

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

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

В Е С Т Н И К
ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

PLANT PROTECTION NEWS

1(91) – 2017

Санкт-Петербург – Пушкин
2017

ВЕСТНИК ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

УДК 632

Научно-теоретический рецензируемый журнал

Основан в 1939 г.

Издание возобновлено в 1999 г.

Включен в Перечень рецензируемых научных изданий ВАК
как журнал, входящий в международную базу данных AGRIS

Учредитель Всероссийский НИИ 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

Отв. секретарь В.Г.Иващенко

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

А.Н.Власенко, академик РАН, СибНИИЗХим

Патрик Гроотаерт, доктор наук, Бельгия

Дзянь Синьфу, профессор, КНР

В.И.Долженко, академик РАН, ВИЗР

Ю.Т.Дьяков, дбн, профессор, МГУ

В.А.Захаренко, академик РАН, МНИИСХ

С.Д.Каракотов, чл.корр. РАН,

 ЗАО Щелково Агрохим

В.Н.Мороховец, кбн, ДВНИИЗР

В.Д.Надыкта, академик РАН, ВНИИБЗР

В.А.Павлюшин, академик РАН, ВИЗР

С.Прушински, дбн, профессор, Польша

Т.Ули-Маттила, профессор, Финляндия

Е.Е.Радченко, дбн, ВИР

И.В.Савченко, академик РАН, ВИЛАР

С.С.Санин, академик РАН, ВНИИФ

С.Ю.Синев, дбн, ЗИН

К.Г.Скрябин, академик РАН, “Биоинженерия”

М.С.Соколов, академик РАН, ВНИИФ

С.В.Сорока, ксxn, Белоруссия

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

О.С.Афанасенко,
академик РАН

И.А.Белоусов, кбн

Н.А.Белякова, кбн

Н.А.Вилкова, дсxn, проф.

Н.Р.Гончаров, ксxn

И.Я.Гричанов, дбн

В.Г.Иващенко, дбн, проф.

М.М.Левитин, академик РАН

Н.Н.Лунева, кбн

А.К.Лысов, ктн

Г.А.Наседкина, кбн

В.К.Моисеева (секр.), кбн

Н.Н.Семенова, дбн

Г.И.Сухорученко, дсxn, проф.

С.Л.Тютюрев, дбн, проф.

А.Н.Фролов, дбн, проф.

И.В.Шамшев, кбн

Редакция

И.Я.Гричанов (зав. редакцией), С.Г.Удалов, В.К.Моисеева

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

Email: vestnik@vizr.spb.ru

<http://vizr.spb.ru/>

© Всероссийский НИИ защиты растений (ВИЗР)

СОДЕРЖАНИЕ

Перспективы разработки биологических и биорациональных гербицидов А.О. Берестецкий	5
Иммунохимический анализ комплекса протеиназ клопа вредная черепашка <i>Eurygaster integriceps</i> Put., гидролизующих белки клейковины пшеницы Ал.В. Конарев, В.В. Долгих, И.В. Сендерский, А.В. Конарев, А.В. Капусткина, Л.И. Нефедова, Н.К. Губарева	12
Рекомбинантные одноцепочечные антитела как инструмент для выявления и изучения глютеинин-гидролизующих протеиназ клопа вредная черепашка (<i>Eurygaster integriceps</i> Put.) В.В. Долгих, А.А. Царев, И.В. Сендерский, С.А. Тимофеев, А.В. Конарев	21
Оценка возможности переноса Y вируса картофеля хищным клопом <i>Orius majusculus</i> Reuter (Hemiptera, Anthocoridae) и обыкновенной злаковой тлей <i>Schizaphis graminum</i> Rondani (Homoptera: Aphididae) И.М. Пазюк, Т.С. Фоминых, К.Д. Медведева	26
Распространение сорных растений в регионах (на примере республики Мордовия и Ленинградской области) Н.Н. Лунева, А.Н. Никольский, Д.В. Бочкарев	33
Перспективы применения гербицида Имазамокс Е.В. Болтухина, В.П. Чернышев, А.Е. Шешенев, С.Д. Каракотов	38
Хищные мухи в полевых агроценозах на северо-западе Нечерноземной зоны России А.М. Шпанев, С.В. Голубев, И.В. Шамшев, И.Я. Гричанов	42
Эффективность микробиологического препарата Бацикол против 28-точечной картофельной коровки <i>Henosepilachna vigintioctomaculata</i> Motsch. (Coleoptera, Coccinellidae) на Дальнем Востоке С.Д. Гришечкина, Т.К. Коваленко	48
Ареал и зона вредоносности сосудистого бактериоза капусты А.М. Лазарев, Е.Н. Мысник, А.Н. Игнатов	52
Феромониторинг кукурузного мотылька <i>Ostrinia nubilalis</i> Hbn. (Lepidoptera: Crambidae) в Краснодарском крае: динамика численности самцов и гусениц на посевах кукурузы А.Н. Фролов, И.В. Грушевая	55
<u>Краткие сообщения</u>	
Обзор фауны двукрылых энтомофагов семейства Hybotidae (Diptera) Краснодарского края Ю.К. Кустова	59
Динамика вылета и контроль качества трихограммы С.Я. Резник, Н.Д. Войнович	61

CONTENT

Prospects for development of biological and biorational herbicides A.O. Berestetskiy	5
Immunochemical analysis of Sunn pest <i>Eurygaster integriceps</i> proteinase complex hydrolyzing wheat gluten proteins A.I.V. Konarev, V.V. Dolgikh, I.V. Senderskiy, A.V. Konarev, A.V. Kapustkina, L.I. Nefedova, N.K. Gubareva	12
Recombinant single chain antibodies as implement for detection and studying <i>Eurygaster integriceps</i> proteinases hydrolyzing gluten V.V. Dolgikh, A.A. Tsarev, I.V. Senderskiy, S.A. Timofeev, A.V. Konarev.	21
Assessment of <i>Orius majusculus</i> (Hemiptera, Anthocoridae) and <i>Schizaphis graminum</i> (Homoptera: Aphididae) as possible vectors of potato virus Y I.M. Pazyuk, T.S. Fominykh, K.D. Medvedeva	26
Distribution of weed plants in regions (in Republic of Mordovia and Leningrad Region as examples) N.N. Luneva, D.V. Bochkarev A.N. Nikolskiy.	33
Prospects for application of Imazamox herbicide E.V. Boltukhina, V.P. Chernyshev, A.E. Sheshenev, S.D. Karakotov	38
Predatory flies in field agrocenoses of Northwest of Non-Chernozem zone of Russia A.M. Shpanev, S.V. Golubev, I.V. Shamshev, I.Ya. Grichanov	42
Efficacy of microbiological preparation Batsikol against <i>Henosepilachna vigintioctomaculata</i> (Coleoptera, Coccinellidae) in the Far East of Russia S.D. Grishechkina, T.K. Kovalenko	48
Area and harmfulness zones of Black Rot of cabbage A.M. Lazarev, E.N. Mysnik, A.N. Ignatov	52
Pheromone traps for monitoring the European corn borer <i>Ostrinia nubilalis</i> (Lepidoptera: Crambidae) in the Krasnodar Territory: dynamics of male number and larval density on maize fields A.N. Frolov, I.V. Grushevaya	55
<u>Brief Reports</u>	
Review of dipteran entomophages of Hybotidae (Diptera) family in Krasnodar Territory Yu.K. Kustova	59
Emergence dynamics and quality control in <i>Trichogramma</i> S.Ya. Reznik, N.D. Voinovich	61

УДК 632.954

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОРАЦИОНАЛЬНЫХ ГЕРБИЦИДОВ

А.О. Берестецкий

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Несмотря на зеленую революцию, связанную с появлением химических гербицидов, сорные растения и другая нежелательная растительность (инвазивные виды, наркотикосодержащие растения), остаются серьезной проблемой в растениеводстве. Это связано с появлением устойчивых к гербицидам форм сорных растений и запретом применения химических препаратов вблизи жилья и в органическом земледелии. Для решения этой проблемы разрабатываются микробиологические препараты (биогербициды) и биорациональные гербициды на основе природных соединений. В обзоре (преимущественно на основе литературы 2010–2016 гг.) рассмотрены вред систематического применения химических гербицидов, успехи разработки классической стратегии биологической борьбы с нежелательной растительностью, а также коммерческие и перспективные биологические и биорациональные гербициды.

Ключевые слова: сорные растения, инвазивная флора, биоконтроль, гербициды, биогербициды, биорациональные гербициды

Введение в проблему. Нежелательная растительность – прежде всего сорные и инвазивные виды растений – постоянный компонент антропогенных экосистем, требующий жесткого контроля, чтобы избежать накопления их длительно сохраняющихся семян в почве. Средние потери урожая от засоренности посевов колеблются около 10%, но зависят от культуры, внесения удобрений, погодных условий и иногда могут достигать до 50%. Причем при высокой засоренности посевов многие элементы растениеводческих технологий (внесение удобрений, использование высокопродуктивных сортов, фитостимуляторов и т.п.) оказываются практически бессмысленными. Поэтому объемы применения химических гербицидов (ХГ) в несколько раз превышают количество используемых в последнее время других средств защиты растений [Aktar et al., 2009; Cantrell et al., 2012; Говоров и др., 2015].

Несмотря на то что ассортимент действующих веществ ХГ достаточно широк, существует целый ряд проблемных растений, борьба с которыми неэффективна при использовании стандартных подходов. Так, для искоренения многолетних сорных растений (таких как бодяк щетинистый, осот полевой, вьюнок полевой) требуются многократные механическая обработка почвы (вспашка, боронование) и применение повышенных доз химических гербицидов. Еще сложнее технологии борьбы с паразитическими сорными растениями, которые дополнительно включают выведение и использование устойчивых сортов. С другой стороны, многие растения, особенно инвазивные заносные виды (например, амброзия полыннолистная, борщевик Сосновского, галинсога мелкоцветковая), растут на непахотных землях и вблизи жилья, что делает борьбу с ними весьма непростой задачей. Еще одной группой «проблемных» растений являются наркотикосодержащие виды (например, мак опийный и дикая конопля), уничтожение или значительное ухудшение товарного вида которых относительно безвредными для окружающей среды способами достаточно затруднительно.

Интенсивное применение ХГ может приводить к нежелательным последствиям: загрязнению почвы и сточных вод, накоплению их остатков в урожае [Aktar et al., 2009]. Так, во Франции из 15 пестицидов, выявленных в грунтовых водах и реках, большинство – гербициды [Cordeau et al., 2016]. В последнее время появляется статистически подтвержденная информация, что в районах интенсивно-

го применения пестицидов увеличено количество случаев болезни Альцгеймера [Yan et al., 2016]. Многие исследования показывают, что глифосат – наиболее применяемый в настоящее время гербицид – обладает генотоксическими и канцерогенными свойствами [Bakry et al., 2015; Cressey, 2015].

