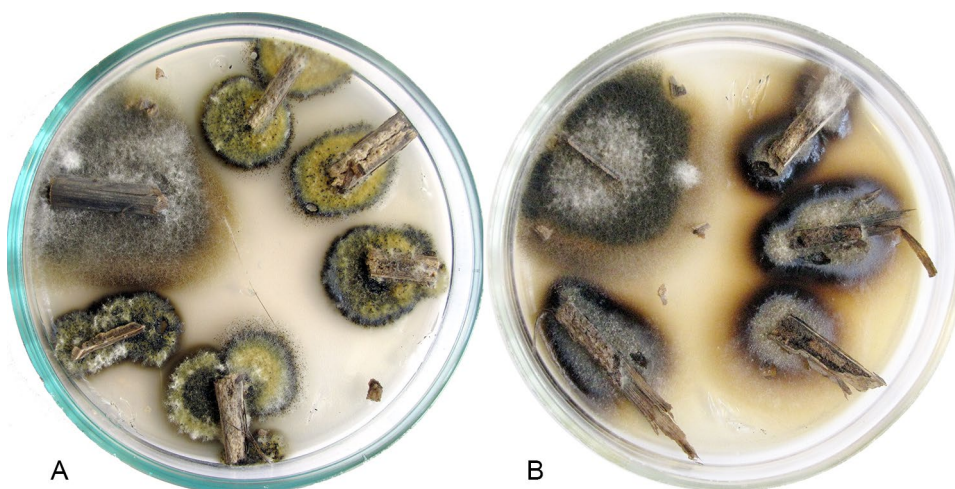


Figure 2. Surface sterilized fragments of stems from the same sample in Petri dishes with PSA after 7 days of incubation.

A. *Plenodomus biglobosus* ‘brassicae’ isolates. B. *Plenodomus lingam* ‘brassicae’ isolates

Рисунок 2. Поверхностно стерилизованные фрагменты стеблей рапса из одного образца, КСА, 7 суток.

A. Изоляты *Plenodomus biglobosus* ‘brassicae’. B. Изоляты *Plenodomus lingam* ‘brassicae’

Table 1. Isolates of *Plenodomus* spp. used in the study

<i>Plenodomus</i>		Isolate	Source, cultivar	Location	Collection year	GenBank accession		
Species	Subclade					ITS	<i>act</i>	<i>tub</i>
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-Br17-022	stems	Kaliningrad Province, Gurievsky district	2017	ON730830	ON734111	ON734131
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-Br17-023	stems	Kaliningrad Province, Gurievsky district	2017	ON730831	ON734112	ON734132
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.67	stems	Republic of Adygea, Podgorniy	2004	ON730832	ON734113	ON734133
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.92	stems	Republic of Adygea, Podgorniy	2004	ON730833	ON734114	ON734134
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.148	stems, Oniks	Krasnodar Area	2004	ON730834	ON734115	ON734135
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.167	stems	Republic of Adygea, Podgorniy	2004	ON730835	ON734116	ON734136
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.265	roots	Kaliningrad Province, Nesterovskiy district	2019	ON730836	ON734117	ON734137
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.268	leaves	Kaliningrad Province	2019	ON730837	ON734118	ON734138
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.276	leaves	Leningrad Province, Volosovskiy district	2021	ON730838	ON734119	ON734139
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.277	leaves	Leningrad Province, Volosovskiy district	2021	ON730839	ON734120	ON734140
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-029	stems	Kaliningrad Province, Gurievsky district	2017	ON730840	ON734121	ON734141
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-031	stems	Kaliningrad Province, Gurievsky district	2017	ON730841	ON734122	ON734142
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-042	leaves	Kaliningrad Province, Mamonovo	2017	ON730842	ON734123	ON734143
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-050	leaves	Kaliningrad Province, Mamonovo	2017	ON730843	ON734124	ON734144
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.266	leaves, Ksenon	Kaliningrad Province, Gurievsky district	2019	ON730844	ON734125	ON734145
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.274	leaves, Mercedes	Leningrad Province, Volosovskiy district	2021	ON730845	ON734126	ON734146
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.275	leaves	Leningrad Province, Volosovskiy district	2021	ON730846	ON734127	ON734147
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.278	leaves	Leningrad Province, Gatchinskiy district	2021	ON730847	ON734128	ON734148

Таблица 1. Исследованные изоляты *Plenodomus* spp.

<i>Plenodomus</i>		Изолят	Орган, сорт	Происхождение	Год сбора	Номер доступа в ГенБанке		
Вид	Субклада					ITS	<i>act</i>	<i>tub</i>
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-Br17-022	стебли	Калининградская обл., Гурьевский р-н.	2017	ON730830	ON734111	ON734131
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-Br17-023	стебли	Калининградская обл., Гурьевский р-н.	2017	ON730831	ON734112	ON734132
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.67	стебли	Адыгея, Подгорный	2004	ON730832	ON734113	ON734133
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.92	стебли	Адыгея, Подгорный	2004	ON730833	ON734114	ON734134
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.148	стебли, Оникс	Краснодарский край	2004	ON730834	ON734115	ON734135
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.167	стебли	Адыгея, Подгорный	2004	ON730835	ON734116	ON734136
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.265	корни	Калининградская обл., Нестеровский р-н.	2019	ON730836	ON734117	ON734137
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.268	листья	Калининградская обл.,	2019	ON730837	ON734118	ON734138
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.276	листья	Ленинградская обл., Волосовский р-н.	2021	ON730838	ON734119	ON734139
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.277	листья	Ленинградская обл., Волосовский р-н.	2021	ON730839	ON734120	ON734140
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-029	стебли	Калининградская обл., Гурьевский р-н.	2017	ON730840	ON734121	ON734141
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-031	стебли	Калининградская обл., Гурьевский р-н.	2017	ON730841	ON734122	ON734142

Продолжение таблицы 1

<i>Plenodomus</i>		Изолят	Орган, сорт	Происхождение	Год сбора	Номер доступа в ГенБанке		
Вид	Субклада					ITS	<i>act</i>	<i>tub</i>
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-042	листья	Калининградская обл., Мамоново	2017	ON730842	ON734123	ON734143
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-050	листья	Калининградская обл., Мамоново	2017	ON730843	ON734124	ON734144
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.266	листья, Ксенон	Калининградская обл., Гурьевский р-н.	2019	ON730844	ON734125	ON734145
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.274	листья, Мерседес	Ленинградская обл., Волосовский р-н.	2021	ON730845	ON734126	ON734146
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.275	листья	Ленинградская обл., Волосовский р-н.	2021	ON730846	ON734127	ON734147
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.278	листья	Ленинградская обл., Гатчинский р-н.	2021	ON730847	ON734128	ON734148

'brassicae', 'canadensis', 'erysimii', 'occiaustralensis' and 'thlaspii' and *P. lingam* (subclades 'brassicae' and 'lepidii') were taken in the analyses. *Leptosphaeria doliolum* (Pers.) Ces. & De Not. was an outgroup (Table 2).

Phylogenetic analysis of single locus and combined aligned data consisted of maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) and Bayesian inference. Both ML and MP analyses were performed with MEGA X. Bayesian inference was performed by MrBayes v. 3.2.1. in ARMADILLO v. 1.1 (Lord et al., 2012) using a Markov chain Monte Carlo (MCMC) sampling method. The general time-reversible model of evolution, including estimation of invariable sites and assuming a gamma distribution with six rate categories

was used for Bayesian inference analyses. Four MCMC chains were run simultaneously, starting from random trees for 1000 generations and sampled every tenth generation for a total of 10000 trees.

Morphology

Morphological features were determined for *P. biglobosus* 'brassicae' isolate MF-Br17-023 and *P. lingam* 'brassicae' isolate MF-Br17-050. Pure cultures of these isolates were incubated on PSA and oatmeal agar (OA) (Boerema et al., 2004). These two media were optimal, particularly for cultivation of *Phoma*-like fungi. Petri dishes were placed for a week in darkness and for another week under 12 h near-ultraviolet light/12 h dark to stimulate sporulation. Colony

Table 2. GenBank accession numbers of the reference *Plenodomus* strains, included in the study

Таблица 2. Номера доступа в ГенБанке референсных штаммов *Plenodomus*, включенных в исследование

<i>Plenodomus</i>		Strain designation	GenBank accession numbers		
Species	Subclade		ITS	<i>act</i>	<i>tub</i>
<i>lingam</i>	'brassicae'	Leroy (IBCN 80)	AJ550883	AY748970	AY749018
<i>lingam</i>	'lepidii'	IBCN 84	AJ550890	AY748972	AY749020
<i>biglobosus</i>	'americensis'	Ph1002	MG321243	MG282088	MG282089
<i>biglobosus</i>	'australiensis'	IBCN 29	AJ550869	AY748952	AY749000
<i>biglobosus</i>	'australiensis'	IBCN 91 (PHW1268)	AJ550870	AY748953	AY749001
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	IBCN 89	AJ550863	AY748949	AY748997
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	IBCN 93	AJ550857	AY748951	AY748999
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	Roth_LbCN 01	KJ574216	KJ574238	KJ574243
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	Roth_LbCN21	KJ574208	KJ574239	KJ574244
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	Roth_LbCN57	KJ574215	KJ574234	KJ574255
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	Roth_LbCN58	KJ574209	KJ574232	KJ574249
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	Roth_LbCN59	KJ574211	KJ574230	KJ574248
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	Roth_LbCN60	KJ574213	KJ574233	KJ574245
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	Roth_LbPL30	KJ574214	KJ574240	KJ574251
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	Roth_LbUK28	KJ574210	KJ574231	KJ574252
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	Roth_LbAT01	KJ574212	KJ574235	KJ574246
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	Roth_LbAT03	KJ574206	KJ574237	KJ574247
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	Roth_LbFR08	KJ574207	KJ574236	KJ574250
<i>biglobosus</i>	'canadensis'	IBCN 63	AJ550868	AY748956	AY749004
<i>biglobosus</i>	'canadensis'	IBCN 82	AJ550866	AY748958	AY749006
<i>biglobosus</i>	'canadensis'	UNITY (IBCN 81)	AJ550867	AY748957	AY749005
<i>biglobosus</i>	'canadensis'	Roth_LbCA02	KJ574220	KJ574225	KJ574253
<i>biglobosus</i>	'canadensis'	Roth_LbCA03	KJ574219	KJ574229	KJ574256
<i>biglobosus</i>	'canadensis'	Roth_LbCA07	KJ574217	KJ574227	KJ574257
<i>biglobosus</i>	'canadensis'	Roth_LbCA08	KJ574218	KJ574228	KJ574254
<i>biglobosus</i>	'erysimii'	IBCN 83	AJ550872	AY748960	AY749008
<i>biglobosus</i>	'thlaspii'	IBCN 65	AJ550891	AY748962	AY749010
<i>biglobosus</i>	'occiaustralensis'	UWA A21-8	AM410082	AM410084	AM410083

diameter was measured after 7 and 14 days, and colony morphology examined after 14 days (Boerema et al., 2004). One thousand conidia for each isolate were observed and measured with Olympus SZX16 stereomicroscope (Olympus, Tokyo, Japan) and an Olympus BX53 microscope. Nomarski differential interference contrast optics was used to examine conidia morphology. Images were captured with a PROKYON camera (Jenoptik, Jena, Germany).

Pathogenicity test

Pathogenicity tests with all studied isolates were performed by inoculating oilseed rape cv. Oredzh 4. Isolates for tests were grown for 4 days in liquid soy media [KH_2PO_4 , 2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g; MgSO_4 , 1 g; glucose, 20 g; soy flour, 10 g; water, 1 l; pH 6]; 50 ml media per 250 ml flask on orbital shakers Innova 44R (Eppendorf, Framingham, MA, USA; 5 cm, 100 rpm, 24 °C). Liquid media were inoculated by placement of a 5-mm block

cut from 14-d-old colonies cultured on PSA. After 4 days of incubation mycelium was separated from the liquid culture, dried with filter paper at room temperature, ground, adjusted with sterile water to suspension with final concentration 100 mg/ml. Four healthy cotyledons 3-week-old seedlings were placed in the Petri dishes for each isolate. On the upper surface of each cotyledon, two wounds were made symmetrically in the central vein. The drops (10 μl) of mycelial suspension were placed on the wounded area with a micropipette (Purwantara et al., 1998, Van de Wouw et al., 2008, Gasich et al., 2015).

The control plants were wounded and inoculated with a drop of sterile water. The plants were assessed for lesion development (diameter of necrosis) 2–3 days after inoculation. Subsequent re-isolation of pathogens from the inoculated stems and their identification were performed to fulfill Koch's postulates.

Results

Phylogenetic analysis

Initial identification based on PCR with species-specific primers determined that eight local isolates were *P. lingam* and 10 were *P. biglobosus*.

The multilocus phylogenetic analysis inferred the intraspecific relationships within all known subclades in *P. biglobosus* and *P. lingam*. The topology of both single-locus phylogenies inferred from ITS and *tub* revealed no conflicts. The analysis of the single gene phylogeny (data not shown) based on *act* sequences revealed that *P. biglobosus* 'americensis' clustered within *P. biglobosus* 'brassicae'

subclade. The individual gene trees (data not shown), as well the combined tree (Fig. 3), demonstrated that the local isolates were grouped in two distinct phylogenetic subclades with high bootstrap support. Parsimony informative characters and the nucleotide models used for analysis are summarized in (Table 3).