Еще одна очень серьезная проблема – появление резистентных к ХГ популяций сорных растений. Значительное их количество как раз наблюдается в тех странах, где гербициды много и активно применяют. В России эта проблема пока стоит менее остро. На 7-м Международном гербологическом конгрессе, проходившем в Праге в июне 2016 г. (автор статьи принимал в нем участие), эта проблема была отмечена как приоритетная. Это связано с большими трудностями в разработке ХГ с новыми механизмами действия. Представители некоторых агрохимических компаний утверждают, что в ближайшие 10 лет не стоит ждать новых препаратов, действующих на принципиально новые молекулярные мишени, что позволило бы бороться с резистентными видами. Поэтому приходится серьезно задумываться, как решать эту проблему в будущем, используя проверенные агротехнические приемы и новые продукты для борьбы с сорными растениями [Shaner, Beckie, 2014].

В связи с вышесказанным вполне понятно желание потребителей сельскохозяйственной продукции и ее производителей не только повысить эффективность действия ХГ, но в ряде случаев использовать пусть менее эффективные, но более безопасные альтернативы. Поэтому создание экологически малоопасных средств борьбы с нежелательной растительностью ведется во всех развитых странах мира. В качестве таких альтернатив являются сейчас биологический метод и биорациональные гербициды.

Классическая стратегия биологической борьбы с сорными растениями. Классическая стратегия предусматривает импорт эффективных, безопасных и специфичных фитофагов или фитопатогенов, способных к самостоятельному распространению из точек интродукции для подавления целевых заносных (инвазивных) видов растений. Поскольку в 20 веке проблема биологических инвазий была наиболее острой в Новом Свете (в частности, в США, Канаде, Австралии, Новой Зеландии), то и наиболее значительный прогресс в этом направлении достигнут в этих странах [McFadyen, 1998]. Так, в США предлагаются коммерческие продукты на основе насекомых-фитофагов для

борьбы с такими сорняками как: молочай острый, видами бодяка и чертополоха, зверобоем продырявленным, льнянкой обыкновенной и другими. Средняя цена одной особи – около 1 доллара [Bio-Control Products for 2016, электронный ресурс]. Успешной была интродукция некоторых видов ржавчинных грибов (преимущественно видов рода *Puccinia*) в США и Австралии для борьбы с сорными растениями из семейства сложноцветные [Evans, 2013]. Например, в исследованиях, выполненных в США, России, Новой Зеландии и Греции, оказалось возможным создание эпифитотий в популяциях бодяка полевого путем осеннего почвенного внесения телиоспор *Puccinia punctiformis*. В Новой Зеландии удалось заразить на опытных делянках в среднем до 70% растений, в РФ – до 30% [Berner et al., 2013].

Серьезное финансирование программ биологической борьбы с сорными растениями осуществляется сейчас в Австралии, где ежегодный урон от инвазивных видов достигает полумиллиарда долларов. В 2016 г. правительство Австралии и различные коммерческие организации выделили 13 млн долларов на проект, направленный на поиск организмов, сдерживающих численность десяти наиболее вредоносных видов растений: *Lycium ferocissimum*, *Cabomba* spp., *Vachellia nilotica*, *Sagittaria* spp., *Solanum elaeagnifolium*, *Conyza bonariensis*, *Sonchus arvensis*, *Bryophyllum delagoense*, *Sporobolus pyramidalis* и *Chrysanthemum leucanthemum* [Government funding announced for weed biocontrol R&D project, электронный ресурс]. В 2016 г. экологическое ведомство США (U.S. Department of the Interior) обозначило биологический метод борьбы с заносными сорными растениями как одно из наиболее экономически выгодных и приоритетных направлений исследований [Addressing the Needs of Classical Biological Control Programs, электронный ресурс]. Действительно, затраты на разработку классического биоконтроля возвращаются в виде экономической выгоды в соотношении примерно 1:27 [Hershenhorn et al., 2016].

Перспективы классической стратегии борьбы с сорными растениями серьезно рассматривают в Европейском Союзе [Shaw et al., 2016]. В 2005 г. завершился крупный трехгодичный научно-исследовательский проект «Giant Alien» по разработке биологического метода борьбы с гигантскими борщевиками (*Heracleum mantegazzianum*, *H. sosnowskyi* и *H. persicum*), на основе которого была выпущена брошюра «Практическое пособие по борьбе с гигантскими борщевиками», доступная на русском языке [Booy et al., электронный ресурс]. Один из последних (2013-2017) европейских проектов COST SMARTER [SMARTER, электронный ресурс] – это координационный проект (в котором участвует и автор этой статьи) по биологической борьбе с амброзией полыннолистной, в котором преимущественно изучается потенциальное применение ряда видов фитофагов, питающихся амброзией, в частности, жука-листоеда *Ophraella communa* [Müller-Schaefer et al., 2014].

В нашей стране относительно успешно был реализован лишь один «классический» проект: после тщательного отбора в 1968 г. в СССР был завезен амброзиевый листоед (*Zygogramma suturalis*) для борьбы с амброзией полыннолистной. В настоящее время этот фитофаг широко расселился в ареале распространения амброзии, но его значение в подавлении сорняка несущественно, чтобы снизить плотность популяции этого сорняка [Резник, 2009]. Од-

нако работы по внедрению новых насекомых-фитофагов продолжают [Esipenko, Zamotajlov, 2014; Есипенко и др., 2016], в которых надежды возлагаются на упомянутого выше листоеда *O. communa* и амброзиевую совку *Tarachidia candefacta*.

Gary Clewley с соавторами [Clewley et al., 2012], проанализировав 61 публикацию с 2001 по 2011 г., выявил, что несмотря на то, что число успешных проектов по интродукции естественных врагов сорных растений невелико по отношению к общему числу опубликованных работ, в среднем насекомые-фитофаги снизили высоту целевых растений на 28%, образование цветов и семян на 35 и 42%, плотность популяций нежелательной растительности на 56%, при этом разнообразие местной флоры увеличилось на 88%. Наиболее эффективными ограничителями численности сорных растений были жуки из семейств *Chrysomelidae* and *Curculionidae*. Несмотря на этот успех, классический биометод не всегда эффективен, нуждается в государственной поддержке и длительных предварительных исследованиях за рубежом (как правило, на родине целевого растения) для поиска, отбора и тестирования организмов, контролирующих численность заносных видов.

Биогербициды. Биогербицидами (БГБ) называют микробные препараты для борьбы с сорной растительностью, которые направлены на то, чтобы вызывать сильные локальные эпифитотии в популяциях сорных растений. Иногда к ним относят растительные или микробные экстракты с фитотоксическими свойствами, очищенные микробные фитотоксины, а также синтетические аналоги природных фитотоксических соединений. Эту группу препаратов я отношу к биорациональным химическим гербицидам (БХГ), которая будет рассмотрена в другом подразделе статьи. Промежуточное положение занимают биогербициды, действие которых обусловлено прежде всего фитотоксическими метаболитами, образуемыми их продуцентами.

В качестве действующего начала БГБ используют прежде всего фитопатогенные грибы, а также бактерии и вирусы [Harding, Raizada, 2015]. Этапы разработки микогербицидов (биогербицидов на основе грибного инокулюма), методы повышения их эффективности описаны нами ранее [Берестецкий, 1997; 2004; Берестецкий, Сокорнова, 2009]. Число успешных проектов по разработке БГБ не столь велико, как классических препаратов, но интерес частных компаний к ним выше [Ash, 2010]. К настоящему моменту зарегистрировано чуть более 10 биогербицидов, однако ни один из них широко не применяется. Да и не может применяться широко, поскольку большинство из них – селективные препараты, которые были разработаны для подавления конкретных проблемных видов сорных растений. Так, препарат на основе гриба *Phytophthora palmivora* был столь эффективен против *Morrenia odorata* во Флориде (США), что сорняк практически исчез на защищаемых плантациях цитрусовых, а с ним отпала необходимость применять биогербицид. Один из первых БГБ Collego® в виде растворимого порошка на основе *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*, разрешенный к применению в США в 1982 г., недавно был перерегистрирован под торговой маркой LockDown™, однако его применение ограничено в связи с небольшим спросом [Hershenhorn et al., 2016].

Интересно, что «пионерами» создания биогербицидов считают советских ученых [Wapshere, 1982]. Так, первый

советский БГБ на основе гриба *Alternaria cucurbitacidae* для борьбы с повиликой был разработан О.Л. Рудаковым в 1960-х годах [Рудаков, 1961], однако тогда он не выдержал испытания практикой. В 2005 г. в США был зарегистрирован аналог этого БГБ – препарат Smoulder G, действующим началом которого является *Alternaria destruens* [Bailey, 2014].

Относительно недавно в Канаде были зарегистрированы 2 биогербицида для борьбы с двудольными сорняками для использования на газонах. Один – на основе гриба *Sclerotinia minor* (препарат Sarritor), другой – на основе *Phoma macrostoma* (препарат «Phoma»). Если первый гриб – патоген широкого спектра двудольных растений, то штаммы второго гриба поражают преимущественно сложноцветные сорняки (одуванчик, бодяк, осот др.) и некоторые другие виды. Экспериментальные данные показывают, что «Phoma» уступает химическим гербицидами как по биологической эффективности, так и по спектру поражаемых сорняков [Smith et al., 2015]. Оба препарата, которые представляют собой «гранулы» обросшего грибным мицелием зерна, рекомендуются для применения и в частных хозяйствах на газонах [Quarles, 2010; Hershenthorn et al., 2016]. В последнее время регулярно появляются публикации об эффективных полевых испытаниях слабо специализированных патогенов – *Myrothecium verrucaria* и *M. roridum*. Так, БГБ на основе *Myrothecium verrucaria* испытывается в США для борьбы с кудзу – заносным бобовым растением; он особенно эффективен в сочетании со стандартными гербицидами, уничтожая до 90% этого сорняка и освобождая «место» для локальной флоры [Weaver et al., 2016]. *M. roridum* был эффективен для уничтожения водного гиацинта [Piyaboon et al., 2016].

Несколько биогербицидов было зарегистрировано для борьбы с нежелательной древесной растительностью. После того как было определено, что возбудитель млечного блеска *Chodrostereum purpureum* распространяется не далее, чем на 500 м от места внесения, штамм этого гриба, выделенный из яблони, коммерциализован в Европе и Канаде как микогербицид для уничтожения «сорных» деревьев (березы, осины, ольхи, терновника) [Evans, 2013]. В настоящее время его применение активно изучается и в Новой Зеландии с целью борьбы с видами ивы [Bellgard et al., 2014]. В 2013 г. прошел регистрацию БГБ Di-Bak Parkinsonia для борьбы паркинсонией шиповатой (*Parkinsonia aculeata*). Его выпускает компания Bio-Herbicides Australia. Препарат представляет собой капсулы, которые специальным прибором вводят в ствол деревьев [http://www.bioherbicides.com.au/bha-weed-control/parkinsonia].