Eight isolates were placed in the *P. lingam* 'brassicae' subclade with the representative culture of this species (IBC N 80). This subclade had high statistical support (MLBS 100%, MPBS 100% and BPP 0.81). Nucleotide sequences of *act* and *tub* of all local *P. lingam* isolates were identical to that

Table 3. Alignment properties and nucleotide substitution models used for phylogenetic analyses

Character status summary	Loci			
	ITS	<i>act</i>	<i>tub</i>	Combined loci
Total length	462	394	398	1254
Invariable characters	346	240	77	663
Informative characters (%)	53	42	88	183
Uninformative characters	63	112	233	408
Nucleotide substitution models	K2+G	K2+G	T92	K2+I
Tree length (TL)	149	196	415	774
Consistency index (CI)	0.7865	0.7564	0.8594	0.7735
Homoplasy index (HI)	0.2135	0.2436	0.1406	0.2265
Retention index (RI)	0.9597	0.9456	0.9475	0.9399
Rescaled consistency index (RC)	0.7549	0.7152	0.8143	0.7269

K2, Kimura 2-parameter; T92, Tamura 3-parameter.

Таблица 3. Данные об общей длине матриц для каждого изолята, длине каждого локуса в отдельности, числе переменных сайтов и оптимальных моделях нуклеотидных замен, использованных для филогенетического анализа

Параметр	Локус ДНК			
	ITS	<i>act</i>	<i>tub</i>	ITS+ <i>act</i> + <i>tub</i>
Общая длина	462	394	398	1254
Невариабельные значения	346	240	77	663
Информативные значения (%)	53	42	88	183
Неинформативные значения	63	112	233	408
Оптимальная модель нуклеотидных замен	K2+G	K2+G	T92	K2+I
Длина МР дерева	149	196	415	774
Индекс согласованности	0.7865	0.7564	0.8594	0.7735
Индекс гомоплазии	0.2135	0.2436	0.1406	0.2265
Индекс удержания	0.9597	0.9456	0.9475	0.9399
Перемасштабированный индекс согласованности	0.7549	0.7152	0.8143	0.7269

K2, Kimura 2-parameter; T92, Tamura 3-parameter.

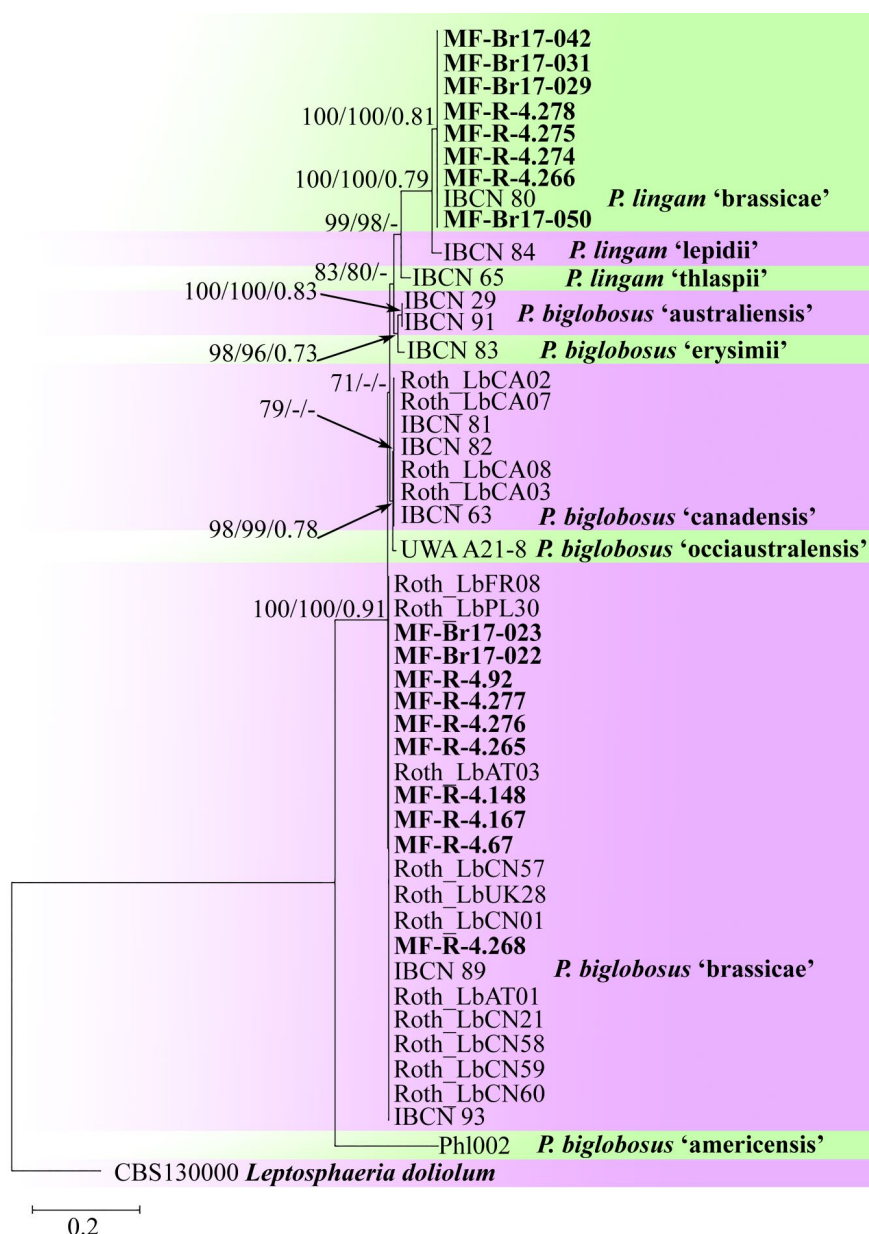


Figure 3. Phylogenetic tree of *Plenodomus* spp. inferred from a maximum likelihood analysis based on a concatenated alignment of ITS region, and partial *act* and *tub*. The maximum likelihood bootstrap support values (MLBS $\geq 70\%$), maximum parsimony bootstrap support values (MPBS $\geq 70\%$), and Bayesian posterior probabilities (BPP ≥ 0.70) are given at the nodes (MLBS/MPBS/BPP). Studied isolates given in bold

Рисунок 3. Комбинированное филогенетическое древо видов и субклад *Plenodomus*, построенное методом ML, основанное на нуклеотидных последовательностях ITS, *act* и *tub*. Числовые значения бутстреп-поддержки, полученные методами ML (≥ 70), MP (≥ 70) и Байесовский статистики (≥ 0.7), приведены в узлах ветвей дендрограммы, соответственно. Номера исследованных изолятов выделены полужирным

of reference strain *P. lingam* 'brassicae' IBCN 80. Nucleotide sequences of ITS of local isolates were identical but differed from the reference by transversion (A instead of C) in the position 135.

Ten isolates were placed in the *P. biglobosus* 'brassicae' subclade with the representative culture of this species (IBCN 89). This subclade had high statistical support (MLBS 100%, MPBS 100% and BPP 0.91). Nucleotide sequences of ITS and *act* of all local *P. biglobosus* isolates were identical to those of the reference *P. biglobosus* 'brassicae' IBCN 89. Nucleotide sequences of *tub* of single isolate MF-R-4.268 were identical to IBCN 89. Sequences of other isolates differed from each other and from the reference. Sequences of three isolates,

MF-R-4.67, MF-R-4.148 and MF-R-4.167, differed from the reference by transition (T instead of C) in the position 8. Sequences of six isolates, MF-R-4.92, MF-R-4.265, MF-R-4.276 and MF-R-4.277, were identical with non-representative *P. biglobosus* 'brassicae' strains, Roth_LbPL30 and Roth_FR08, originating from Poland and France, respectively. These six strains differed from the reference by a transversion (G instead of C) in the position 127.

Morphology

Plenodomus biglobosus 'brassicae' (Fig. 4). Colonies on PSA, 35–39 mm in diameter after 7 days (Fig. 4 E, F) and 75–79 mm after 14 days (Fig. 4 M, N). Margin regular,

covered with abundant aerial mycelium gray neutral in the center, then dark gray, and dull gray in the marginal zone, velvety to felty. Abundant pycnidia are composed in concentric rings at the margin of colony. Agar media dark yellow-orange due to pigment production. Reverse deep brown in the center, deep black in the periphery. Colonies on OA, 51–53 mm in diameter after 7 days (Fig. 4 G, H) and 90 mm after 14 days (Fig. 4 O, P). Margin regular, covered with abundant aerial mycelium white aluminum in the center, then signal gray, silver gray in the marginal zone and floccose. Reverse blackish green in the center and natural umber in the periphery. Agar media dark yellow-orange due to pigment production. Conidiomata pycnidial, on PSA and OA formed concentric rings at the edge of colony, on PSA mostly superficial, rare immersed or semi-immersed in agar media, on OA mostly immersed or semi-immersed in agar media, rare superficial (Fig. 4 S, T). Solitary or confluent, globose, (sub)globose, glabrous, often papillate, conidia exuding from the pycnidia in pearl light gray drops (Fig. 4 T, W), 151–548 (average 375 ± 39) \times 128–416 (296 ± 28) μm . Pycnidial wall composed of isodiametric cells, outer layers pigmented. Conidiophores formed from the inner cells of the pycnidial wall, straight or slightly curved, subhyaline, non-septate, $8.6\text{--}12.4$ (9.7 ± 0.6) \times $2.9\text{--}3.5$ (3.1 ± 0.1) μm . Conidia (Fig. 4 X) subcylindrical, occasionally pyriform, straight, biguttulate, hyaline, $3.1\text{--}9$ (4.7 ± 0.1) \times $1.4\text{--}4.4$ (2) μm . Morphological features of conidia in vitro the same as in vivo.

Plenodomus lingam 'brassicae' (Fig. 4). Colonies on PSA, 32–34 mm in diameter after 7 days (Fig. 4 A, B) and 52–54 mm after 14 days (Fig. 4 I, J). Margin regular, slightly covered with aerial mycelium grayish green in the center, then colorhouse metal, and light gray in the marginal zone, floccose. Abundant pycnidia are composed in concentric

rings at the margin of colony. Reverse grayish green in the center, stone gray in the periphery. Colonies on OA, 46–53 mm in diameter after 7 days (Fig. 4 C, D) and 85–87 mm after 14 days (Fig. 4 K, L). Margin irregular, covered with abundant aerial mycelium dark gray olive in the center, then dark greenish yellow, pearly in the marginal zone, floccose, with almost black pycnidial conglomerates. Reverse gray blue in the center, beige-brown in the periphery. No pigmentation of colony observed.

Conidiomata pycnidial, on PSA and OA scattered, on PSA mostly superficial, rare immersed or semi-immersed in agar media, composed in conglomerates on OA mostly immersed or semi-immersed in agar media, rare superficial (Fig. 4 O, R). Solitary or confluent, globose, (sub)globose, glabrous, often papillate, conidia exuding from the pycnidia in mouse gray drops, $120\text{--}355$ (206 ± 23) \times $118\text{--}362$ (209 ± 24) μm . (Fig. 4 R, U) Pycnidial wall composed of isodiametric cells, outer layers pigmented. Conidiophores formed from the inner cells of the pycnidial wall, reduced to conidiogenous cells, hyaline, flaskform, non-septate, $7.3\text{--}10.7$ (8.4 ± 0.7) \times $4.6\text{--}5.7$ (5.2 ± 0.2) μm . Conidia (Fig. 4 V) subcylindrical, cylindrical, straight, biguttulate, hyaline, $3\text{--}5$ (4) \times $1.2\text{--}2.3$ (1.8) μm . Conidia as in vivo.

Pathogenicity

All studied isolates were pathogenic to oilseed rape cv. Oredezh 4 cotyledons to varies degree; the necrosis diameters for *P. biglobosus* 'brassicae' isolates varied from 1.7 to 8.7 mm after 2 days, and 2.3 to 10.7 mm after 3 days. Isolates MF-Br17-023 from the Kaliningrad Province and MF-R-4.167 from the Republic of Adygea showed the highest pathogenicity. The necrosis diameters for *P. lingam* 'brassicae' isolates varied from 0 to 6.4 mm after 2 days and 1.5 to 7.3 mm after 3 days. Isolate MF-Br17-029 from the Kaliningrad Province showed the least pathogenicity (Table 4).

Table 4. Pathogenicity of *Plenodomus* spp. isolates for *Brassica napus*

<i>Plenodomus</i> species	Subclade	Isolate	Diameter of the necrosis, mm	
			two days	three days
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-Br17-022	3.5±0.2	6.1±0.6
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-Br17-023	6.4±0.2	9.3±0.4
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.67	2.2±0.6	5.2±0.9
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.92	3.9±0.5	5.6±0.5
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.148	1.7±0.4	2.3±0.5
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.167	8.7±0.2	10.7±0.3
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.265	4.9±0.4	7.6±0.4
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.268	5.7±0.2	7.8±0.3
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.276	4.5±0.2	6.6±0.3
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.277	2.6±0.2	4.5±0.2
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-029	0	1.5±0.2
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-031	2.0±0.6	4.1±1.0
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-042	1.9±0.3	2.8±0.4
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-050	2.0±0.1	2.0±0.2
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.266	6.4±0.1	7.3±0.1
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.274	3.3±0.4	7.2±0.2
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.275	2.0±0.03	4.6±0.2
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.278	2.1±0.6	3.2±1.0

Таблица 4. Результаты оценки патогенности изолятов *Plenodomus* spp. в отношении рапса

Вид <i>Plenodomus</i>	Субклада	Изолят	Диаметр некроза, мм	
			2 суток	3 суток
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-Br17-022	3.5±0.2	6.1±0.6
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-Br17-023	6.4±0.2	9.3±0.4
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.67	2.2±0.6	5.2±0.9
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.92	3.9±0.5	5.6±0.5
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.148	1.7±0.4	2.3±0.5
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.167	8.7±0.2	10.7±0.3
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.265	4.9±0.4	7.6±0.4
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.268	5.7±0.2	7.8±0.3
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.276	4.5±0.2	6.6±0.3
<i>biglobosus</i>	'brassicae'	MF-R-4.277	2.6±0.2	4.5±0.2
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-029	0	1.5±0.2
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-031	2.0±0.6	4.1±1.0
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-042	1.9±0.3	2.8±0.4
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-Br17-050	2.0±0.1	2.0±0.2
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.266	6.4±0.1	7.3±0.1
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.274	3.3±0.4	7.2±0.2
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.275	2.0±0.03	4.6±0.2
<i>lingam</i>	'brassicae'	MF-R-4.278	2.1±0.6	3.2±1.0

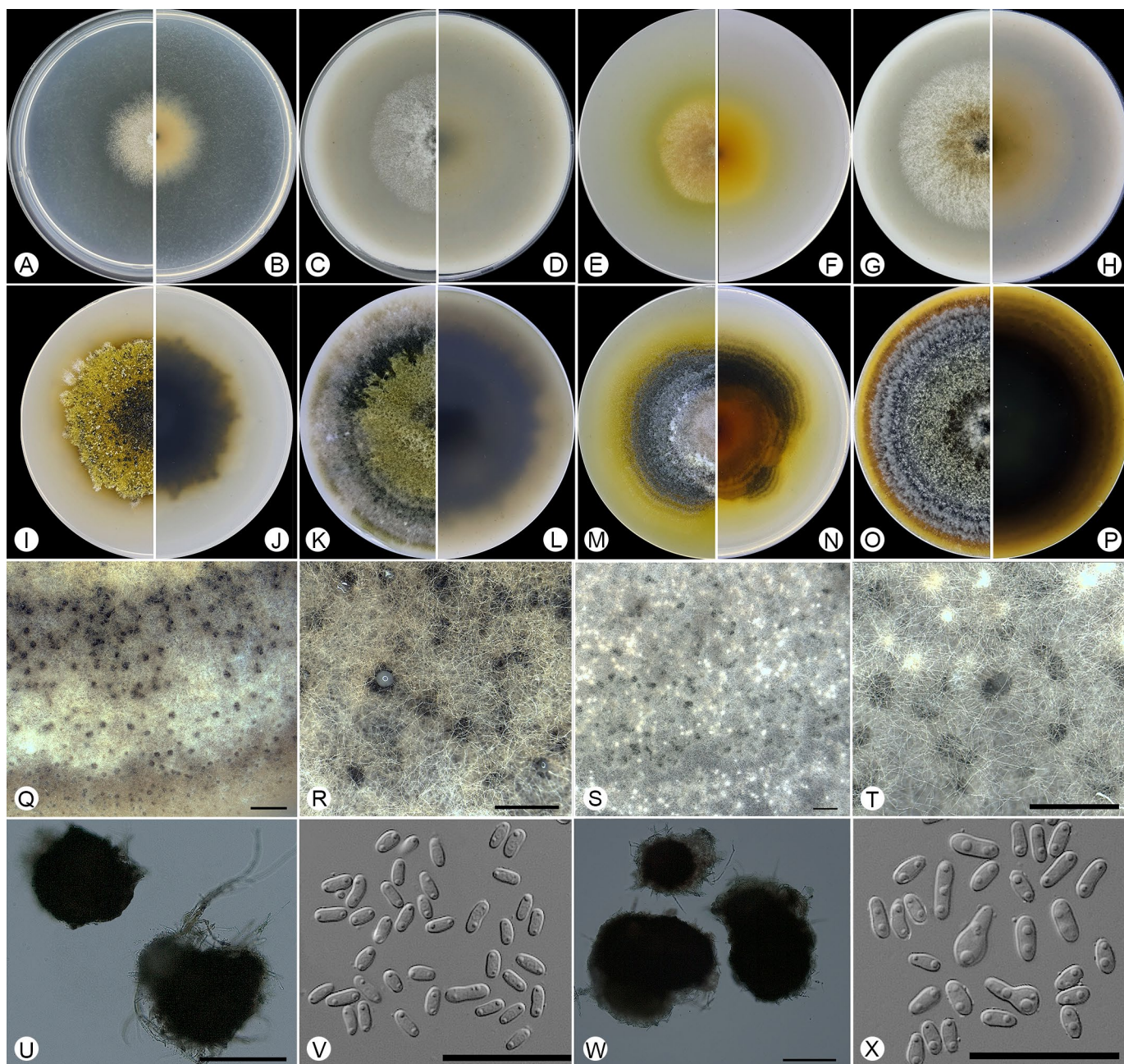


Figure 4. *Plenodomus lingam* ‘brassicae’ (Plb MF-Br17-050) and *Plenodomus biglobosus* ‘brassicae’ (Pbb MF-Br17-023). A. Plb cultures on PSA after 7 d of growth, front. B. Plb cultures on PSA after 7 d of growth, reverse. C. Plb cultures on OA after 7 d of growth, front. D. Plb cultures on OA after 7 d of growth, reverse. E. Pbb cultures on PSA after 7 d of growth, front. F. Pbb cultures on PSA after 7 d of growth, reverse. G. Pbb cultures on OA after 7 d of growth, front. H. Pbb cultures on OA after 7 d of growth, reverse. I. Plb cultures on PSA after 14 d of growth, front. J. Plb cultures on PSA after 14 d of growth, reverse. K. Plb cultures on OA after 14 d of growth, front. L. Plb cultures on OA after 14 d of growth, reverse. M. Pbb cultures on PSA after 14 d of growth, front. N. Pbb cultures on PSA after 14 d of growth, reverse. O. Pbb cultures on OA after 14 d of growth, front. P. Pbb cultures on OA after 14 d of growth, reverse. Q, R, U. Pycnidia of Plb on OA. S, T, W. Pycnidia of Pbb on OA. V. Conidia of Plb on OA. X. Conidia of Pbb on OA. **Scale bars:** Q and S, 2 mm; R and T, 1 mm; U and W, 200 μm ; and V and X, 20 μm .

Рисунок 4. *Plenodomus lingam* ‘brassicae’ (Plb MF-Br17-050) и *Plenodomus biglobosus* ‘brassicae’ (Pbb MF-Br17-023). A. Культура Plb на KCA, 7 суток, верхняя сторона. B. Культура Plb на KCA, 7 суток, реверс. C. Культура Plb на OA, 7 суток, верхняя сторона. D. Культура Plb на OA, 7 суток, реверс. E. Культура Pbb на KCA, 7 суток, верхняя сторона. F. Культура Pbb на KCA, 7 суток, реверс. G. Культура Pbb на OA, 7 суток, верхняя сторона. H. Культура Pbb на OA, 7 суток, реверс. I. Культура Plb на KCA, 14 суток, верхняя сторона. J. Культура Plb на KCA, 14 суток, реверс. K. Культура Plb на OA, 14 суток, верхняя сторона. L. Культура Plb на OA, 14 суток, реверс. M. Культура Pbb на KCA, 14 суток, верхняя сторона. N. Культура Pbb на KCA, 14 суток, реверс. O. Культура Pbb на OA, 14 суток, верхняя сторона. P. Культура Pbb на OA, 14 суток, реверс. Q, R, U. Пикниды Plb на OA. S, T, W. Пикниды Pbb на OA. V. Конидии Plb на OA. X. Конидии Pbb на OA. Масштабная линейка: Q и S, 2 мм; R и T, 1 мм; U и W, 200 μm ; и V и X, 20 μm .

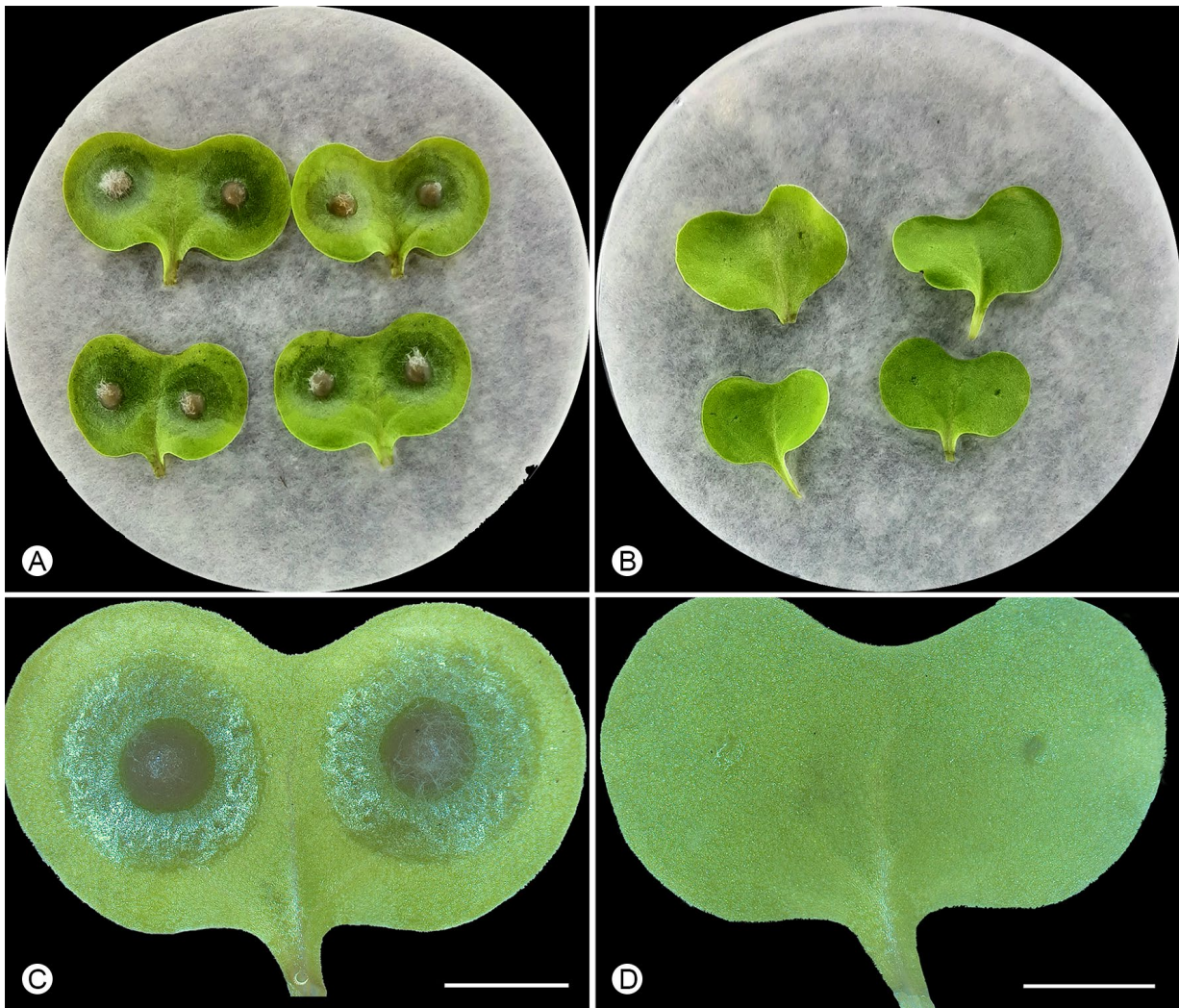


Figure 5. Pathogenicity test of *Plenodomus biglobosus* ‘brassicae’ MF-R-167 on cotyledons of oilseed rape Oredez 4. A, C. Tested cotyledons, two days after inoculation with mycelial suspension B, D. Control cotyledons, two days after inoculation with sterile water. Scale bar: C and D, 5 mm.

Рисунок 5. Результаты оценки патогенности изолята *Plenodomus biglobosus* ‘brassicae’ MF-R-167 на семядолях рапса Оредеж 4. А, С. Инокулированные мицелиальной суспензией семядоли, 2 суток после инокуляции. В, D. Инокулированные стерильной водой семядоли, 2 суток после инокуляции. Масштабная линейка: С и D, 5 мм.

Discussion

This work is the first attempt to determine biodiversity of *Plenodomus* spp. infecting oilseed in Russia confirmed by reliable molecular phylogenetic data. It demonstrated that both *P. biglobosus* and *P. lingam* occur in this host in Leningrad and Kaliningrad Provinces (North West of European part of Russia), and that only *P. biglobosus* occurs in Adygeya and Krasnodar Area (South of European Russia). Both species belong to the subclade ‘brassicae’. Other subclades were not found.