Главным общеизвестным недостатком биопестицидов, включая БГБ, который все еще тормозит их широкое внедрение, является замедленное действие и/или недостаточная высокая биологическая эффективность по сравнению с ХГ. Следует также отметить ограниченные сроки хранения биопестицидов. Поэтому необходима разработка подходов, позволяющих повысить эффективность и технологичность потенциальных БГБ. Эти подходы могут быть различными и должны базироваться на глубоком понимании биоэкологии, биохимии и физиологии продуцентов биопрепаратов для борьбы с сорняками в связи с их патогенными свойствами и толерантностью к внешним стресс-факторам, также на знании современных биотехнологических процессов [Glare et al., 2016].

С развитием биотехнологий у БГБ появляется надежда на более широкое внедрение. Разрабатываются способы получения вирулентного и стресс-толерантного инокуляма на основе микросклероциев и мицелия грибов-продуцентов БГБ. Исследуются оригинальные способы внесения БГБ, например, при помощи различных систем подкормки и орошения. Создаются препаративные формы и их композиции, позволяющие более длительно хранить биопрепараты и повышающие их биологическую эффективность [Hershenthorn et al., 2016]. Наконец, появляется много экспериментальных данных, демонстрирующих, что некоторые – правильно подобранные сочетания БГБ и ХГ могут демонстрировать заметный синергетический эффект, что предполагает создание новой парадигмы борьбы с трудноискоренимыми сорными растениями: перспективу разработки смесей не только различных ХГ с различными механизмами действия, но ХГ с БГБ. Например, глифосат прекрасно сочетается с некоторыми БГБ [Cook et al., 2009; Bouette et al., 2014; Сокорнова и др., 2015], что значительно повышает эффективность и расширяет спектр действия этих смесей.

Биорациональные химические гербициды. Некоторых недостатков БГБ (неясные механизмы действия, зависимость активности от многих внешних факторов и других) могут быть лишены БХГ – препараты на основе природных фитотоксинов. Фитотоксические соединения – преимущественно вторичные метаболиты, которые образуют растения (эффект аллелопатии) и микроорганизмы (факторы патогенности) [Берестецкий, 1978, 2008]. Давно известно, что фитотоксическими свойствами обладают и некоторые первичные метаболиты, например, ряд аминокислот и жирных кислот [McCalla, Haskins, 1964]. К настоящему времени известны сотни природных фитотоксинов, и некоторые из них рассматриваются как природные гербициды или БХГ [Duke et al., 2014].

Биорациональные средства защиты растений, включая БХГ, можно условно разделить на 4 группы: 1) грубые экстракты, 2) индивидуальные природные соединения (или их смеси) различной степени очистки, 3) микробные препараты токсинного действия и 4) синтетические аналоги природных соединений.

В первую группу БХГ входят эфирные масла, экстракты, сидераты, отходы пищевого производства [Cai, Gu, 2016]. Так, в США в качестве БХГ используют кукурузный глютен, при разложении которого образуются фитотоксичные пептиды [Duke, Dayan, 2010]. Измельченная зеленая масса горчицы и соевая мука (в норме расхода около 1 и 4 т/га, соответственно) были эффективными для подавления сорняков в посевах шпината и брокколи в условиях органического земледелия [Shrestha et al., 2015]. Эфирные масла двух видов *Nepeta* (котовника) из сем. Яснотковые обладали ингибирующим действием на рост корней амброзии польнолистной [Dmitrović et al., 2015]. Сок полыни (*Artemisia absinthium*) и ромашки (*Matricaria chamomilla*) снижал биомассу мокрицы (*Stellaria media*) и накопление в сорняке хлорофилла [Кондратьев и др., 2016]. Созданы сорта овсяницы, которые являются суперпродуцентами тирозина, обладающим способностью к подавлению сорной растительности [Weston et al., 2005].

В качестве потенциальных БХГ рассматриваются растительные и микробные экстракты, обладающие фитотоксическими свойствами. Так, высокую гербицидную актив-

ность показал экстракт из бобового растения канавалия (*Canavalia ensiformis*) для подавления плюща (*Ipomoea grandifolia*) и коммелинии (*Commelina benghalensis*) в посевах сои [Mendez, Rezende, 2014]. Гербицидными свойствами обладали фенольные соединения (фумарпротоцеттаровая и протоцеттариевая кислоты) из экстрактов таллома лишайника *Cladonia verticillaris* [Tigre et al., 2015]. Однако, если растения – это возобновляемый, но ограниченный ресурс, то получение микробных препаратов возможно при помощи ферментации и более экономично. В Бразилии проведен широкий скрининг микроорганизмов, обладающих фитотоксическими свойствами, отобрано несколько изолятов (виды *Diaporthe*, *Phoma*), для которых разработаны технологии получения и применения культурального фильтрата в качестве БХГ [Brun et al., 2016; Souza et al., 2015; 2016]. Высокую фитотоксичность в отношении заносного в Индии сорняка *Parthenium hysterophorus* показал культуральный фильтрат гриба *Alternaria macrospora* МКР1 [Kaur et al., 2015].

Известны несколько коммерческих и экспериментальных БХГ из второй группы биорациональных средств защиты растений. Для борьбы с сорными растениями на приусадебных участках в США применяют уксусную кислоту [Dayan, Duke, 2010]. Компания Magrone BioInnovations (США) разработала препарат Opportune, действующим веществом которого является бактериальный фитотоксин такстолин А. Компания Syngenta предлагает БХГ Katoun® на основе пеларгоновой кислоты для использования в органическом земледелии [Cordeau et al., 2016]. Тенуазоновая кислота, образуемая некоторыми грибами из рода *Alternaria*, запатентована китайскими учеными и изучается как природный гербицид с оригинальным механизмом действия [Chen et al., 2015]. Разработкой БХГ на основе грибного токсина занимается в настоящее время и новозеландская биотехнологическая компания Biotelliga [http://www.biotelliga.com/research_detail.htm?research_id=10].

В третью группу можно отнести такие препараты как Organo-Sol®, Bioprotec Herbicide™, Kona™, которые состоят из лактобактерий, образующих фитотоксичные молочную и лимонную кислоты. Эти препараты рекомендуют в Канаде для подавления клевера на газонах [Cordeau et al., 2016]. Для борьбы с паразитическим сорняком стригой в США разработан биогербицид на основе *Fusarium oxysporum*, который является суперпродуцентом тирозина – аминокислоты, обладающей способностью к ингибированию развития стриги. Препарат успешно опробован в Африке [Nzioki et al., 2016]. Ранее подобная работа была проведена для возбудителя фузариозного увядания конопля, который секретировал в ризосферу валин – аминокислоту, которая обладает фитотоксическими свойствами для этого растения [Tiougebaev et al., 2000]. Действие биогербицида на основе почвенной бактерии *Enterobacter* I-3 обусловлено ингибированием образования гиббереллинов и синтеза аминокислот, что вызывало замедление роста сорных растений [Radhakrishnan et al., 2016].

Структура и механизмы действия природных соединений и фитотоксинов – важный источник идей для создания новых гербицидов [Dayan, Duke, 2014; Duke, Dayan, 2015]. Так, «гербицид № 1» – глифосат – это аналог глицина, а некоторые современные гербициды, являющиеся ингибиторами 4-гидроксифенилпируват-диоксигеназы (например, мезотрион, сулкотрион, темботрион), – аналоги природных

соединений из группы трикетонов, выделенные из различных растений [Kraemer et al., 2014; Duke, Dayan, 2015]. Некоторые штаммы бактерий *Streptomyces hygrosopicus* и *S. viridochromogenes* в культуре синтезируют биалофос – фитотоксин, который в растениях метаболизируется в более активное соединение – фосфинотрицин. Биалофос выпускается в Японии и имеет очень ограниченный рынок сбыта, однако синтетический фосфинотрицин успешно коммерциализован. В частности, под торговой маркой Баста его выпускает компания Bayer CropSciences [Duke, Dayan, 2011]. В настоящее время в связи с появлением устойчивых к гербицидам форм сорных растений активно изучаются механизмы действия различных природных фитотоксинов. Например, показано, что макроцидин А, образуемый грибом *Phoma macrostoma*, ингибирует синтез каротиноидов [Hubbard et al., 2015], тенуазоновая кислота – работу фотосистемы II растений [Chen et al., 2015]. Ведутся работы по разработке методов химического синтеза природных гербицидов и их аналогов. Так, из гриба *Stagonospora cirsii* в 2007 нами были выделен новый для науки фитотоксин – стагонолид А, являющийся сильным ингибитором роста корней [Yuzikhin et al., 2007], и уже в 2010 г. индийскими учеными был проведен полный синтез этого вещества [Prabhakar et al., 2010; Srihari et al., 2010]. При помощи биотехнологических подходов возможно повышение продуктивности штаммов по выходу гербицидных веществ [Полуэктова и др., 2016; Sica et al., 2016].

Часто задаваемые вопросы. Одними из часто задаваемых вопросов специалистов по защите растений являются: 1) действительно ли безопасны БГБ и БХГ, 2) не перейдут ли патогены сорных растений на культуры, 3) где можно приобрести «альтернативные» гербициды в РФ?

- То, что вещество выделено из природного материала совершенно не означает, что оно безопасное. Так, известна следующая очень поучительная история. Из гриба *Alternaria alternata* был выделен фитотоксин (AAL-токсин), который был высокотоксичным и избирательным для некоторых пасленовых сорных растений. Он был запатентован как природный гербицид. Однако, когда была установлена его химическая структура, выяснилось, что она очень похожа на строение фумонизина – опасного микотоксина, образуемого некоторыми грибами рода *Fusarium*. Токсикологические исследования подтвердили опасения, что AAL-токсин, так же как и фумонизин, обладает канцерогенными свойствами [Hoagland et al., 2007]. Недавние токсикологические исследования фитотоксинов гриба *Ascochyta caulina*, смесь которых рассматривается как про-гербицид для борьбы с марью белой, показали, что они обладают высокой токсичностью в отношении дафнии, тогда как другие протестированные организмы (водоросли, рыбы, дождевые черви) были слабо чувствительны к ним [Fumagalli et al., 2013]. Поэтому перед регистрацией необходимо тщательное изучение любого препарата.

- Как было уже показано выше, узкая специфичность – достоинство классических агентов биоконтроля, и, как правило, – недостаток БГБ. Поэтому специализацию фитопатогенных микроорганизмов – продуцентов БГБ определяют очень тщательно на научно подобранном наборе различных видов растений. Наиболее скрупулезным изучение специфичности должно быть для классических агентов биоконтроля, которые могут обладать способностью к быстрому распространению. Для этого изучаются системати-

ка и филогения растений-хозяев, проводится тщательное тестирование патогенности на родине заносного растения и в стране интродукции в условиях карантина. Без такого тестирования ввоз патогенов в страну даже с целью борьбы с опасными сорняками абсолютно невозможен. Что касается «местных» патогенов, выделенных из локальных видов сорных растений, то у микологов и фитопатологов накопилось достаточно данных о болезнях культурных растений, что вместе с экспериментальной оценкой круга растений-хозяев микроорганизмов-кандидатов дает возможность достаточно уверенно говорить о безопасности для культур. Проще говоря, если за много тысяч лет патоген не перешел с сорняка на культуру, то вряд ли это произойдет и сейчас. При нарушении условий применения БГБ поражение защищаемых культур возможно, но при неправильном использовании ХГ может возникнуть такая же проблема. Еще раз важно отметить, что некоторые зарегистрированные биогербициды являются патогенами культурных растений.