It is important to note that it is difficult to diagnose the causal agents of Phoma black stem and Phoma leaf spot of oilseed rape basing on the symptoms alone. For example, *Plenodomus biglobosus* ‘brassicae’ isolates MF-Br17-022 and MF-Br17-022, and *P. lingam* ‘brassicae’ isolates MF-Br17-029 and MF-Br17-031 were obtained from symptomatic stems of the same sample. Also, there *Plenodomus* infection is not associated with a particular organ of the host plant: both species were isolated from stems and leaves. Besides, other

morphologically similar *Phoma*-like species were isolated from the symptomatic tissue (data not shown).

The polyphasic approach for reliable species recognition is widely used by mycologists and plant pathologists to distinguish plant pathogenic species, including *Plenodomus*, and relies on the consolidated species concept (CSC) implying incorporating morphological, biological and phylogenetic characters. Data on phylogenetic characters should be obtained according to the genealogical concordance phylogenetic species recognition (GCPSR) method using multilocus phylogenetic approaches for recognizing fungal species. When applying a polyphasic approach for species recognition, it should be noted that GCPSR substantial outweighs the ecological or morphological data combined in the CSC (Crous et al., 2015).

PCR with species-specific primers has been proved to be an effective tool to identify isolates as *P. biglobosus* or *P. lingam* (Mahuku et al., 1995). Our analyses demonstrated that in order to achieve accurate and reliable subclades definition, the

multilocus phylogeny based on combined data matrix of ITS sequences, and partial *act* and *tub* genes might be successfully used.

Although the *P. biglobosus* pure culture on PSA differed from *P. lingam* in production of diffusible dark yellow-orange pigment, this feature alone would not be sufficient for reliable species identification, because it is known that only some *P. biglobosus* isolates produce this pigment (King, West, 2022). There is little difference between these species in micromorphological features of spore-bearing structures. Pycnidia and conidia of *P. lingam* isolates (206×207 and $4 \times 1.8 \mu\text{m}$) were slightly smaller than of *P. biglobosus* (375×296 and $4.7 \times 2 \mu\text{m}$). The data on conidia dimensions corresponded to morphological description of these species made by Boerema (Boerema et al., 2004). Pycnidia of *P. lingam* were subglobose-conical with broad base and usually slightly papillate pore, $150\text{--}250$ (up to 400) μm diam. Conidia were oblong-ellipsoidal $3.5\text{--}5 \times 1\text{--}2 \mu\text{m}$, and usually have 2 small guttules. Pycnidia of *P. biglobosus* were relatively large, globose-papillate up to $330\text{--}400 \mu\text{m}$ diam., or smaller, $150\text{--}250 \mu\text{m}$ diam. Conidia subcylindrical, straight, biguttulate, and mostly $4\text{--}5 \times 1.5\text{--}2 \mu\text{m}$. It is clear that the range of variation of the morphological features overlaps for these species, so it can not be used as the sole basis for the species identification. In addition, several morphological features, such scleroplectenchymatous nature of pycnidial wall, in both species are difficult to assess. The pseudoparenchymatous or scleroplectenchymatous wall structure of pycnidia should be

studied by staining thin and thick sections with Lugol's iodine. The walls of scleroplectenchyma become red by adsorption of iodine, but pseudoparenchymatous wall structure do not demonstrate such staining pattern (Boerema et al., 2004). No red staining was not observed in our observations of pycnidial walls in both species (data not shown). Thus, for the species identification, morphological, ecological and other features can be used only as additional information.

It has been noted that *P. lingam* isolates are more aggressive than *P. biglobosus* (West et al., 2001; Lob et al., 2013; Zou et al., 2019). However, our pathogenicity results for both species did not confirm this observation.

Phytosanitary measures do not require identification of *Plenodomus* spp. to subclades or even to species. However, we believe that accurate identification at least at the genus level is required given that the other genera of *Phoma*-like fungi may develop on *Brassicaceae*. The genus identification should be based on examination and observation of morphological characters after growing the purified fungal culture on two agar media, PSA and OA.

The results of this study highlight the need to review the biodiversity of causal agents of Phoma stem canker and Phoma leaf spot through theoretical and fundamental studies, not only in oilseed rape but also in other *Brassicaceae* crops cultivated in Russia. This would require regular phytosanitary monitoring of *Brassicaceae* fields in different areas of Russia and identification of species and subclades of the genus *Plenodomus*.

References

- Artamonov AA (2012) [Susceptibility of varieties of spring oilseed rape (*Brassica napus* L.) to Phoma black stem and Fusarium wilt]. *Idey N.I. Vavilova v sovremennom mire. Tezisy dokladov III Vavilovskoy mezhdunarodnoy konferencii 6–9 November 2012. SPb 2012* 1:77 (In Russian)
- Artamonov AA (2014) [Susceptibility of varieties of oilseed rape to diseases]. *Agro XXI* 10–12:5–7 (In Russian)
- Artamonov AA, Gorshkov VI (2009) [Disease resistance of spring oilseed rap varieties]. *Zemledelie* 2: 45–46 (In Russian)
- Bilay VI, Gvozdyak RI, Skripal IG, Kraev VG et al (1988) [Microorganisms – causal agents of plant diseases]. Kiev: Naukova dumka. 552 p (In Russian)
- Bochkareva EB, Alifirova TP (2009) [Resistance of breeding material of winter oilseed rape VNIIMK to Phoma black stem]. *Fitosanitarnye problemy vozdelevaniya rapsa. Sbornik materialov mezhdunarodnogo seminara, posvyashchennogo 50-letiyu sotrudnichestva mezhdru Akademiyey nauk Polshi I RASKHN. Prilozhenie k zhurnaly Vestnik zashchity rasteniy* 1:53–56 (In Russian)
- Bochkareva EB, Soldatova VV, Stepin AV (2006) [Promising source material of winter oilseed rape for breeding varieties resistant to Phoma black stem]. *Maslichnye kultury: nauchtech byul VNIIMK* 1(134):78–82 (In Russian)
- Boerema GH, de Gruyter J, Noordeloos ME, Hamers MEC (2004) *Phoma* identification Manual. CABI Publishing. 479 p.
- Boyle JS, Lew AM. (1995) An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet* 11(1):8. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)88977-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)88977-5)
- Chen GY, Wu CP, Li B, Zhen SZ et al (2010) Detection of *Leptosphaeria maculans* from imported Canola seeds. *J Plant Dis Prot* 117(4):173–176
- Crous PW, Hawksworth DL, Wingfield MJ. (2015) Identifying and naming plant-pathogenic fungi: past, present, and future. *Annu Rev Phytopathol* 53:247–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120245>
- de Gruyter J, Woudenberg JHC, Aveskamp MM, Verkley G JM et al (2013) Redisposition of *Phoma*-like anamorphs in *Pleosporales*. *Stud Mycol* 75:1–36. <https://doi.org/10.3114/sim0004>
- Dilmaghani A, Balesdent MH, Didier JP, Wu C et al (2009) The *Leptosphaeria maculans*–*Leptosphaeria biglobosa* species complex in the American continent. *Plant Pathol* 58: 1044–1058. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02149.x>
- Dilmaghani A, Balesdent MH, Rouxel T, Moreno-Rico O (2010) First report of *Leptosphaeria biglobosa* (blackleg) on *Brassica oleracea* (cabbage) in Mexico. *Plant Dis* 94:791. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-6-0791C>
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18
- Fedotov VA, Goncharov SV, Savenkov VP (2008) [Oilseed rape in Russia]. Moscow: Agroliga. 336p (In Russian)
- Fitt BDL, Brun H, Barbetti MJ, Rimmer SR (2006) World-wide importance of Phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *Eur J Plant Pathol* 114:3–15. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-2233-5>
- Fitt BDL, Hu BC, Li ZQ, Liu SY et al (2008) Strategies to prevent spread of *Leptosphaeria maculans* (Phoma

- stem canker) onto oilseed rape crops in China; costs and benefits. *Plant Pathol* 57:652–664. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01841.x>
- Frac M, Kaczmarek J, Jedryczka M (2022) Metabolic capacity differentiates *Plenodomus lingam* from *P. biglobosus* subclade ‘brassicae’, the causal agents of Phoma leaf spotting and stem canker of oilseed rape (*Brassica napus*) in agricultural ecosystems. *Pathogens* 11:50. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010050>
- Gasich EL (2004) [Diseases of oilseed rape caused by fungi]. SPb. 52 p (In Russian)
- Gasich EL, Gannibal PB, Khlopunova LB, Levitin MM (2015) [Pathogenicity of the mycelial inoculum of the *Alternaria* species pathogenic to *Brassicaceae*]. *Sovremennaya mikologiya v Rossii* 5:35–37 (In Russian)
- Jedryczka M, Nikonorenkov VA, Gasich E, Lewartowska E et al (2002) Spectrum and severity of fungal diseases on spring oilseed rape in Russia. *Integrated Control in Oilseed Crops IOBC/wprs Bull* 25(2):13–19
- Kachlicki P, Lewartowska E, Jedryczka M, Gasich EL et al (2001) Charakterystyka metabolitow grzyba *Phoma lingam* porażających rzepak na terenie Rosji. *Materiały XI Konferencji “Grzyby mikroskopowe – badania genetyczne i molekularne nad patogenami roślin i ich metabolitami”*, Warszawa, 3.04.2001 1:28–32.
- King KM, West JS (2022) Detection of the *Phoma* pathogens *Plenodomus biglobosus* subclades ‘brassicae’ and ‘canadensis’ on wasabi, and ‘canadensis’ in Europe. *Eur J Plant Pathol* 162:751–756. doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02428-z>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C et al (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 35:1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Liu Z, Latunde-Dada AO, Hall AM, Fitt BDL (2014). Phoma stem canker disease on oilseed rape (*Brassica napus*) in China is caused by *Leptosphaeria biglobosa* ‘brassicae.’ *Eur J Plant Pathol* 140:841–857. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0513-7>
- Lob S, Jaspers MV, Ridgway HJ, Jones EE (2013) *Leptosphaeria maculans*/L. *biglobosa* disease progression in oilseed rape and timing of ascospore release under New Zealand conditions. *N Z Plant Prot* 66:214–222. <https://doi.org/10.30843/nzpp.2013.66.5548>
- Lord E, Leclercq M, Boc A, Diallo AB et al (2012) Armadillo 1.1: An original workflow platform for designing and conducting phylogenetic analysis and simulations. *Plos One* 7(1):e29903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029903>
- Luo T, Li G, Yang L (2021) First report of *Leptosphaeria biglobosa* ‘canadensis’ causing blackleg on oilseed rape (*Brassica napus*) in China. *Plant Dis*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2735-PDN>
- Mahuku GS, Goodwin PH, Hall R (1995) A competitive polymerase chain reaction to quantify DNA of *Leptosphaeria maculans* during blackleg development in oilseed rape. *Mol Plant Microbe Int* 8:761–767. <https://doi.org/10.1094/mpmi-8-0761>
- Mendes-Pereira E, Balesdent MH, Brun H, Rouxel T (2003) Molecular phylogeny of the *Leptosphaeria maculans*-L. *biglobosa* species complex. *Mycol Res* 107:1287–1304. <https://doi.org/10.1017/S0953756203008554>
- Plummer KM, Dunse K, Howlett BJ (1994) Non-aggressive strains of the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, are present in Australia and can be distinguished from aggressive strains by molecular analysis. *Aust J Bot* 42:1–8. <https://doi.org/10.1071/BT9940001>
- Purwantara A, Burton WA, Salisbury PA, Howlett BJ (1998) Reaction of *Brassica juncea* (Indian mustard) lines to Australian isolates of *Leptosphaeria maculans* under glasshouse and field conditions. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 895–902. <https://doi.org/10.1023/A:1008609131695>
- Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O (2002) Introduction to food- and airborne fungi. Sixth Edition. Utrecht, Netherlands: Centraal bureau voor schimmelcultures. 389 p.
- Serdyuk OA, Bochkareva EB, Piven VT (2011) [Diseases of the Brassicaceae crops in the Krasnodar Area]. *Zashchita i karantin rasteniy* 3:50–53 (In Russian)
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F, Jeanmougin F. et al (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24:4876–4882. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>
- Van de Wouw AP, Thomas VL, Cozijnsen AJ, Marcroft SJ et al (2008) Identification of *Leptosphaeria biglobosa* ‘canadensis’ on *Brassica juncea* stubble from northern New South Wales, Australia. *Australas Plant Dis Notes* 3:124–128. <https://doi.org/10.1007/BF03211265>
- Vaydia G, Lohman DJ, Meier R (2011) SequenceMatrix: concatenation software for the last assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* 27:171–80. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x>
- Vincenot L, Balesdent MH, Li H, Barbetti MJ et al (2008) Occurrence of a new subclade of *Leptosphaeria biglobosa* in Western Australia. *Phytopathol* 98:321–329. <https://doi.org/10.1094/PHTO-98-3-0321>
- Voigt K, Cozijnsen AJ, Kroymann J, Pöggeler S et al (2005) Phylogenetic relationships between members of the crucifer pathogenic *Leptosphaeria maculans* species complex as shown by mating type (MAT1-2), actin, and β -tubulin sequences. *Mol. Phylogenetics Evol* 37(2):541–57. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.07.006>
- West JS, Kharbanda PD, Barbetti MJ, Fitt BDL (2001) Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (Phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathol* 50:10–27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00546.x>
- Xue B, Goodwin PH, Annis SL. (1992) Pathotype identification of *Leptosphaeria maculans* with PCR and oligonucleotide primers from ribosomal internal transcribed spacer sequences. *Physiol Mol Plant Pathol* 41(3):179–188. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(92\)90009-K](https://doi.org/10.1016/0885-5765(92)90009-K).
- Zhao P, Crous PW, Hou LW, Duan WJ et al (2021) Fungi of quarantine concern for China I: *Dothideomycetes*. *Persoonia* 47:45–105. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2021.47.02>
- Zou Z, Zhang X, Parks P, du Toit LJ et al (2019) A new subclade of *Leptosphaeria biglobosa* identified from *Brassica rapa*. *Int J Mol Sci* 20(7):1668. <https://doi.org/10.3390/ijms20071668>

ВИДЫ *PLENODOMUS*, ПОРАЖАЮЩИЕ РАПС В РОССИИ

М.М. Гомжина*, Е.Л. Гасич

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург

* ответственный за переписку, e-mail: gomzhina91@mail.ru

Фомоз – одно из самых распространенных заболеваний рапса. Возбудителями заболевания являются грибы *Plenodomus lingam* и *P. biglobosus*. Эти виды грибов могут вызывать такие симптомы как рак стебля, сухая гниль или листовую пятнистость. Внутри этих видов выделяют соответственно две и семь филогенетических линий (субклад). Корректная идентификация этих субклад возможна только в результате мультилокусного филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей ITS локуса и участков генов, ответственных за синтез актина и β -тубулина. Комплексный анализ биоразнообразия и географического распространения видов *Plenodomus*, поражающих рапс в России, не проводился. В данной работе было исследовано 18 изолятов *Plenodomus* spp., выделенных из рапса, собранного на территории четырех регионов России в 2004–2021 годах. Целью работы была идентификация этих изолятов с помощью мультилокусного филогенетического анализа и оценка их патогенности. На всех полученных филограммах исследованные изоляты формировали две монофилетические клады, соответствующие двум видам – *P. lingam* (8 изолятов) и *P. biglobosus* (10). Все изоляты каждого вида относились к одной субкладе: *P. lingam* ‘brassicae’ и *P. biglobosus* ‘brassicae’. Помимо детальных филогенетических данных, рукопись сопровождается подробным описанием культуральных и микроморфологических признаков обоих видов, а также оценкой патогенных свойств.

Ключевые слова: *Brassica*, *Leptosphaeria*, *Phoma*, молекулярная филогения, патогенность, субклады, фомоз

Поступила в редакцию: 20.07.2022

Принята к печати: 08.09.2022

О ПРОШЕДШЕМ МЕРОПРИЯТИИ: ВТОРОЙ ВИРТУАЛЬНЫЙ СЪЕЗД ОБЩЕСТВА ПАТОЛОГИИ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

С 1967 года Общество 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 продолжающейся пандемией коронавирусной инфекции, вновь решено провести ежегодное собрание в онлайн-формате с 1 по 4 августа 2022 г. в Порт-Элизабет (Южно-Африканская Республика). Научная программа мероприятия включала результаты текущих фундаментальных и прикладных исследований патологии беспозвоночных. Среди основных событий следует отметить проходившие в режиме реального времени симпозиумы, организованные

Отделениями Вирусов, Бактерий, Микроспоридий, Нематод и Микробиологической борьбы, а также пленарный симпозиум на тему «Микробные биопестициды в странах с низким и средним доходом: успехи, нужды и вызовы». Предварительно записанные секционные доклады и стендовые доклады в виде электронных файлов были доступны для ознакомления участниками на протяжении всего мероприятия, и для их обсуждения были организованы отдельные сессии. В программе было представлено свыше 160 научных докладов, включая 2 выступления российских ученых, посвященных новому виду микроспоридий трематод (Соколова Ю.Я. и др.) и тестированию энтомопатогенных микроорганизмов против сибирского шелкопряда (Токарев Ю.С. и др.). Также российские участники приняли участие в организации симпозиума Отделения Микроспоридий двух секционных заседаний.

PAST CONFERENCE: SECOND 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 ongoing coronavirus pandemics, it was decided again to hold the annual meeting online from 1st to 4th of August 2022 in Port Elisabeth, South African Republic. The scientific program provided the latest fundamental and applied findings in invertebrate pathology. Among the scientific highlights, the society's divisions have put together stimulating symposia

(Virus, Bacteria, Microsporidia, Nematode & Microbial Control) and the plenary symposium has been on 'Microbial biopesticides in lower and middle income countries: success, needs and challenges'. All symposia have been live while the contributed talks were prerecorded and poster presentations were available as electron files. Live chat sessions were organized for the discussion. Over 160 talks were included in the program, including two from Russia, dedicated to a new species of microsporidia from trematodes (Sokolova Y.Y. et al.) and testing entomopathogenic microorganisms against the Siberian silkmoth (Tokarev Y.S. et al.) Russian participants have also contributed to organization of Microsporidia Division Symposium and two live sessions.

О ПРОШЕДШЕМ МЕРОПРИЯТИИ: XVI СЪЕЗД РУССКОГО ЭНТОМОЛОГИЧЕСКОГО ОБЩЕСТВА

Русское энтомологическое общество – одно из старейших научных биологических обществ страны, насчитывающее свыше 160 лет со дня основания. РЭО в своих рядах объединяет более 700 энтомологов – профессионалов и любителей, объектами интересов которых являются особи, популяции и виды – всё многообразие насекомых и других членистоногих животных на нашей планете. 21–26 августа 2022 года состоялся XVI съезд Русского энтомологического общества, на котором были подведены итоги энтомологических исследований в России за пятилетний период, прошедший с момента прошлого Съезда, состоявшегося в 2017 г. в Новосибирске. Мероприятие прошло на базе Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Научная программа включала пленарное заседание и 15 секционных заседаний, в том числе две секции, посвященные вредным объектам сельского и лесного хозяйства и борьбе с ними.

На пленарном заседании доложены доклады о причинах и следствиях вспышек массового размножения вредных насекомых-фитофагов в лесах Северо-Запада РФ (Селиховкин А.В., СПбГЛТУ), о связующей роли насекомых в функционировании надземных и подземных трофических сетей (Тиунов А.В., Виноградов Д.Д., ИПЭЭ РАН), об успехах в области палеоэнтомологии (Расницын А.П., ПИН РАН) и о межвидовой гибридизации насекомых (Лухтанов А.В., ЗИН РАН).

К резолюции съезда участниками секции сельскохозяйственной энтомологии сделаны следующие предложения:

«С учетом усиления инвазионных процессов, учеными ВИЗР предложена новая парадигма защиты растений, направленная на стабилизацию агроэкосистем с использованием принципиально новых технологий мониторинга и молекулярно-генетических методов селекции. Парадигма

предусматривает сверххранное обнаружение вредителей, сокращение применения пестицидов и усиление роли природных популяций энтомофагов. Для уничтожения инвазионных видов будет усилен ассортимент пестицидов и проведена селекция ключевых видов энтомофагов на резистентность к этим препаратам. Важнейший элемент указанной парадигмы – фитосанитарное проектирование, которое обеспечивает управление популяциями вредителей и энтомофагов на агроландшафтном уровне. Съезд РЭО отмечает значительное продвижение НИР в области инфекционной патологии насекомых, что позволило создать новые биопрепараты на основе энтомопатогенных грибов для борьбы с саранчовыми. При научном сопровождении ВИЗР в особой экономической зоне Санкт-Петербурга запущено крупнейшее в России биотехнологическое производство энтомофагов. Участники секции сельскохозяйственной энтомологии обращают внимание на необходимость расширения НИР по резистентным популяциям экономически значимых фитофагов и карантинным объектам. Селекцию сельскохозяйственных культур целесообразно направить на создание сортов с усиленным синтезом веществ, привлекающих хищников и паразитоидов в очаги вредителей. Для широкого использования методов генетического редактирования в селекции энтомофагов необходимо разрабатывать их частную генетику. В ходе обсуждения докладов, посвященных участвующим инвазиям, подчеркивалась необходимость перейти от регистрации новых инвазионных видов к изучению их биологии и вредоносности в локальных условиях. Участниками секции высказано предложение к Президиуму РЭО: опубликовать на сайте РЭО текст Устава общества и организовать его обсуждение с целью модернизации».

PAST CONFERENCE: XVI MEETING OF RUSSIAN ENTOMOLOGICAL SOCIETY

The Russian Entomological Society is one of the oldest scientific biological societies in the country, dating back over 160 years from its foundation. RES unites more than 700 entomologists – professionals and amateurs, whose objects of interest are individuals, populations and species – the whole variety of insects and other arthropods on our planet. On August 21–26, 2022, the XVI Congress of the Russian Entomological Society was held, at which the results of entomological research in Russia were summarized over the five-year period that have passed since the last Congress, held in 2017 in Novosibirsk. The event was hosted by the Faculty of Biology of Moscow State University. M.V. Lomonosov. The scientific program included a plenary session and 15 sections, including two sections devoted to harmful objects of agriculture and forestry and their control.

At the plenary session, reports were presented on the causes and consequences of outbreaks of mass reproduction of harmful phytophagous insects in the forests of the North-West of the Russian Federation (Selikhovkin A.V., St. Petersburg State Forest Technical University), on the linking role of insects in the functioning of the aboveground and underground trophic networks (Tiunov A.V., Vinogradov D.D., Institute of Problems of Evolution and Ecology RAS), progress in paleoentomology (Rasnitsyn A.P., Paleontological Institute RAS) and interspecific hybridization in insects (Lukhtanov A.V., Zoological Institute RAS).

As an amendment to the resolution of the Congress, the participants of the section of agricultural entomology proposed the following:

“Taking into account the strengthening of invasive processes, the scientists of All-Russian Institute of Plant Protection have proposed a new plant protection paradigm aimed at stabilizing agroecosystems using fundamentally new monitoring technologies and molecular genetic breeding methods. The paradigm provides for ultra-early detection of pests, reduction in the use of pesticides and strengthening the role of natural populations of entomophagous arthropods. In order to eliminate the invasive species, the assortment of pesticides will be strengthened and key species of entomophagous arthropods will be selected for resistance to these agrochemicals. The most important element of this paradigm is the phytosanitary design, which ensures the management of pest and entomophagous arthropod populations at the ecosystem level. The Congress of the Russian Entomological Society notes the significant progress in the field of infectious pathology of insects which made it possible to create new biological products based on entomopathogenic fungi for locust control. With the scientific support of VIZR, the

largest biotechnological production of entomophagous insects and mites in Russia was launched in the special economic zone of St. Petersburg. Participants of the agricultural entomology section draw attention to the need to expand R&D on resistant populations of economically important phytophagous pests and quarantine objects. It is advisable to direct the selection of agricultural crops to create varieties with enhanced synthesis of substances that attract predators and parasitoids to the pest foci. To facilitate the wide use of genetic editing methods in the selection of entomophagous insects, it is necessary to develop molecular genetic studies of particular species. In the course of the discussion of the reports devoted to the increasing frequency of invasions, the need was emphasized to move from the registration of new invasive species to the study of their biology and harmfulness under local conditions. The participants of the section made a proposal to the Presidium of the Russian Entomological Society to publish the text of the Charter of the Society on the website and to organize its discussion for the purpose of modernization”.

О ПРОШЕДШЕМ МЕРОПРИЯТИИ: XI МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «БИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ – ОСНОВА СТАБИЛИЗАЦИИ АГРОЭКОСИСТЕМ»

С 13 по 15 сентября 2022 года в Краснодаре прошла XI Международная научно-практическая конференция «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкоцистем» на базе Федерального научного центра биологической защиты растений. В ней приняли участие 300 человек из России, Абхазии, Беларуси, Казахстана, Узбекистана, Сербии, Китая, Бразилии, Зимбабве, Нигерии и Турции. В первый день состоялась панельная дискуссия и лекторий по ключевым направлениям тематики конференции, в которых приняли участие 14 спикеров. От ФГБНУ ВИЗР принял участие академик РАН Виктор Иванович Долженко. Большой интерес участников вызвали работа семи секций со 126 выступлениями по всем направлениям, связанным с биологической защитой растений; Жученковские чтения VII, посвященные видному ученому-биологу, создателю научного направления по экологической генетике академику РАН А.А. Жученко; выставка производителей средств защиты растений и органической продукции, произведенной по требованиям мировых стандартов. Впервые в Краснодарском крае в рамках конференции состоялась Школа РНФ 2.0, в которой приняли участие Андрей Николаевич Блинов, заместитель генерального директора Российского научного фонда, и Мария

Николаевна Михалева, заместитель начальника Управления программ и проектов. Состоялся открытый диалог с кубанскими учеными, в котором участники смогли задать актуальные вопросы о работе Российского научного фонда и получить на них ответы. Прошедшая конференция – важный научно-практический форум по биологической защите, органическому земледелию, проведенный в рамках празднования 300-летия Российской Академии Наук и в день 85-летия образования Краснодарского края. Регулярность ее проведения – свидетельство пропаганды научных достижений в области современных агроботехнологий, биологической защиты растений, в т.ч. для технологий органического сельского хозяйства; формирования единой коммуникационной площадки в сфере агроботехнологий; укрепления межрегионального и международного сотрудничества; развития связей между наукой и производством; популяризации ценностей и возможностей научной и инновационной системы России. К конференции были изданы два сборника научных трудов, а также брошюра, посвященная выдающимся ученым в области биологической защиты растений.