- На последний вопрос с сожалением отвечаем, что в РФ ни БГБ, ни БХБ не зарегистрированы (за исключением препаратов 4 группы). Однако исследования по их разработке ведутся в последние 5–10 лет в ВИЗР, ВНИИФ и ВНИИБЗР. В ВИЗРе в настоящее время реализуется проект, поддержанный Российским научным фондом (проект № 16-16-00085), направленный на разработку микогербицидов против бодяка полевого, осота полевого и борщевика Сосновского.

Разнообразие средств – разнообразие решений. Хорошо известно, что при лечении заболеваний человека и животных в терапии редко применяется одно лекарство. Существуют также личные предпочтения врачей и пациентов в выборе методов лечения. Поэтому и в защите растений, включая борьбу с сорными растениями, желательно иметь комплекс различных средств: от «народных» – до сильных химических. В различных странах уже предложены и разрабатываются БГБ и БХГ как дополнение или альтернатива ХГ в органическом земледелии. Не везде они

применяются широко. Например, в Европе биогербициды практически не используются, поскольку они, имея более низкую окупаемость и эффективность, проходят все этапы регистрации, что и химические пестициды [Czaja et al., 2015]. При этом недостаточно критериев оценки их качества. Еще многое предстоит сделать, чтобы биорациональные средства защиты растений стали полноправными продуктами на рынке [Glare et al., 2016]. Чтобы повысить эффективность борьбы с сорняками, можно создавать смеси БХГ, ХГ и БГБ. Например, экстракты растений часто действуют синергетически с эфирными маслами или химическими гербицидами так, что возможно снижение уровня применения последних [Farooq et al., 2011; Ihsan et al., 2015; O'Sullivan et al., 2015].

На рынке органического (приусадебного) сельского хозяйства РФ нет альтернативы нескольким ХГ (глифосат, клопиралид), расфасованным в мелкие упаковки. Между тем, это – приличный рынок, который стоит осваивать. С другой стороны, в качестве БХГ могут быть использованы отходы пищевой и фармацевтической промышленности, различных сельскохозяйственных и биотехнологических производств. Фитотоксические соединения могут быть обнаружены даже в отходах животноводства [Edney, Rizvi, 1996].

С развитием сельского хозяйства в РФ перспективность рынка биологических и биорациональных пестицидов будет расти. Создание научной базы и разработка технологий микробиологической борьбы с нежелательной растительностью должны помочь вывести БГБ на рынок и внедрить их в системы защиты растений. Такие исследования активно ведутся в ВИЗРе [Берестецкий и др., 2014, 2016; Гасич и др., 2012, 2016; Сокорнова, 2015]. Не только скрининг различных организмов на образование фитотоксических метаболитов [Берестецкий, 1978], но и современный метагеномный подход может быть использован для поиска гербицидных веществ, которые образуют плохо или вовсе не культивируемые в искусственных условиях организмы [Kao-Kniffin et al., 2013].

Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 16-16-00085).

Библиографический список (References)

- Берестецкий А.О. Фитотоксические свойства почвенных микроорганизмов. / Берестецкий А.О. Л.: Изд-во ВНИИХСХМ, 1978.-С. 27-34
- Берестецкий А.О. Проблемы и достижения в области биологической борьбы с сорными растениями при помощи фитопатогенных грибов / Берестецкий А.О. // Микол. и фитопатол. 2004. Т. 38, № 5. С. 1-15.
- Берестецкий А.О. Фитотоксины грибов: от фундаментальных исследований – к практическому использованию (Обзор) / Берестецкий А.О. // Прикладная биохимия и микробиология. 2008. т. 44, № 5, с. 501–514.
- Берестецкий А.О. Этапы исследований при разработке классической и биогербицидной стратегий биологической борьбы с сорными растениями / Берестецкий А.О. // Сельскохозяйственная биология. 1997. N 1. С. 3-15.
- Берестецкий А.О. Штамм гриба *Stagonospora cirsiis* Davis 1.41, обладающий гербицидной активностью против бодяка полевого / Берестецкий А.О., Кашина С.А., Сокорнова С.В. // 2014. Патент РФ № 2515899.
- Берестецкий А.О. Штамм *Rhizoglyphus sp.* - продуцент феосфериды А / Берестецкий А.О., Полуэктова Е.В., Сокорнова С.В., Токарев Ю.С. // 2016. Патент РФ № 2596928.
- Берестецкий А.О., Сокорнова С.В. Получение и хранение биопестицидов на основе микромицетов / Берестецкий А.О., Сокорнова С.В. // Микология и фитопатология. 2009. Том 43. Вып. 6. С. 1–17.
- Гасич Е. Л. Штамм гриба *Phoma ligulicola* var. *inoxydabilis* Voerema, обладающий микогербицидной активностью против польни обыкновенной / Гасич Е. Л., Хлопунова Л. Б., Ганнибал Ф. Б., Казарцев И. А. // 2016. Патент РФ № 2588470.
- Гасич Е.Л. Штамм гриба *Phoma complanata* (Tode) Desm. 1.40 (ВИЗР), обладающий микогербицидной активностью против борщевика Сосновского / Гасич Е.Л., Хлопунова Л.Б., Берестецкий А.О., Сокорнова С.В. // 2012. Патент РФ № 2439141.
- Говоров Д. Н. Применение пестицидов. Год 2014-й / Говоров Д. Н., Живых А. В., Шабельникова А. А. // Защита и карантин растений, 2015, N 4. С.12-13.
- Есипенко Л. П. Приемы уничтожения амброзии полыннолистной в посевах подсолнечника на территории Краснодарского края / Есипенко Л. П., Савва А. П., Тележенко Т. Н. // Научный журнал КубГАУ - Scientific Journal of KubSAU. 2016. №121. <http://ej.kubagro.ru/2016/07/pdf/69.pdf>
- Кондратьев М.Н. Потенциальные биогербицидные свойства некоторых лекарственных растений / Кондратьев М.Н., Ларикина Ю.С., Давыдова А.Н. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2016. Т. 19, N 6. С. 62–67
- Полуэктова Е.В. Оптимизация условий культивирования гриба *Rhizoglyphus sp.* ВИЗР 1.46 для получения фитотоксического метаболита / Полуэктова Е.В., Большакова К.П., Берестецкий А.О. // Вестник защиты растений. 2016. Т. 89, N 3. С. 134–135
- Резник С.Я. Факторы, определяющие границы ареалов и плотность популяций амброзии полыннолистной *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asteraceae) и амброзиевого листоеда *Zygogramma suturalis* F. (Coleoptera, Chrysomelidae) / Резник С.Я. // Вестник защиты растений. 2009, N 2. С. 20-28.
- Рудаков О. Л. Биометод уничтожения повилыки / Рудаков О. Л. // Защита растений от вредителей и болезней. 1961. № 6. С.23-24

- Сокорнова С.В. Способ борьбы с нежелательной травянистой растительностью класса Dicotyledones / Сокорнова С.В., Берестецкий А.О., Гасич Е.Л., Хлопунова Л.Б. // 2015. Патент РФ № 2543665.
- Addressing the Needs of Classical Biological Control Programs. [Электронный ресурс]: U.S. Department of the Interior. URL: https://www.doi.gov/sites/doi.gov/files/uploads/isac_biocontrols2016_white_paper.pdf (дата обращения: 05.03.2017).
- Aktar W., D. Sengupta, D., Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards // *Interdisc. Toxicol.* 2009. Vol. 2, N 1. P. 1–12.
- Ash G.J. The science, art and business of successful bioherbicides // *Biol. Control.* 2010. Vol. 52. P. 230–240
- Bailey K.L. The bioherbicide approach to weed control using plant pathogens // In: *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective.* In: Abrol, Dharam P. (Ed.), Elsevier (Academic Press), 2014. P. 245–266.
- Bakry F. A., Ismail S. M., Abd El-Atti M. S. Glyphosate herbicide induces genotoxic effect and physiological disturbances in *Bulinus truncatus* snails // *Pesticide Biochem. Physiol.* 2015. Vol. 123. P. 24–30.
- Bellgard S. E., Johnson V. W., Than D. J., Anand N., Winks C. J., Ezeta G., Dodd S. L. Use of the silverleaf fungus *Chondrostereum purpureum* for biological control of stump-sprouting, riparian weedy tree species in New Zealand // *Australasian Plant Pathol.* 2014. Vol. 43. P. 321–326
- Berner D., Smallwood E., Cavin C., Lagopodi A., Kashefi J., Kolomiets T., Pankratova L., Mukhina Z., Cripps M., Bourdôt G. Successful establishment of epiphytotic of *Puccinia punctiformis* for biological control of *Cirsium arvense* // *Biol. Control.* 2013. Vol. 67. 350–360
- Bio-Control Products for 2016. [Электронный ресурс]: Biological control of weeds. URL: <http://www.bio-control.com/products.php> (дата обращения: 05.03.2017).
- Воуо О., Сок М., Хансен С.О. и другие. Практическое пособие по борьбе с борщевиками. [Электронный ресурс]: Giant Alien. URL: http://www.giant-alien.dk/pdf/Russian%20manual_web.pdf (дата обращения: 05.03.2017).
- Boyette C. D., Hoagland R.E., Weaver M.A., Stetina, K. C. Interaction of the Bioherbicide *Myrothecium verrucaria* and Glyphosate for Kudzu Control // *Am. J. Plant Sci.* 2014. Vol. 5. P. 3943–3956. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.526413>
- Brun T., Rabuske J. E., Todero I., Almeida T. C., Junior J. J. D., Ariotti G., Confortin T., Arnemann J. A., Kuhn R. C., Guedes J. V. C., Mazutti M. A. Production of bioherbicide by *Phoma* sp. in a stirred-tank bioreactor // *3 Biotech.* 2016. Vol. 6, N 2. 230. doi: 10.1007/s13205-016-0557-9
- Cai X., Gu M. Bioherbicides in organic horticulture // *Horticulture.* 2016. Vol. 2. N 2. Paper 3.
- Cantrell C.L., Dayan F.E., Duke S.O. Natural products as sources for new pesticides // *J. Nat. Prod.* 2012. Vol. 75, N 6. P. 1231–1242.
- Chen S., Kang Y., Zhang M., Wang X., Strasser R. J., Zhou B., Qiang S. Differential sensitivity to the potential bioherbicide tenuazonic acid probed by the JIP-test based on fast chlorophyll fluorescence kinetics // *Environ. Exp. Bot.* 2015. Vol. 112. P. 1–15.
- Clewley G. D., Eschen R., Shaw R. H. Wright D. J. The effectiveness of classical biological control of invasive plants // *J. Applied Ecology.* 2012. Vol. 49. P. 1287–1295.
- Cook J. C., Charudattan R., Zimmerman T. W., Roskopf E. N., Stall W. M., MacDonald G. E. Effects of *Alternaria destruens*, Glyphosate, and Ammonium sulfate individually and integrated for control of dodder (*Cuscuta pentagona*) // *Weed Technol.* 2009. Vol. 23. P. 550–555
- Cordeau S., Triolet M., Wayman S., Steinberg C., Guillemin J.-P. Bioherbicides: Dead in the water? A review of the existing products for integrated weed management // *Crop Protection.* 2016. Vol. 87. P. 44–49.
- Cressey D. Widely used herbicide linked to cancer // *Nature.* 2015. doi:10.1038/nature.2015.17181.
- Czaja K., Goralczyk K., Strucinski P., Hernik A., Korcz W., Minorczyk M., Łyczewska M., Ludwicki J. K. Biopesticides – towards increased consumer safety in the European Union // *Pest Manag. Sci.* 2015. Vol. 71. P. 3–6
- Dayan F. E., Duke S. O. Natural products for weed management in organic farming in the USA // *Outlooks on Pest Management.* 2010. August. P. 156–160.
- Dayan F.E., Duke S.O. Natural compounds as next-generation herbicides // *Plant Physiol.* 2014. Vol. 166, N 3. P. 1090-105.
- Dmitrović S., Perišić M., Stojić A., Živković S., Boljević J., Nestorović Živković J., Aničić N., Ristić M., Mišić D. Essential oils of two Nepeta species inhibit growth and induce oxidative stress in ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) shoots in vitro // *Acta Physiol. Plant.* 2015. Vol. 37. 64. doi:10.1007/s11738-015-1810-2
- Duke S. O., Dayan F. E. Discovery of new herbicide modes of action with natural phytotoxins // In *Discovery and Synthesis of Crop Protection Products*; Maiefisch, et al.; ACS Symposium Series; Washington, DC: American Chemical Society. 2015. P. 79-92.
- Duke S. O., Dayan F. E. Modes of action of microbially-produced phytotoxins // *Toxins.* 2011. Vol. 3. P. 1038-1064.
- Duke S. O., Owens D. K., Dayan F. E. The Growing Need for Biochemical Bioherbicides // In: *Biopesticides: State of the Art and Future Opportunities* ACS Symposium Series, American Chemical Society. 2014. Vol. 117. P. 31–43
- Edney N. A., Rizvi M. Phytotoxicity of fatty acids present in dairy and hog manure // *Journal of Environmental Science and Health, Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* Volume 31- Issue 2, 1996 Pages 269-281
- Esipenko L.P., Zamotajlov A.S. Introduction of phytophagous insects for biological suppression of Common Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in Russia: Retrospective overview. *Vestnik zashchity rastenii.* 2014. N 2. P. 43–46.
- Evans H. C. Biological control of weeds with fungi // In: *The Mycota. Vol. XI. Agricultural Applications.* F. Kempken (Ed.) Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 2013. P. 145-183.
- Farooq M., Jabran K., Cheema Z. A., Wahid A., Siddique K.H.M. The role of allelopathy in agricultural pest management // *Pest Manag. Sci.* 2011. Vol. 67. P. 493–506
- Fumagalli P., Andolfi A., Avolio F., Boari A., Cimmino A., Finizio A. Ecotoxicological characterisation of a mycoherbicide mixture isolated from the fungus *Ascochyta caulina* // *Pest Manag. Sci.* 2013. Vol. 69. P. 850–856
- Government funding announced for weed biocontrol R&D project. [Электронный ресурс]: Rural Industries. URL: <http://www.rircd.gov.au/news/2016/04/15/government-funding-announced-for-weed-biocontrol-r-d-project> (дата обращения: 05.03.2017).
- Glare T. R., Gwynn R. L., Moran-Diez M. E. Development of Biopesticides and Future Opportunities // In: Travis R. Glare and Maria E. Moran-Diez (eds.), *Microbial-Based Biopesticides: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1477, New York: Springer Science+Business Media. 2016. P. 211–221.
- Harding D.P., Raizada M.N. Controlling weeds with fungi, bacteria and viruses: a review. *Front. Plant Sci.* 2015. Vol. 6. 659. doi: 10.3389/fpls.2015.00659
- Hershenhorn J., Casella F., Vurro M. Weed biocontrol with fungi: past, present and future // *Biocontrol Sci. Technol.* 2016. Vol. 26, N 10. P. 1313–1328
- Hoagland R E., Boyette C. D., Weaver M. A., Abbas H. K. Bioherbicides: research and risks // *Toxin Rev.* 2007. Vol. 26. P. 313–342
- Hubbard M., Hynes R.K., Bailey K.L. Impact of macrociclins, produced by *Phoma macrostoma*, on carotenoid profiles of plants // *Biol. Control* 2015. Vol. 89. P. 11–22
- Ihsan M. Z., Khaliq A., Mahmood A., Naeem M., El-Nakhlawy F., Alghabari F. Field evaluation of allelopathic plant extracts alongside herbicides on weed management indices and weed–crop regression analysis in maize // *Weed Biol. Manag.* 2015. Vol. 15. P. 78–86
- Kao-Kniffin J., Carver S., DiTommaso A. Advancing weed management strategies using metagenomic techniques // *Weed Science.* Vol. 61. P. 171–184
- Kaur M., Aggarwal N. K. & Dhiman R. Screening of phytotoxicity of *Alternaria macrospora* MKP1 against *Parthenium hysterophorus* L. // *Arch. Phytopathol. Plant Protection.* 2015. Vol. 48. P. 890-897
- Kraehmer H., van Almsick A., Beffa R., Dietrich H., Eckes P., Hacker E., Hain R., Strek H. J., Stuebler H., Willms L. Herbicides as Weed Control Agents: State of the Art: II. Recent Achievements // *Plant Physiol.* 2014. Vol. 166 1132-1148.
- MA500 Biological Herbicide. [Электронный ресурс]: Biotelliga. URL: http://www.biotelliga.com/research_detail.htm?research_id=10 (дата обращения: 05.03.2017).
- McCalla T. M., Haskins F. A. Phytotoxic substances from soil microorganisms and crop residues // *Bacteriol. Rev.* 1964 Vol. 28, No. 2, pp. 181-207
- McFadyen R. E. C. Biological control of weeds // *Ann. Rev. Entomology.* 1998. Vol. 43. P. 369-393
- Mendes I. D. S., Rezende M. O. O. Assessment of the allelopathic effect of leaf and seed extracts of *Canavalia ensiformis* as postemergent bioherbicides: A green alternative for sustainable agriculture // *J. Environmental Sci. Health. Part B.* 2014. Vol. 49, N 5. P. 374–380
- Müller-Schaerer H., Lommen S T E, Rossinelli M, Bonini M, Boriani M, Bosio G & Schaffner U (2014) *Ophraella communis*, the ragweed leaf beetle, has successfully landed in Europe: fortunate coincidence or threat? // *Weed Res.* Vol. 54, N 2. P. 109-119

- Nzioki H. S., Oyosi F., Morris C. E., Kaya E., Pilgeram A. L., Baker C. S., Sands D. C. Biocontrol on a toothpick: a readily deployable and inexpensive method for smallholder farmers // *Front. Plant Sci.* 2016. Vol. 7. 1121. doi: 10.3389/fpls.2016.01121
- O'Sullivan J. & Van Acker R. & Grohs R., Riddle R. Improved herbicide efficacy for organically grown vegetables // *Org. Agr.* 2015. Vol. 5 P. 315–322
- Piyaboon O., Pawongrat R., Unartngam J., Chinawong S., Unartngam A. Pathogenicity, host range and activities of a secondary metabolite and enzyme from *Myrothecium roridum* on water hyacinth from Thailand // *Weed Biol. Management.* 2016. Vol. 16, N 3. P. 132–144.
- Prabhakar P., Rajaram S., Reddy D.K., Shekar V., Venkateswarlu Y. Total synthesis of the phytotoxic stagonolides A and B // *Tetrahedron: Asymmetry.* 2010. T. 21. N 2. C. 216–221.
- Quarles W. Alternative herbicides in turfgrass and organic agriculture // *IPM Practitioner.* 2010. Vol. 32. N 5/6. P. 1–8.
- Radhakrishnana R., Park J.-M., Lee I.-J. Enterobacter sp. I-3, a bio-herbicide inhibits gibberellins biosynthetic pathway and regulates abscisic acid and amino acids synthesis to control plant growth // *Microbiol. Res.* 2016. Vol. 193. P. 132–139
- Shaner D. L., Beckie H. J. The future for weed control and technology // *Pest Manag. Sci.* 2014. Vol. 70. P. 1329–1339
- Shaw R., Schaffner U., Marchante E. The regulation of biological control of weeds in Europe – an evolving landscape // *EPPO Bull.* 2016. Vol. 46. P. 254–258.
- Shrestha A., Rodriguez A., Pasakdee S., Bañuelos G. Comparative Efficacy of White Mustard (*Sinapis alba* L.) and Soybean (*Glycine max* L. Merr.) Seed Meals as Bioherbicides in Organic Broccoli (*Brassica oleracea* Var. *Botrytis*) and Spinach (*Spinacea oleracea*) Production // *Communications in Soil Science and Plant Analysis.* 2015. Vol. 46, N 1. P. 33–46
- Sica V. P., Figueroa M., Raja H. A., El-Elimat T., Darveaux B. A., Pearce C. J., Oberlies N. H. Optimizing production and evaluating biosynthesis in situ of a herbicidal compound, mevalocidin, from *Coniolaria* sp. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2016. Vol. 43. P. 1149–1157
- SMARTER. [Электронный ресурс]: Sustainable management of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe. URL: ragweed.eu (дата обращения: 05.03.2017).
- Smith J., Wherley B., Reynolds C., White R., Senseman S., Falk S. Weed control spectrum and turfgrass tolerance to bioherbicide *Phoma macrostoma* // *Int. J. Pest Management.* 2015. Vol. 61, N 2. P. 91–98
- Souza A. R. C., Baldoni D. B., Lima J., Porto V., Marcuz C., Ferraz R. C., Kuhn R. C., Jacques R. J.S., Guedes J. V.C., Mazutti M.A. Bioherbicide production by *Diaporthe* sp. isolated from the Brazilian Pampa biome // *Biocatalysis Agric. Biotechnol.* 2015. Vol. 4. P. 575–578.
- Souza de A. R. C., Baldoni D. B., Lima J., Porto V., Marcuz C., Machado C., Ferraz R. C., Kuhn R.C., Jacques R. J.S., Guedes J. V.C., Mazutti M. A. Selection, isolation, and identification of fungi for bioherbicide production // *Braz. J. Microbiol.* 2016. doi: 10.1016/j.bjm.2016.09.004
- Srihari P., Rao G.M., Rao R.S., Yadav J.S. A Stereoselective aldol approach for the total synthesis of herbarumin I and stagonolide A // *Synthesis.* 2010. N 14. C. 2407–2412.
- Tigre R.C., Pereira E.C., da Silva N.H., Vicente C., Legaz M.E. Potential phenolic bioherbicides from *Cladonia verticillaris* produce ultrastructural changes in *Lactuca sativa* seedlings // *South African J. Botany.* 2015. Vol. 98. P. 16–25
- Tiourebaev K. S., Nelson S., Zidack N. K., Kaleyva G. T., Pilgeram A. L., T Anderson. W., Sands D. C. Amino Acid Excretion Enhances Virulence of Bioherbicides // *Proceedings of the X International Symposium on Biological Control of Weeds 4–14 July 1999, Montana State University, Bozeman, Montana, USA Neal R. Spencer [ed.].* 2000. P. 295–299 <https://www.invasive.org/publications/xsymposium/proceed/04pg295.pdf>
- Wapshere A.J. Biological control of weeds // In: *Biology and ecology of weeds* (W. Holzner and N. Numata, eds.) The Hague: Dr. W. Junk Publishers. 1982. P. 47–56
- Weaver M.A., Boyette C. D. & Hoagland R. E. Management of kudzu by the bioherbicide, *Myrothecium verrucaria*, herbicides and integrated control programmes // *Biocontrol Sci. Technol.* 2016. Vol. 26, N 1. P. 136–140
- Weed Control: Parkinsonia. [Электронный ресурс]: Bioherbicides Australia. URL: <http://www.bioherbicides.com.au/bha-weed-control/parkinsonia> (дата обращения: 05.03.2017).
- Weston L. A., Bertin C., Schroeder F. Bioherbicide from *Festuca* spp. // *US Patent N 8461085 B2.* 2005.
- Yan D., Zhang Y., Liu L., Yan H. Pesticide exposure and risk of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis // *Scientific Reports.* 2016. Vol. 6. 32222. doi:10.1038/srep32222.
- Yuzikhin O., Mitina G., Berestetskiy A. Herbicidal potential of stagonolide, a new phytotoxic nonenolide from *Stagonospora cirsi* // *J. Agric. Food Chem.* 2007. Vol. 55. N 19. P. 7707–7711.