<http://events.fncbzh.ru/upload/medialibrary/a03/post-release.pdf>

PAST CONFERENCE: XI INTERNATIONAL CONFERENCE “BIOLOGICAL PLANT PROTECTION – THE BASIS FOR AGROECOSYSTEM STABILIZATION”

From September 13 to 15, 2022, the XI International Scientific and Practical Conference “Biological Plant Protection – the Basis for Agroecosystem Stabilization” was held in Krasnodar on the basis of the Federal Scientific Center for Biological Plant Protection. It was attended by 300 participants from Russia, Abkhazia, Belarus, Kazakhstan, Uzbekistan, Serbia, China, Brazil, Zimbabwe, Nigeria, and Turkey. On the first day, a panel discussion and lectures were held concerning the key areas of the conference scope, in which 14 speakers took part. Academician of the Russian Academy of Sciences Viktor Ivanovich Dolzhenko took part from All-Russian Institute of Plant Protection. The participants were greatly interested in the work of seven sections with 126 presentations in all areas related to biological plant protection; Zhuchenkov’s Readings VII, dedicated to the prominent biologist, founder of the scientific direction in ecological genetics, Academician of the Russian Academy of Sciences A.A. Zhuchenko; exhibition of manufacturers of plant protection products and organic products produced according to the requirements of world standards. For the first time in the Krasnodar Territory, the Russian Science Foundation School 2.0 was held as part of the conference, which was attended by Andrey Nikolaevich Blinov, Deputy General Director of the

Russian Science Foundation, and Maria Nikolaevna Mikhaleva, Deputy Head of the Programs and Projects Department. An open dialogue was held with Kuban scientists, in which the participants were able to ask topical questions about the work of the Russian Science Foundation and get answers to them. The past conference is an important scientific and practical forum on biological protection, organic farming, held as part of the celebration of the 300th anniversary of the Russian Academy of Sciences and on the day of the 85th anniversary of the formation of the Krasnodar Territory. The regularity of its organization is an evidence of the promotion of scientific achievements in the field of modern agrobiotechnologies, biological plant protection, incl. for organic agriculture technologies; formation of a single communication platform in the field of agrobiotechnologies; strengthening interregional and international cooperation; development of links between science and production; popularization of the values and opportunities of the scientific and innovative system of Russia. Two collections of scientific papers were published for the conference, as well as a brochure dedicated to outstanding scientists in the field of biological plant protection.

<http://events.fncbzh.ru/upload/medialibrary/a03/post-release.pdf>

ПАМЯТИ ИРМЫ ВИКТОРОВНЫ ИССИ

IN MEMORY OF IRMA V. ISSI



*Для науки совет один – не проезжей дорогой идти,
А в неведомых нам мирах хоть тропинку свою найти,
Чтоб неведомый ранее мир, не известный ещё никому,
Ты бы смог найти и хоть что-то понять самому.*

И.В. Исси

29 сентября 2022 года ушла из жизни Ирма Викторовна Исси – учёный-биолог мирового уровня, доктор наук, профессор, создатель отечественной научной школы микроспоридиологии.



Ирма Викторовна Исси родилась 11 января 1930 г. в Ленинграде. На период её обучения в средней школе пришлось Великая Отечественная война, и все 900 дней блокады Ленинграда Ирма Викторовна провела в осажденном городе. Как она писала в своих воспоминаниях о войне, «вспоминая блокаду, я до сих пор не могу понять, как мы выжили и как вообще можно было выжить

в таких условиях. Я никогда не жалела и не жалею о том, что осталась в блокадном Ленинграде. ... И это чувство – я победитель – помогало мне и выжить, и просто пережить многие трудные или трагические периоды моей жизни*». После окончания войны её отец, как сотрудник штаба 3-го Украинского фронта, был переведен в штаб Южной группы советских оккупационных войск в г. Констанца, Румыния. Там Ирма Викторовна жила и училась в школе в течение полугода, после чего вернулась в Ленинград. Ирма с детства увлекалась рисованием, занималась в художественном кружке Ленинградского дворца пионеров и делала значительные успехи. Однако знакомство с особенностями карьеры рядовых советских художников, вынужденных посвящать основное время рутинным за-

казам, не имеющим ничего общего с творчеством, послужило препятствием для выбора такого жизненного пути. Благодаря тесному общению со своим дядей, известным палеонтологом Алексеем Петровичем Быстровым, она живо заинтересовалась палеонтологией, и это отчасти определило её дальнейшую судьбу как биолога. По состоянию здоровья, подорванного тяжелыми условиями блокады, вопреки её желанию ей не было рекомендовано учиться на геологическом факультете Ленинградского государственного университета (ЛГУ), в связи с чем в 1949 г. она поступила на биологический факультет, блестяще сдав вступительные экзамены.

Преподавание на биофаке в то время носило весьма специфические черты ввиду официального признания так называемой «мичуринской биологии» и отрицания всех основополагающих положений классической генетики, с чем преподаватели, если они планировали продолжать работу в стенах Университета, не имели права не соглашаться. Так был уволен протистолог мирового уровня Юрий Иванович Полянский. При этом кафедру дарвинизма возглавлял не кто иной, как Исая Израилевич Презент, известный как главный пропагандист идей Трофима Денисовича Лысенко, что нельзя расценивать иначе, как полное обесценивание и искажение открытий великого



* Исси ИВ (2016) Как мы выжили. Моя война, моя блокада... В кн.: Блокада глазами очевидцев. Книга третья. СПб: Остров. 68–282. <http://iae.makorzh.ru/Bystrow/blockada.htm>

основоположника эволюционной биологии Чарльза Дарвина. Тем не менее, пылкий ум, жизненные наблюдения и знакомство с тем, как проходят научные дискуссии в стенах Военно-медицинской Академии, позволили Ирме Викторовне сформировать собственное мнение по данному вопросу. Получение системных знаний в области генетики стало возможным благодаря мужеству профессора Ивана Ивановича Соколова, приобщавшего студентов к «тайным знаниям» в неофициальной обстановке, а также умелому стилю преподавания известного советского эволюциониста и историка науки Кирилла Михайловича Завадского, который находил возможность передать на лекциях своё истинное отношение к идеям, доминирующим тогда в советской биологии. Совершенно новыми материалами по эволюции и филогении растительного мира ярко и образно делился на своих увлекательнейших лекциях знаменитый советский ботаник, будущий академик АН СССР Армен Леонович Тахтаджян. О существовании главного объекта научной работы всей своей жизни Ирма Викторовна также узнала в Университете от виднейшего отечественного зоолога с мировым именем, Валентина Александровича Догеля, который рассказывал на своих лекциях об уникальном строении микроспоридий.

Учебную практику студенты биофака проходили как в пригороде Ленинграда Петергофе, так и в заповеднике «Лес на Ворскле» Белгородской области. Там наибольший интерес Ирмы Викторовны вызвали насекомые. Это

совпало с кафедральным распределением – она попала на кафедру энтомологии, возглавляемую тогда Борисом Николаевичем Шванвичем, чьи учебники прекрасно известны поколениям отечественных энтомологов и не утратили своей актуальности до сих пор. Под руководством Александра Сергеевича Данилевского, одного из основоположников теории фотопериодизма насекомых, Ирма Викторовна участвовала в изучении особенностей фотопериодической реакции насекомых разных отрядов. С другой стороны, выполнение достаточно рутинной работы по досконально отработанным методикам не могло все-речь увлечь такую творческую натуру, какой была Ирма Викторовна, и вопрос о выборе темы дипломной работы оставался открытым. В результате профессор кафедры Эдуард Карлович Гринфельд предложил ей исследовать мало изученную тогда роль жуков в опылении растений в ходе летней практики в заповеднике «Лес на Ворскле», и предоставил простор для самостоятельной деятельности. В ходе выполнения значительного объёма работ в полевых и лабораторных условиях, кропотливо собирая и анализируя разнообразные данные, Ирма Викторовна смогла ответить на поставленный вопрос, и полученные результаты не только легли в основу её дипломной работы, защищённой на отлично, но и послужили материалом для её первой научной статьи (Гринфельд, Исси, 1956), а также для одной из глав докторской диссертации её научного руководителя.



Заповедник «Лес на Ворскле», Белгородская область (<https://commons.wikimedia.org/>)

Диплом И.В. Исси об окончании ЛГУ в 1954 г. подписывал уже Ю.И. Полянский, который смог вернуться к работе на факультете. К тому времени Ирма Викторовна вышла замуж за военного моряка, в связи с чем отказалась от распределения в Краснодарский биологический институт. Через год после того, как стала матерью, она занялась поиском возможности продолжить обучение или работу по специальности в Ленинграде. Первым местом, куда она устроилась, была городская Станция защиты лесных насаждений, но несчастный случай на производстве, приведший к отравлению гексахлораном, стал причиной врачебной рекомендации не работать с синтетическими инсектицидами. Поиски темы аспирантской подготовки привели Ирму Викторовну во Всесоюзный институт защиты растений (ВИЗР), где от первого варианта,

предложенного заведующим лабораторией иммунитета растений Исааком Давидовичем Шапиро, она отказалась по причине высокой степени разработанности научной проблематики и соответствующих методических подходов, что гарантировало успешное выполнение трехлетнего плана исследований, но превращало творческий процесс познания в рутинную обработку материала. Её привлекла лаборатория микробиологической защиты растений из-за разнообразия микроорганизмов, используемых в защите растений, слабой изученности многих аспектов их биологии, и необходимости разработки новых методических подходов. И поскольку для Ирмы Викторовны данное направление было абсолютно новым, она предпочла перед поступлением в аспирантуру поработать в лаборатории в течение года. За этот период ей довелось выполнить

значительный объём исследований патологии насекомых по планам лаборатории, включая командировку в горные леса Закарпатья в течение трёх месяцев полевого сезона, что окончательно укрепило желание самостоятельной и ни от кого не зависящей работы в области микробиологической защиты растений. Для дальнейшего изучения Ирме Викторовне были предложены две группы паразитических протистов – микроспоридии и грегарины, и выбор был сделан в пользу первых, в том числе благодаря вышеупомянутым лекциям В.А. Догеля.

После поступления в аспирантуру ВИЗР зимой 1961 г. Ирма Викторовна приступила к изучению всей доступной зарубежной литературы, ведь в Советском Союзе на тот момент было опубликовано описание лишь двух видов микроспоридий, а сложившиеся научные группы занимались этими патогенами в Англии, Германии, Чехии, Канаде, США и Аргентине. Библиотека Зоологического института стала основным местом её работы до наступления полевого сезона, а поскольку сюда поступали далеко не все журналы с нужными статьями, Ирма Викторовна завязала

активную переписку с зарубежными авторами научных исследований, которые практически всегда откликались на запросы, присылая экземпляры опубликованных рукописей. Собранная за жизнь И.В. Исси коллекция отгисков статей зарубежных и отечественных коллег-микроспоридиологов и прилагающийся к ней библиотечный каталог, насчитывающий сотни карточек, заполненных её рукой, служит микроспоридиологам ВИЗР до сих пор, ведь многие из этих изданий отсутствуют в российских библиотеках и не доступны в сети Интернет. Связи с зарубежными коллегами, начавшиеся с переписки или личных встреч на международных конференциях, переросли в плодотворное научное содружество со многими всемирно известными специалистами по микроспоридиям: Ярославом Вайзером (Чехия), Ронни Ларссоном (Швеция), Энн Кали (США), Каспаром Франценом (Германия), Ежи Липой (Польша), а в ряде случаев и в человеческую дружбу, как с выдающимся чешским ученым Иржи Ваврой. Эти связи помогали её аспирантам и ученикам интегрироваться в мировую науку.



Встреча Ирмы Викторовны Исси с Энн Кали и Каспаром Франценом в 2007 г. (слева); Ежи Липа в гостях у Ирмы Викторовны (справа)

С открытием полевого сезона, согласно плану аспирантской подготовки, Ирма Викторовна была направлена в командировку в южные районы страны – Азербайджан и Крым, где в предшествующем году наблюдались вспышки массового размножения непарного шелкопряда и было зарегистрировано заражение микроспоридиями. Это было непростое путешествие, полное ярких впечатлений, но проведённые обследования лесных массивов показали полное отсутствие искомого вредителя. Следует отметить, что это косвенно указывало на важную роль заражения микроспоридиями в динамике численности непарного шелкопряда, каковой феномен в дальнейшем подробно изучался зарубежными коллегами. По возвращении из поездки без целевого материала Ирме Викторовне стало известно от коллеги о возможном заражении микроспоридиями капустной белянки на капустных полях в Пушкине. Собрав новый материал, она смогла подтвердить это предположение, и тем самым не только компенсировала дефицит результатов своей поездки на юг, но и обнаружила новый объект для исследований, а именно микроспоридий белянок, их паразитов и гиперпаразитов, послуживший основной моделью паразитарных систем

и для кандидатской диссертации, защищенной в 1964 г., и для последующих работ, обобщенных, в том числе, в рамках докторской диссертации, защищенной в 1984 г., а также для нескольких кандидатских диссертаций, защищенных под руководством Ирмы Викторовны. Так она стала первым профессиональным микроспоридиологом в Советском Союзе, и вполне закономерно, что именно ей поручалось руководство исследованиями микроспоридий и микроспоридиозов насекомых, выполняемыми аспирантами из разных республик Советского Союза. Интересно, что первая ученица, Галина Николаевна Нилова, изучавшая микроспоридий озимой и хлопковой совки в Таджикистане, появилась ещё в период обучения Ирмы Викторовны в аспирантуре.