Translation of Russian References

- Berestetskiy O.A. Phytotoxic properties of soil microorganisms. Leningrad: VNIISKHM, 1978. P. 27–34. (In Russian).
- Berestetskiy A.O. Problems and advances in biological control of weeds with plant pathogenic fungi. *Mikologiya i Fitopatologiya.* 2004. V. 38. N 5. P. 1–15. (In Russian).
- Berestetskiy A.O. A review of fungal phytotoxins: From basic studies to practical use. *Applied Biochemistry and Microbiology* 2008. Vol. 44, N 5. P. 453–465. (English translation).
- Berestetskiy A.O. Steps of investigations for development classical and bioherbicidal strategies of biological control of weeds. *Selskokhozyaistvennaya biologiya.* 1997. N 1. P. 3–15. (In Russian).
- Berestetskiy A.O., Kashina S.A., Sokornova S.V. Strain of fungus *Stagonospora cirsi* Davis 1.42 having herbicidal activity against Canada thistle. RU Patent N 2515899. (In Russian).
- Berestetskiy A.O., Poluektova E.V., Sokornova S.V., Tokarev Yu.A. Strain of *Paraphoma* sp., a producer of phaeosphaeride A. RU patent № 2596928. (In Russian).
- Berestetskiy A.O., Sokornova S.V. Production and stabilization of mycopenicidines. *Mikologiya i Fitopatologiya.* 2009. V. 43. N 6. P. 1–17. (In Russian).
- Gasich E. L., Khlopunova L.B., Gannbal Ph.B., Kazartsev I.A. Strain of fungus *Phoma ligulicola* var. *inoxidabilis* Boerema, having mycoherbicidal activity against *Artemisia vulgaris*. RU patent N 2588470. (In Russian).
- Gasich E. L., Khlopunova L.B., Berestetskiy A.O., Sokornova S.V. Strain of fungus *Phoma complanata* (Tode) Desm. 1.40 having mycoherbicidal activity against giant hogweed. RU patent N 2439141. (In Russian).
- Govorov D.N., Zhivykh A.V., Shabelnikova A.A. Use of pesticides. Year 2014. Zashchita i karantin rasteniy. 2015. N 4. P.12–13. (In Russian).
- Esipenko L.P., Savva A.P., Teleshchenko T.N. Methods of destroying common ragweed in sunflower crops in the Krasnodar region. *Scientific Journal of KubSAU.* 2016. N121. [Http://ej.kubagro.ru/2016/07/pdf/69.pdf](http://ej.kubagro.ru/2016/07/pdf/69.pdf). (In Russian).
- Kondratyev M.N., Larikova Yu.S., Davydova A.N. Potential bioherbicide properties of some medicinal plants. *Voprosy biologicheskoi, meditsinskoi i farmatsevticheskoi khimii.* 2016. V. 19. N 6. P. 62–67. (In Russian).
- Poluektova E.V., Bolshakova K.P., Berestetskiy A.O. Optimization of culture conditions for production of phytotoxic metabolite from *Paraphoma* sp. *VIZR* 1.46. *Vestnik zashchity rasteniy.* 2016. N 3. P. 134–135 (In Russian).
- Reznik S.Ya. Factors determining geographic ranges and population densities of common ragweed *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asteraceae) and ragweed leaf beetle *Zygogramma suturalis* F. (Coleoptera, Chrysomelidae). *Vestnik zashchity rasteniy.* N 2. P. 20–28.
- Rudakov O. L. Biological method for destroying dodder weed. *Zashchita rasteniy ot vreditel'ey i bolezney.* 1961. N 6. P. 23–24 (In Russian).
- Sokornova S.V., Berestetskiy A.O., Gasich E.L., Khlopunova L.B. A technique for control of undesirable vegetation belonging to the class Dicotyledones. Patent RU N 2543665. (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 1(91), p. 5–12

PROSPECTS FOR DEVELOPMENT OF BIOLOGICAL AND BIORATIONAL HERBICIDES

A.O. Berestetskiy

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

Despite the “green” revolution connected with appearance and use of chemical herbicides, weeds and undesirable vegetation (invasive species, narcotic plants) remain a serious problem for plant industry. This problem is related with herbicide-resistant forms of weeds and restrictions for use of chemical pesticides in organic agriculture and residential zones. Microbial and biorational herbicides are developed to solve the problem. In this review based mainly on the literature published between 2010

and 2017, problems caused with intensive application of chemical herbicides, advances in classical strategy of biological control of weeds, modern commercial and prospective biological and biorational herbicides are discussed.

Key words: weed; invasive flora; biocontrol; herbicide; bioherbicide; biorational herbicide.

Сведения об авторе

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608
Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация
Берестецкий Александр Олегович. Заведующий лабораторией
фитотоксикологии и биотехнологии, кандидат биологических наук,
e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru

Information about the author

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608,
St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation
Berestetskiy Aleksandr Olegovich, Head of Laboratory of phytotoxicology
and biotechnology, PhD in Biology,
e-mail: aberestetskiy@vizr.spb.ru

УДК 632.754:633.11:577.151:577.27

ИММУНОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОМПЛЕКСА ПРОТЕИНАЗ КЛОПА ВРЕДНАЯ ЧЕРЕПАШКА *EURYGASTER INTEGRICEPS* PUT., ГИДРОЛИЗУЮЩИХ БЕЛКИ КЛЕЙКОВИНЫ ПШЕНИЦЫ

Ал.В. Конарев¹, В.В. Долгих¹, И.В. Сендерский¹, А.В. Конарев², А.В. Капусткина¹,
Л.И. Нефедова¹, Н.К. Губарева²

¹Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

²Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург

Протеиназы слюнных желез вредной черепашки и других хлебных клопов, способные гидролизовать основные белки клейковины пшеницы – глиадины и глютенины, ответственны за ухудшение качества муки из поврежденного насекомыми зерна пшеницы. Ограничение активности данных протеиназ может являться одним из путей к снижению причиняемого вредителями ущерба, что обуславливает необходимость их изучения. Методами изoeлектрического фокусирования, электрофореза и иммуноблоттинга в сочетании с методами субстратных реплик оценена сложность состава и выявлен ряд особенностей функционирования комплекса протеолитических ферментов, участвующих как во внекишечном, так и внутрикишечном пищеварении клопа вредная черепашка. С помощью иммунохимических методов показано присутствие протеиназы GHP3, способной гидролизовать запасные белки зерна пшеницы, в секреторных гранулах клеток слюнных желез вредителя в форме неактивного профермента. Обработка белков слюнных желез клопа иммобилизованным трипсином приводит к отщеплению пропептидов и появлению активных форм GHP3 и других протеиназ. Полученные данные позволяют предположить наличие в слюнных железах и кишечнике специфичных трипсиноподобных протеиназ, осуществляющих активацию проферментов при питании клопа зерном пшеницы. Обсуждаются возможности использования результатов исследования для решения задач защиты растений.

Ключевые слова: вредная черепашка, слюнная железа, поврежденное зерно, протеиназа, GHP3, клейковина, глютенин, субстратная реплика, антитела к рекомбинантной протеиназе.

Одними из главных факторов вредоносности хлебных клопов, принадлежащих к семействам Scutelleridae, Pentatomidae, Lygaeidae и другим, являются протеолитические ферменты их слюнных желез, осуществляющие внекишечное переваривание запасных белков эндосперма зерна пшеницы и других злаков [Вилкова, Буриная, 1977; Sivri and Koksel, 2000; Every et al., 2005; Павлюшин и др., 2015]. Разрушение белков и углеводов внекишечными гидролазами клопов оказывает негативное влияние на всхожесть и другие характеристики зерна [Капусткина и Нефедова, 2013]. Однако основной ущерб качеству урожая пшеницы наносят протеолитические ферменты, остающиеся в следовых количествах в поврежденном зерне и сохраняющие активность после его созревания и даже длительного хранения [Salis et al., 2010; Конарев и др. 2013; Olanca et al., 2016]. На протяжении нескольких десятилетий в России и ряде стран Европы и Азии ведутся исследования протеиназ вредной черепашки *Eurygaster integriceps* Put. (Scutelleridae) и других хлебных клопов. Несмотря на то что в последние годы удалось выделить и охарактери-

зовать отдельные протеиназы у разных видов клопов, а также клонировать и экспрессировать в клетках микроорганизмов ряд кодирующих их последовательностей ДНК [Konarev et al., 2011; Yandamuri et al., 2014; Долгих и др., 2014; Конарев и др., 2014], целостное представление о составе и свойствах данных ферментов пока отсутствует. Одним из сдерживающих факторов в изучении протеиназ являются особенности их субстратной специфичности, что накладывает отпечаток на подбор или создание адекватных методов анализа. Знание свойств протеиназ хлебных клопов (ПХК) необходимо для разработки подходов к снижению причиняемого ими ущерба, в том числе при создании устойчивых сортов пшеницы. Среди возможных и безопасных для человека и окружающей среды путей ограничения активности протеиназ вредителей выделяют использование их белковых ингибиторов [Мосолов и Валуева, 2008; Jamal et al., 2012; Shamsi et al., 2016].

Особенность протеиназ хлебных клопов – низкая чувствительность к известным белковым ингибиторам из растений [Konarev et al., 2011]. Среди путей к ограничению

нежелательной активности протеиназ, разрабатываемых в медицине, можно выделить конструирование специфических ингибиторов на основе известных молекулярных структур или создание антител к ферментам, способных блокировать их связывание с субстратами. Учитывая высокую специфичность антител, их безопасность для человека и животных, а также возможность встраивания кодирующих их последовательностей в геном растений, такой подход может быть использован и для решения задач защиты растений. Кроме того, антитела к протеиназам могут служить эффективным инструментом для изучения самих ферментов и представлять интерес в качестве критериев диагностики повреждения семян растений сосущими вредителями. Уже показана возможность использования поликлональных антител к белкам слюнных желез

для диагностики повреждения зерен пшеницы вредной и маврской черепашками [Гаврилюк и др. 1975; Vaccino et al., 2016] или семян сосны клопом *Leptoglossus corculus* Say (Coreidae) [Lait et al., 2003]. Следует отметить, что в данных работах не определялись природа и функции антигенов. Между тем, использование антител, специфичных к пищеварительным протеиназам насекомых, могло бы расширить возможности диагностики. Недостаточно изученными остаются также процессы синтеза и секреции протеиназ клопов при питании зерном.

Задачей работы было продолжить начатое ранее [Konarev et al., 2011, Долгих и др., 2014; Конарев и др., 2014] изучение состава и свойств протеиназ слюнных желез вредной черепашки с помощью иммунохимических и других методов анализа.

Материал и методы

Зерно пшеницы, поврежденного вредной черепашкой и другими клопами рода *Eurygaster* Latr., получено из Саратовской области (образец мягкой пшеницы сорта Джангаль, 2009 г.) и других регионов России, а также Турции (образец твердой пшеницы сорта Ege-88, 2004). Неповрежденные зерна использовались в качестве контроля.

Слюнные железы и кишечники выделяли из имаго вредной черепашки [Konarev et al., 2011], полученных из различных регионов Поволжья и Северного Кавказа.

Белковые фракции, содержащие протеиназы, экстрагировали из размолотых поврежденных зерен 0.01% раствором Triton X-100 (1:5) в течение 20 мин. Для изофокусирования (ИЭФ) препараты концентрировали осаждением в 4-кратном объеме ацетона с последующим растворением осадка в 0.01% Triton X-100 в объеме, эквивалентном весу зерна.

Слюнные железы от 10 особей гомогенизировали с 50 мкл 1% CHAPS и центрифугировали. Надосадочную жидкость хранили при -20°C с 50% глицерином. Для обработки белков слюнных желез трипсином использовали фермент, иммобилизованный на полиакриламидном геле Trypsin Enzygel (Boehringer Mannheim). Инкубирование белковых экстрактов с трипсином вели в 0.02 М трис-HCl буфере pH 8.5. 1 мг сухого геля добавляли к 30 мкл экстракта с добавленным до концентрации 20 мМ трис-HCl буфером и инкубировали при 37°C от 0.5 до 16 часов.

Рекомбинантную протеиназу rGHP3e1 получали методом гетерологической экспрессии в бактериях [Долгих и др., 2014] препарата кДНК, кодирующего зрелый фермент изоформы 3 гидролизующей глютеинин протеиназы черепашки (GHP3; GenBank: NM579787.1) [Konarev et al., 2011]. Активные рекомбинантные формы rGHP3p1 и rGHP3p2 экспрессировали в клетках дрожжей *Pichia pastoris* [Долгих и др., 2014].

Поликлональные антитела получали иммунизацией кроликов препаратом рекомбинантной протеиназы rGHP3e1, как описано ранее [Долгих и др., 2014], а также иммунизацией мышей гомогенатами слюнных желез. Создание библиотеки рекомбинантных антител к протеиназе rGHP3e1, отбор рекомбинантных scFv-фрагментов антител к rGHP3e1 и наработка scFv-фрагментов путем гетерологической экспрессии в бактериях *E. coli* описаны в статье Долгих и др. [2017] в этом же выпуске журнала.

Для иммунофлуоресцентного анализа слюнных желез имаго клопов фиксировали в 4% параформальдегиде на PBS (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na₂HPO₄, 1.76 мМ KH₂PO₄, pH 7.4), инкубировали в 30% растворе сахарозы на PBS и замораживали в жидком азоте. Поперечные срезы толщиной 20 мкм через грудной отдел насекомых получали при помощи криотома Microm HM 520. В дальнейшем криосрезы блокировали в 1% растворе BSA на ТТБС (50 мМ Трис-HCl, pH 7.4, 150 мМ NaCl, 0.05% Tween-20), инкубировали с кроличьей антисывороткой к протеиназе rGHP3e1 в течение ночи при температуре 4°C, от-

мывали ТТБС и инкубировали с антикроличьим флуоресцентным конъюгатом Alexa Fluor546 (Life Technologies) в течение 2 часов. Готовые препараты просматривали на флуоресцентном микроскопе Carl Zeiss AxioImager M1.

Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) белков проводили в пластинах 5% полиакриламидного геля (ПААГ) со смесью амфолин с конечным диапазоном pH от 5 до 11 на приборе Multiphor II (LKB) при расстоянии между электродами 10 см или в пластинах Phast Gel pH 5–8 на приборе PhastSystem (Pharmacia) при расстоянии между электродами 5 см [Конарев и Фомичева, 1991; Konarev and Lovegrove, 2012]. При фракционировании препаратов протеиназ на гель в области анода с помощью бумажных полосок наносили по 0.2–3 мкл препаратов анализируемых белков. После ИЭФ протеиназы выявляли с помощью двух вариантов метода субстратной реплики. Один основан на гидролизе слоя растворимой в уксусной кислоте фракции глютеина, закрепленной на пластиковой подложке [Конарев и др. 2013], другой – на гидролизе фракции белков клейковины, растворимых в 70% этаноле. Электрофорез белков с додецилсульфатом натрия в полиакриламидном геле (ДСН-ПААГЭ) проводили в пластинах гомогенных 12% или градиентных (8–25 и 10–15%) полиакриламидных гелей с последующим окрашиванием красителями Кумасси (R-250 или G-250).

Для проведения ДСН-ПААГЭ и иммуноблоттинга пробы белков смешивали с равным объемом 125 мМ Трис-HCl буфера, содержащего 4% ДСН, 10% 2-меркаптоэтанола, 20% глицерина и инкубировали в течение 10 мин при 95°C. Белки разделяли с помощью ДСН-ПААГЭ в 12% геле с использованием камеры Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, США) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану того же производителя с помощью вкладыша для блоттинга Mini-Trans-Blot® согласно инструкции. Мембраны блокировали в течение часа в присутствии ТТБС, 1% БСА и инкубировали с разбавленными тем же раствором 1:50 scFv-фрагментом или 1:1000 поликлональными антителами (кроличьими или мышинными иммунными сыворотками к rGHP3e1) в течение ночи при 4°C. После отмывки в ТТБС мембраны инкубировали 2 часа при комнатной температуре с разведенными 1:4000 в ТТБС антителами, специфичными к IgG кролика или мыши и конъюгированными с пероксидазой хрена (Bio-Rad, США). Мембраны, обработанные scFv-фрагментом, перед инкубацией с пероксидазными конъюгатами были также обработаны моноклональными антителами к полигистидиновой последовательности, разведенными 1:2000 в том же растворе. После очередной отмывки в ТТБС мембрану инкубировали в свежеприготовленном растворе для проявления пероксидазной реакции, содержащем ТБС, 15% метанол, 0.05% 4-хлоро-1-нафтол (Sigma, США) и 0.02% H₂O₂.

Для проведения иммуноблоттинга в сочетании с ИЭФ после разделения на гель накладывали нитроцеллюлозную мембрану, которую затем заменяли субстратной репликой. Мембрану обра-

батывали антителами и проявляли также как и после ДСН-ПААГЭ.

Для анализа способности протеиназ клопов гидролизовать различные фракции запасных белков к 1 мг муки из неповрежденного зерна сорта Gaspard добавляли 10 мкл раствора испы-

туемого препарата фермента с различной степенью разведения в 20 мМ трис-НСl буфере рН 8.5 и инкубировали смесь в течение 16 часов при 37°C. После центрифугирования 0.9 мкл надосадочной жидкости наносили на гель для ДСН-ПААГЭ.

Результаты и их обсуждение

Слюнные железы клопа вредная черепашка, а также поврежденные им зерна пшеницы содержат сложный набор протеолитических ферментов, что видно из результатов ИЭФ белков насекомого и зерна с последующим выявлением протеиназ по активности с помощью субстратных реплик (рис. 1А, 2А, 4Г). Протеиназы различаются как по ИЭТ (рI) компонентов, так и по субстратной специфичности. Нейтральные протеиназы (НП) с ИЭТ в интервале приблизительно от 6 до 7.5 единиц рН, по-видимому, играющие ведущую роль в гидролизе белков клейковины, не действовали на животный белок желатин. Щелочные протеиназы (ИЭТ от 7.5 до 10) гидролизовали как запасные белки, так и желатин (рис. 3Г). Однако оставалась неясной степень соответствия протеиназ, выявляемых в поврежденном зерне и в слюнных железах. Кроме того, были выявлены существенные отличия по протеолитической активности между образцами слюнных желез, собранными в разных регионах и в разные годы при, в целом, относительно невысоком ее уровне. Так, интенсивность полос в спектре протеиназ, выделенных из слюнных желез клопов, собранных в Краснодарском крае в 2013 году (рис. 1, дорожка 3), существенно ниже, чем в спектрах ферментов из препаратов того же происхождения 2015 года (дорожка 5) или препаратов из Саратовской области 2006 года (дорожка 4) протеиназ. Это обстоятельство требовало объяснения, поскольку для осуществления внекишечного пищеварения и усвоения белков зерна клопам необходимы большие количества активных протеиназ. Известно, что уровень секреции и состав пищеварительных ферментов у насекомых определяется наличием и типом пищи. В отношении КВЧ оставалось невыясненным, происходит ли синтез соответствующих протеиназ в слюнных железах

непосредственно при питании на зерне или осуществляется мобилизация их возможных запасов.