По мере развития биологических исследований и внедрения новых научных знаний в практику народного хозяйства, росла востребованность в специалистах патологии насекомых, включая микроспоридиологов, в разных уголках нашей большой страны. ВИЗР стал центром обучения таких специалистов под руководством И.В. Исси, которая считала своей первоочередной задачей обеспечить квалифицированными кадрами научные учреждения,

связанные с сельским и лесным хозяйством, ветеринарией и т.п., во всех союзных республиках. Всего она подготовила свыше 30 кандидатов и 5 докторов наук, и если для своих непосредственных учеников она стала «научной мамой», то учеников своих учеников она считала «научными внуками» и по праву называла себя «научной бабушкой». Важная черта научной школы Ирмы Викторовны

– научные связи и сотрудничество с отечественными и зарубежными исследователями, изучающими различные аспекты биологии микроспоридий и взаимоотношений этих микроорганизмов с хозяевами. Именно благодаря объединению усилий ученых с разными интересами и компетенциями стало возможным столь плодотворное развитие микроспориологии как науки в нашей стране.



Ирма Викторовна Исси со своей ученицей Юлией Яновной Соколовой, 1996 г.

После распада Советского Союза большинство контактов за пределами России были утрачены, а исследования в области микроспориологии прекращены. Тем не менее, сохранилось ядро исследователей, объединенных общими интересами, в ВИЗР, Институте цитологии, Санкт-Петербургском государственном университете, Санкт-Петербургском государственном университете ветеринарной медицины (Санкт-Петербург), Томском государственном университете (Томск), Институте систематики и экологии животных (Новосибирск) и т.д. В условиях дефицита финансирования науки и перехода на грантовую систему Ирма Викторовна выступила в качестве руководителя серии проектов Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) с 1995 по 2019 гг., что позволило продолжить лабораторные исследования и организовать экспедиции для сбора полевого материала в Европейской и Азиатской частях России. Со временем и её ученики стали руководителями инициативных и международных проектов РФФИ, а также Президентских грантов для молодых ученых и проектов Российского научного фонда, направленных на изучение различных аспектов биологии микроспоридий.

Ирмой Викторовной Исси с коллегами описано множество новых для науки таксонов микроспоридий, включая 61 вид и 11 родов из разнообразных членистоногих и впервые охарактеризована распространенность этих патогенов на территории Советского Союза, прежде всего возбудителей заболеваний сельскохозяйственных и лесных вредителей, кровососущих насекомых, промысловых ракообразных и других гидробионтов, включая рыб. Описание этих видов основывалось на данных световой и электронной микроскопии, и здесь талант Ирмы Викторовны как художника раскрылся в полной мере, так как в течение длительного периода работы фотографирование не было доступным, но увиденные в микроскоп особенности

строения клеток, реконструированные жизненные циклы, картины патологии зараженной клетки и т.п. фиксировались в виде графических изображений поразительного качества.

В монографии, обобщающей накопленный массив данных и представлений о систематике микроспоридий, Ирма Викторовна обосновала свою систему типа *Microsporidia* (Исси, 1986), признанную мировым научным сообществом. Также в этой монографии представлены сохранившие свою актуальность данные о влиянии микроспоридий на своих хозяев. В 1991 г. монография была переведена на английский язык Ежи Липой и опубликована Обществом Патологии Беспозвоночных (*Society for Invertebrate Pathology*) в США. Уточнения и дополнения этого массива данных можно найти в монографиях, написанных Ирмой Викторовной в соавторстве со своими учениками Юлией Яновной Соколовой (2001) и Владимиром Николаевичем Ворониным (2007). Аннотированный список таксонов микроспоридий, обнаруженных на территории Советского Союза и описанных в отечественной литературе прошлого века, а потому малодоступных для мирового сообщества, представлен на английском языке в журнале *Protistology* (Sokolova et al., 2018). Позднее, привлечение методов молекулярно-генетического анализа заставило пересмотреть основные положения таксономической системы микроспоридий в рамках интегративного подхода, и первостепенное внимание было уделено тем признакам тонкого строения, которые соответствовали данным молекулярной филогении. Ирма Викторовна, в отличие от многих систематиков «старой школы», поняла важность нового подхода к таксономии микроспоридий и активно участвовала в обосновании применения методов молекулярной диагностики и филогении для дифференциации внутривидовых форм и видов, а также таксонов более высокого ранга (Токарев, Исси, 2018).

Однако сама Ирма Викторовна считала таксономические исследования не самым важным направлением своей работы с микроспоридиями, отдавая приоритет биологическим особенностям и воздействию на хозяев. Для многих видов были определены частота встречаемости, особенности жизненных циклов и характер паразито-хозяинных взаимоотношений на клеточном, организменном и популяционном уровнях. Наблюдения за эпизоотиями микроспоридиозов в природе и анализ вирулентных свойств микроспоридий в лаборатории позволил разработать подходы к прогнозированию динамики численности вредителей сельского и лесного хозяйства с учетом активности микроспоридий и обосновать применение этих патогенов в защите растений. Поскольку в природе широко распространены энтомопатогены различных групп, и они же могут применяться против вредителей как микробиологические средства защиты растений, в фокусе внимания научной группы микроспоридиологов всегда был и остается вопрос микс-инфекций и совместного применения микроспоридий с другими энтомопатогенами, а также энтомофагами. Наиболее прогрессивные исследования микроспоридий, выполняемые в ВИЗР с применением современных методов молекулярной и клеточной биологии, связаны с именем ещё одного ученика Ирмы Викторовны – Вячеслава Васильевича Долгих. Именно на базе его научной группы в институте создана новая лаборатория молекулярной защиты растений, где не только продолжают основные направления работ, заложенные И.В. Исси, но и анализируются молекулярные механизмы регуляции

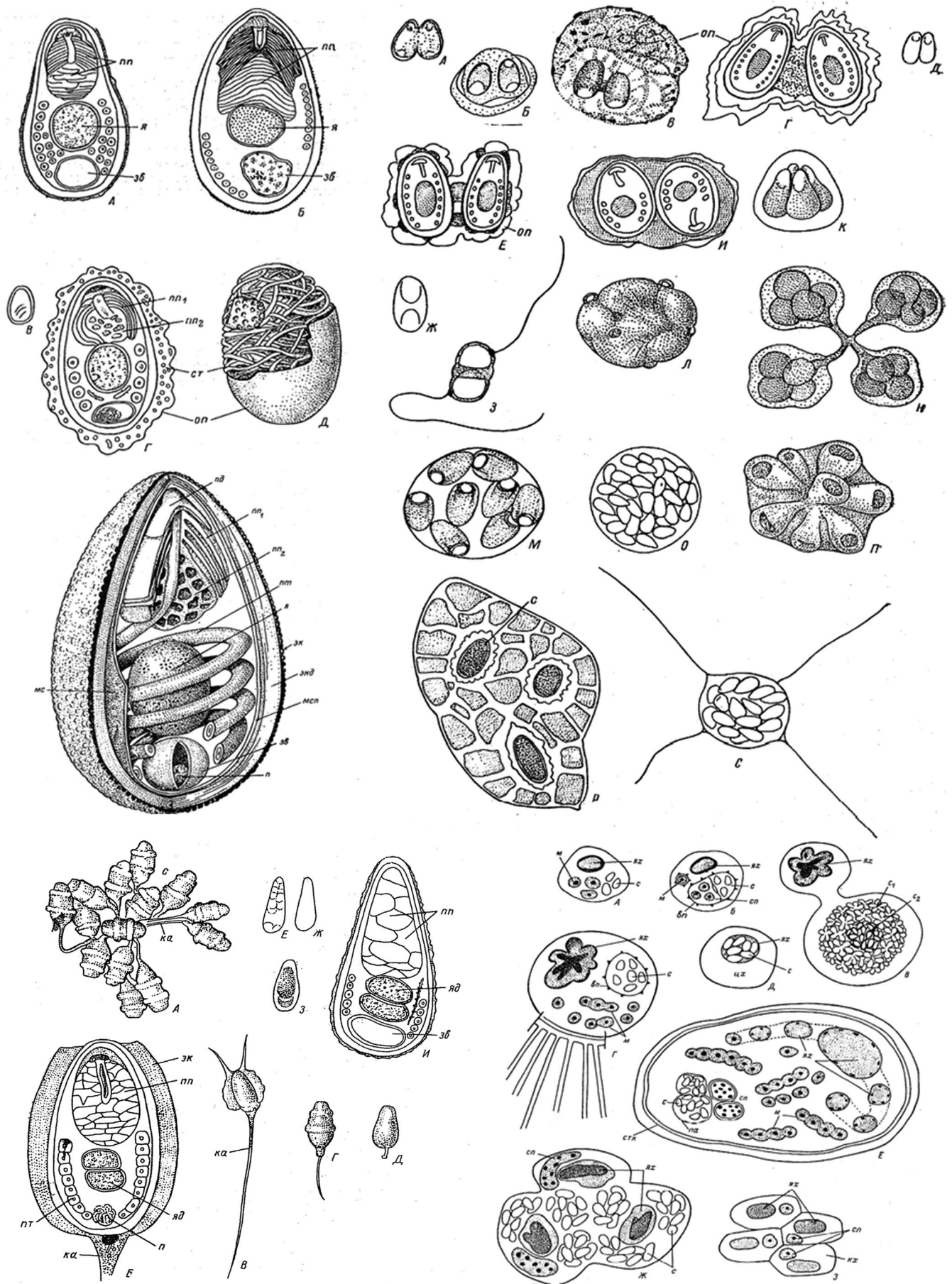
паразито-хозяинных отношений, а также разрабатываются прорывные подходы к подавлению возбудителей микроспоридиозов полезных насекомых – тутового шелкопряда и медоносной пчелы.

Таким образом, исследования, инициированные Ирмой Викторовной, нашли развитие в работах её учеников и продолжают по сей день, открывая новые перспективы фундаментальной биологии и практики защиты растений от вредных насекомых. Этапы развития микроспоридиологии, основные направления исследований и результаты научной деятельности своей научной школы Ирма Викторовна отразила в последней научной работе, опубликованной в год её 90-летия (Исси, 2020). Многие ученые во всем мире знают Ирму Викторовну Исси и бережно хранят её труды. В её честь названо два таксона микроспоридий: вид *Parathelohania issiae* Kilochitskiy и род *Issia* с типовым видом *Issia trichopterae* Weiser.

Тяжелые испытания, выпавшие на долю Ирмы Викторовны, закалили её дух. На всю жизнь она сохранила открытость души и принципиальность характера, неукоснительно следуя выработанным моральным правилам и прививая своим ученикам тягу к знаниям и жажду справедливости. История её жизни – предмет восхищения и источник вдохновения для тех, кто знал Ирму Викторовну лично. Светлая память об Ирме Викторовне Исси – великом ученом и замечательном человеке, навсегда сохранится в сердцах её коллег и друзей, а её научное наследие послужит ещё не одному поколению биологов.



Ирма Викторовна Исси в окружении своих учеников, 2013 г.



Иллюстрации Ирмы Викторовны Исси, характеризующие многообразие строения микроспоридий и реакций зараженных клеток хозяев (Исси, 1986)

Таксоны микроспоридий видового и родового ранга, (со)автором которых стала Ирма Викторовна Исси

- Amblyospora caspius* Pankova, Issi, Simakova 2000
A. burlaki Pankova, Issi, Simakova 2000
A. hybomitrae Bykova, Krylova, Sokolova, Issi 1989
Anncaliia Issi, Krylova, Nikolaeva 1993
Anncaliia azovica Tokarev, Sokolova, Vasilieva, Issi 2018
Berwaldia daphnia Simakova, Tokarev, Issi 2018
Campanulospora Issi, Radischcheva et Dolzhenko 1983
C. denticulata Issi, Radischcheva et Dolzhenko 1983
Cristulospora Khodzhaeva et Issi 1989
C. aedis Khodzhaeva, Issi 1989
C. cadyrovi Khodzhaeva, Issi 1989
C. sherbani Khodzhaeva, Issi 1989
Cylindrospora Issi, Voronin 1986
C. chironomi Issi, Voronin 1986
Evlachovaia Voronin, Issi 1986
E. chironomi Voronin et Issi 1986
G. bychowskyi Gasimagomedov, Issi 1970
G. dogieli Gasimagomedov, Issi 1970
G. shulmani Gasimagomedov, Issi 1970
G. sokolovi Issi, Lipa 1968
Janacekia wilhelmiae Khodzhaeva, Krylova, Issi 1990
Neoperezia Issi, Voronin 1979
N. chironomi Issi, Voronin 1979
Nosema grylli Sokolova, Selesnirov, Dolgikh, Issi 1994
N. hydraeciae Issi, Tkach 1975
N. loxostegi Issi, Simchuk, Radischeva 1980
Anncaliia (Nosema) meligethi (Issi, Radischeva 1979) Issi, Nikolaeva, Krylova 1993
N. phalerae Issi, Lipa 1968
N. syntomidis Issi 1979
Octosporea antiquae Issi, Radischcheva, Dolzhenko 1983
O. autumnalis Bykova, Issi 1991
O. deliae Issi, Radischcheva, Dolzhenko 1983
O. hybomitrae Bykova, Issi 1991
O. tabani Levtchenko, Issi 1973
Octotetraspora paradoxa Khodzhaeva, Krylova, Issi 1990
O. cincta Khodzhaeva, Krylova, Issi 1990
Parapleistophora Issi, Khodzhaeva, Krylova 1990
P. ectospora Khodzhaeva, Krylova, Issi 1990
Pleistophora aidarlovica Levtchenko, Issi 1973
P. carpocapsae Simchuk, Issi 1975
P. culicoidi Levtchenko, Issi 1973
P. hilobii Issi 1979
P. hybomitrae Bykova, Issi 1991
P. siluri Gasimagomedov, Issi 1970
P. tuberifera Gasimagomedov, Issi 1970
P. turgenica Levtchenko, Issi 1973
Pulicispora Vedmed, Krylova, Issi 1991
P. xenopsyllae Vedmed, Krylova, Issi 1991
Senoma Simakova, Pankova, Tokarev, Issi 2005
Senoma (Issia) globulifera (Issi, Pankova 1983) Simakova, Pankova, Tokarev, Issi 2005
Simuliospora Khodzhaeva, Krylova, Issi 1990
S. uzbekistanica Khodzhaeva, Krylova, Issi 1990
Stempellia captshagaica Levtchenko, Issi 1973
S. rubtsovi Issi 1968
Striatospora Issi, Voronin 1986
S. chironomi Issi, Voronin 1986
Tabanispora Bykova, Issi 1991
T. bacilifera Bykova, Issi 1991
T. hybomitrae Bykova, Issi 1991
Thelohania argyresthiae Issi, Lipa 1968
Th. culisetae Levtchenko, Issi 1973
Th. dasychirae Issi, Lipa 1968
Unikaryon oulemi Issi, Krylova, Morzhina, Sokolova 1998

Избранные научные труды Ирмы Викторовны Исси

- Гринфельд ЭК, Исси ИВ (1958) Роль жуков в опылении растений. *Ученые записки ЛГУ*. 240(16):145–159
 Исси ИВ, Масленникова ВА (1964) Влияние микроспоридиооза на диапаузу и выживаемость наездника *Apanteles glomeratus* (Hymenoptera, Braconidae) и капустной белянки *Pieris brassicae* (Lepidoptera, Pieridae). *Энтомологическое обозрение* 43(1):112–117
 Исси ИВ, Масленникова ВА (1966) Роль *Apanteles glomeratus* L. (Hymenoptera, Braconidae) в трансмиссии *Nosema polyvora* Blunck (Protozoa, Microsporidia). *Энтомологическое обозрение* 45(3):494–499
 Исси ИВ, Шульман СС (1967) О систематическом положении микроспоридий. *Паразитология* 1(2):151–157
 Исси ИВ (1968) *Stempellia rubtsovi* sp.n. (Microsporidia, Nosematidae) – паразит личинок кавказской мошки *Odagmia ornata*. *Acta Protozool* 6(30):347–354
 Исси ИВ (1971) О полиморфизме вида *Plistophora schubergi* Zw. 1927 и возможном пути видообразования в отряде микроспоридий. *Паразитология* 5(4):297–301
 Исси ИВ, Воронин ВН (1979) Современное состояние вопроса о двуспоровых родах микроспоридий. *Паразитология* 13(2):150–158
 Исси ИВ (1979) Микроспоридиооз большого соснового долгоносика *Hyllobius abietis* L. (Coleoptera, Curculionidae). *Зоологический журнал* 58(10):1596–1599
 Исси ИВ, Панкова ТФ (1983) Новый вид микроспоридии *Issia globulifera* из малярийного комара *Anopheles maculipennis*. *Паразитология* 17(3):189–194
 Исси ИВ, Воронин ВН (1985) Ультратонкое строение микроспоридии *Neoperezia chironomi* sp.n. на стадиях спорогонии. *Цитология* 2:142–147
 Исси ИВ (1986) Микроспоридии как тип паразитических простейших. Серия *Протозология* 10:6–135.
 Исси ИВ, Быкова ХИ, Крылова СВ, Соколова ЮЯ (1989) Микроспоридия *Ameson hybomitrae* sp.n. (Microsporidia, Perezidae) из слепней Карелии. *Паразитология* 23(1):66–74
 Исси ИВ, Кадырова МК, Пушкарь ЕН, Ходжаева ЛФ, Крылова СВ (1991) Микроспоридии мошек (определение и краткое описание видов мировой фауны). Ташкент: «ФАН». 123 С.
 Исси ИВ, Крылова СВ, Николаева ВМ (1993) Ультратонкое строение микроспоридии *Nosema meligethi* Исси и Радищева 1979, и обоснование нового рода *Anncaliia* g.n. *Паразитология* 27(2):127–133
 Исси ИВ, Воронин ВН, Соколова ЮЯ (2001) О паразитофорной вакуоли микроспоридий. *Паразитология* 35(1):45–59
 Исси ИВ, Панкова ТФ, Соколова ЮЯ (2001) Уточнение диагноза *Issia globulifera* Issi, Pankova 1983 (Microsporidia,

- Nosematidae) на основании данных по ультраструктуре микроспоридий. *Паразитология* 35(2):165–168
- Соколова ЮЯ, Исси ИВ (2001) Энтмопатогенные простейшие и особенности патогенеза протозойных заболеваний насекомых. В кн.: Глупов В.В. (ред) Патогены насекомых: структурные и функциональные аспекты. М.: Круглый год. 76–188
- Исси ИВ (2002) Паразитарные системы микроспоридий. Описание и вопросы терминологии. *Паразитология* 36(6):478–492
- Исси ИВ, Токарев ЮС (2002) Влияние микроспоридий на гормональное состояние насекомых-хозяев. *Паразитология* 36(5):405–421
- Исси ИВ, Воронин ВН (2007) Тип Microsporidia Микроспоридии. В кн.: Алимов АФ (ред) Руководство по зоологии. Протисты. 2. Санкт-Петербург: РАН. 994–1045
- Исси ИВ, Долгих ВВ, Токарев ЮС (2011) Можно ли называть спору микроспоридий покоящейся стадией? *Паразитология* 45(4):324–337
- Токарев ЮС, Исси ИВ (2018) Значение молекулярной филогении в современной систематике микроспоридий. *Микология и фитопатология* 52(1):5–21
- Исси ИВ (2020) Развитие микроспоридиологии в России. *Вестник защиты растений* 103(3):161–176. <https://doi.org/10.31993/2308-6459-2020-103-3-4972>
- Issi IV, Shulman SS (1968) The systematic position of Microsporidia. *Acta Protozool* 6(1):121–135
- Issi IV, Lipa JJ (1968) *Gurleya sokolovi* sp.n., a new parasite microsporidian of water mite *Limnochares aquatica* L. (Acarina, Hydrachnella) and a note on gregarine infection. *J Invertebr Pathol* 10(2) 165–175
- Dolgikh V, Sokolova Y, Issi I (1997). Activities of enzymes of carbohydrate and energy metabolism of the spores of the microsporidian, *Nosema grylli*. *J Euk Microbiol* 44(3):246–249
- Sokolova YY, Dolgikh VV, Morzhina EV, Nassonova ES, Issi IV, Terry RS, Ironside JE, Smith JE, Vossbrinck CR (2003) Establishment of the new genus *Paranosema* based on the ultrastructure and molecular phylogeny of the type species *Paranosema grylli* gen. nov., comb. nov. (Sokolova, Selezniev, Dolgikh, Issi 1994), from the cricket *Gryllus bimaculatus* Deg. *J Invertebr Pathol* 84(3):159–172. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2003.10.004>
- Simakova AV, Pankova TF, Tokarev YS, Issi IV (2005) *Senoma* gen. n., a new genus of microsporidia, with the type species *Senoma globulifera* comb. n. (syn. *Issia globulifera* Issi et Pankova, 1983) from the malaria mosquito *Anopheles messeae* Fall. *Protistology* 4(2):135–144
- Sokolova YY, Issi IV, Morzhina ES, Tokarev YS, Vossbrinck CR (2005) Ultrastructural analysis supports transferring *Nosema whitei* Weiser 1953 to the genus *Paranosema* and creation a new combination, *Paranosema whitei*. *J Invertebr Pathol* 90:122–126. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.06.009>
- Franzen C, Nassonova ES, Schoelmerich J, Issi IV (2006) Transfer of the members of the genus *Brachiola* (Microsporidia) to the genus *Anncaliia* based on ultrastructural and molecular data. *J Eukaryot Microbiol* 53(1):26–35
- Simakova AV, Tokarev YS, Issi IV (2009) *Pankovaia semitubulata* gen. et sp. n. (Microsporidia: Tuzetiidae) from nymphs of mayfly *Cloeon dipterum* (L.) (Insecta: Ephemeroptera) in West Siberia. *Eur J Protistol* 45(1):13–20
- Issi IV, Tokarev YS, Voronin VN, Dolgikh VV, Seliverstova EV, Pavlova OA (2010) Ultrastructure and molecular phylogeny of *Mrazekia macrocyclopi* sp. n. (Microsporidia, Mrazekiidae), a microsporidian parasite of *Macrocylops albidus* (Jur.) (Crustacea, Copepoda). *Acta Protozool* 49(1):75–84
- Tokarev YS, Voronin VN, Seliverstova EV, Dolgikh VV, Pavlova OA, Ignatieva AN, Issi IV (2010) Ultrastructure and molecular phylogeny of *Anisofilariata chironomi* gen. et sp. n. (Microsporidia: Terresporida) from *Chironomus plumosus* L. (Diptera: Chironomidae). *Parasitol Res* 107:39–46
- Tokarev YS, Voronin VN, Seliverstova EV, Pavlova OA, Issi IV (2010) Life cycle, ultrastructure and molecular phylogeny of *Crispospora chironomi* g.n. sp.n. (Microsporidia: Terresporida), a microsporidian parasite of *Chironomus plumosus* L. (Diptera: Chironomidae). *Parasitol Res* 107:1381–1389
- Issi IV, Tokarev YS, Seliverstova EV, Voronin VN (2012) Taxonomy of *Neoperezia chironomi* and *Neoperezia semenoviae* comb. nov. (Microsporidia, Aquasporidia): lessons from ultrastructure and ribosomal DNA sequence data. *Eur J Protistol* 48:17–29
- Tokarev YS, Voronin VN, Seliverstova EV, Grushetskaya TA, Issi IV (2012) Ultrastructure and molecular phylogenetics of *Helmichia lacustris*, a microsporidium with an uncoiled isofilar polar filament. *Parasitol Res* 110:1201–1208
- Tokarev YS, Malysh JM, Kononchuk AG, Seliverstova EV, Frolov AN, Issi IV (2015) Redefinition of *Nosema pyrausta* (*Perezia pyraustae* Paillot 1927) basing upon ultrastructural and molecular phylogenetic studies. *Parasitol Res* 114(2):759–761. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4272-3>
- Simakova AV, Tokarev YS, Issi IV (2018) A new microsporidium *Fibrillaspora daphniae* g. n. sp. n. infecting *Daphnia magna* (Crustacea: Cladocera) in Siberia and its taxonomic placing within a new family Fibrillasporidae and new superfamily Tubulinosematoidea (Opisthosporidia: Microsporidia). *Parasitol Res* 117(3):759–766. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5749-2>
- Sokolova YY, Issi IV, Voronin VN (2018) Annotated list of species of the Microsporidia described in the Former Soviet Union and Russia in 20th century (1967–2000). *Protistology* 12(1):12–37
- Tokarev YS, Sokolova YY, Vasilieva AA, Issi IV (2018) Molecular and Morphological Characterization of *Anncaliia azovica* sp. n. (Microsporidia) Infecting *Niphargogammarus intermedius* (Crustacea, Amphipoda) from the Azov Sea. *J Euk Microbiol* 65(3):296–307. <https://doi.org/10.1111/jeu.12473>
- Lipa JJ, Tokarev YS, Issi IV (2020) Ultrastructure, molecular phylogeny, and prevalence rates of *Alternosema bostrichidis* gen. nov. sp. nov. (Microsporidia, Terresporidia), a parasite of *Prostephanus truncatus* and *Dinoderus* spp. (Coleoptera, Bostrichidae). *Parasitol Res* 119(3):915–923

Редакция журнала "Вестник защиты растений" напоминает, что подача рукописей осуществляется через личный кабинет автора на сайте журнала по адресу

<https://plantprotect.ru>

Актуальные Правила для авторов доступны онлайн по адресу

<https://plantprotect.ru/index.php/vizr/about/submissions>

Editorial Office of the journal "Plant Protection News" reminds that manuscript submission is available at the Journal's webpage

<https://plantprotect.ru>

Guides for Authors are available at

<https://plantprotect.ru/index.php/vizr/about/submissions>

Научное издание

Индекс ПМ790

Подписано к печати 11 октября 2022 г.

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

Заказ

Индекс ПМ790