Для решения данного вопроса был применен метод иммуноблоттинга. Ранее нами из поврежденного клопом зерна была выделена протеиназа с молекулярной массой 28 кДа. Соответствующая ей кДНК была клонирована [Konarev et al., 2011], а затем экспрессирована в клетках микроорганизмов [Конарев и др., 2014; Долгих и др., 2014]. На форму, экспрессированную в клетках бактерии *E.coli* (rGHP3e1), путем иммунизации кроликов были получены поликлональные антитела [Долгих и др. 2014]. Позднее на основе вариабельных фрагментов иммуноглобулинов мышей, иммунизированных данной рекомбинантной протеиназой, была сконструирована библиотека одноцепочечных антител (scFv-фрагментов) и отобрано мини-антитело, специфичное к изучаемому ферменту [Долгих и др., 2017]. Белки, выделенные из неповрежденного и поврежденного зерна пшеницы (рис.1 дорожки 1 и 2), трех образцов слюнных желез (дорожки 3–5), а также кишечника клопов (дорожка 6) были разделены методом ИЭФ. С гелей были сняты реплики на нитроцеллюлозные мембраны, а затем на гели наложили субстратные реплики с запасными белками зерна и инкубировали их до выявления протеиназ. Нитроцеллюлозные мембраны были обработаны поликлональными антителами к протеиназе rGHP3e1 (рис. 1В) или выделенным scFv-фрагментом (рис. 1Г). В ходе эксперимента было показано, что оба варианта антител не реагировали с белками неповрежденного и поврежденного зерна, но взаимодействовали с белками слюнных желез, причем интенсивность окраски компонентов спектров белков всех трех образцов слюнных желез была сопоставимой (рис. 1В, Г, дорожки 3–5), в отличие от спектров протеиназ, выделен-

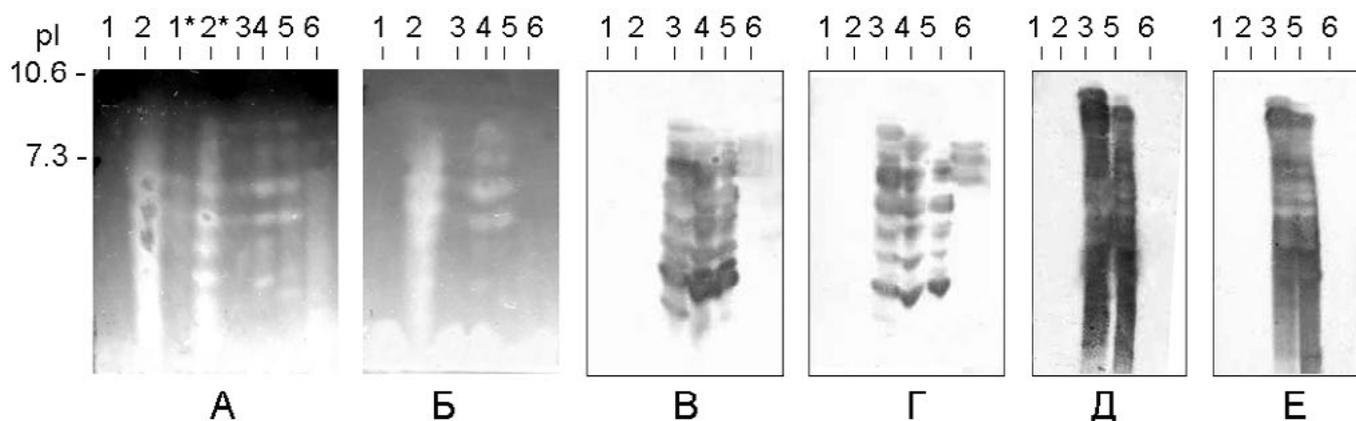


Рисунок 1. Анализ протеолитической активности и иммунохимической специфичности фракций белков вредной черепашки и поврежденного зерна, разделенных изоэлектрическим фокусированием.

Дорожки 1 и 2 – белковые экстракты неповрежденного и поврежденного зерна сорта Eg-88; 1* и 2* – слабо поврежденное и сильно поврежденное зерно сорта Джангаль; 3–5 – слюнные железы взрослых особей клопов, собранных на созревающей пшенице летом 2013, 2015 (Краснодарский край) и 2006 (Саратовская область) гг.; 6 – кишечника клопов, Саратовская область (2006 г.). А. После ИЭФ белков на гель наложена субстратная реплика и выявлены протеиназы (контроль). Б и В. После ИЭФ с геля снята реплика на нитроцеллюлозную мембрану (В), а затем на гель наложена субстратная реплика (Б). Г. Нитроцеллюлозная реплика с геля, аналогичного Б. Д и Е – нитроцеллюлозные реплики с гелей с экстрактами № 1, 2, 3, 5 и 6. Нитроцеллюлозные мембраны обработаны поликлональными антителами кролика к рекомбинантной протеиназе rGHP3e1 (В), scFv-фрагментами антител к rGHP3e1 (Г) и поликлональными антителами кролика и мыши к гомогенату слюнных желез клопа (Д и Е).

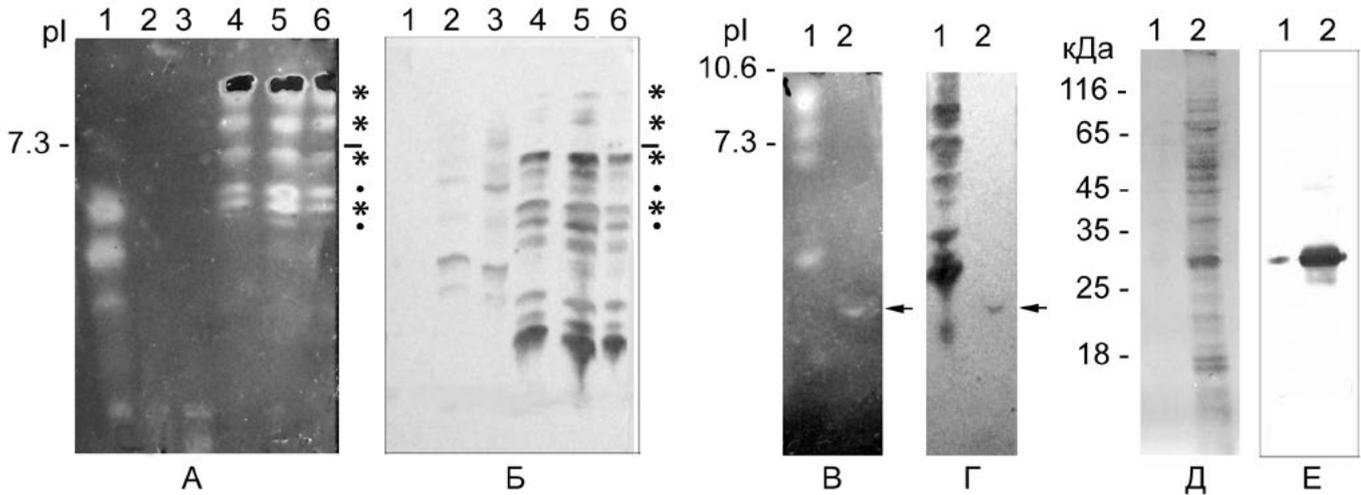


Рисунок 2. Анализ протеолитической активности и иммунохимической специфичности фракций белков слюнных желез вредной черепашки и поврежденного зерна, разделенных изоэлектрическим фокусированием (А-Г) и ДСН-ПААГЭ (Д-Е). Протеиназы выявлены глютеиновыми репликами (А и В), нитроцеллюлозные мембраны обработаны поликлональными антителами к рекомбинантной протеиназе гGHP3e1 (Б, Г и Е), белки окрашены красителем Понсо R-250 (Д).
 А и Б. ИЭФ в геле с амплинами рН 5–8. Дорожка 1 – белки зерна, поврежденного вредной черепашкой; 2 и 3 – экстракты кишечника черепашки, 4–6 – экстракты слюнных желез.
 «*» и «.» – близкие по рI компоненты на глютеиновой реплике и нитроцеллюлозной мембране.
 В и Г. ИЭФ в Phast-геле рН 5–8. 1 – экстракт слюнных желез; 2 – рекомбинантная протеиназа гGHP3p1. Позиции протеиназы указаны стрелками.
 Д и Е. ДСН-электрофорез в 12% ПААГ. 1 и 2 – экстракт слюнных желез.
 На дорожку 1 нанесено в 20 раз меньше экстракта, чем на дорожку 2.

ных из тех же образцов (рис. 1Б, дорожки 3–5). Антитела обоих типов реагировали также с рядом компонентов белков кишечника (рис. 1В, Г, дорожка 6). Менее четкие спектры протеиназ на реплике Б (рис. 1) по сравнению с репликой А, наложенной непосредственно после ИЭФ белков и использованной для сравнения, объясняются тем, что она была получена после снятия нитроцеллюлозной реплики В, что привело к снижению концентрации белков в геле и некоторой размытости полос. В свою очередь, проявление аналогичных нитроцеллюлозных реплик поликлональными антителами к гомогенату слюнных желез не выявило каких-либо антигенов в поврежденных зернах (рис. 1Д, Е, дорожка 2) или кишечнике клопов (рис. 1Д, Е, дорожка 6), в отличие от белков самих слюнных желез (рис. 1Д, Е, дорожки 3, 5).

Фракционирование белков с более высоким разрешением предоставляет лучшую возможность для сопоставления спектров протеиназ слюнных желез, выявленных по активности к глютеинам зерна, использованным в субстратной реплике (рис. 2А), со спектрами компонентов антигенов, содержащихся в слюнных железах и реагирующих с поликлональными антителами к гGHPe1 (рис. 2Б). Очевидно, что, хотя некоторые компоненты на субстратной и нитроцеллюлозной репликах совпадают (отмечены на рисунке звездочками), многие компоненты активных протеиназ и антигенов отличаются между собой по ИЭТ (рис. 2А, Б, дорожки 3–6). Антигены, распознаваемые антителами к гGHPe1, присутствовали и в спектрах белков кишечника (рис. 2А, дорожки 2 и 3), но не выявлялись в белках поврежденного зерна (рис. 2А, дорожка 1). Поликлональные антитела к гGHP3e1 реагировали с компонентом рекомбинантной протеиназы гGHP3p1, экспрессированной в дрожжах (рис. 2 В, Г, дорожка 2), а также с рекомбинантной протеиназой гGHP3p2. Использование данных антител в сочетании с ДСН-ПААГЭ показало от-

носительно высокое содержание соответствующего антигена в спектре белков слюнных желез (рис. 2Д и 2Е).

По всей видимости, данный фермент накапливается в значительных количествах в слюнных железах клопа в виде секреторных гранул. Иммунофлуоресцентное окрашивание слюнных желез КВЧ (фрагментов поперечных срезов имаго клопа на уровне груди) с использованием поликлональных антител кролика к рекомбинантной протеиназе гGHP3e1 и антикроличьего флуоресцентного конъюгата в качестве вторичных антител выявило наличие небольших светлых округлых структур, по-видимому соответствующих секреторным гранулам в клетках желез (рис. 3).

Ранее нами было установлено, что протеиназа GHP3 синтезируется в слюнных железах вредной черепашки в

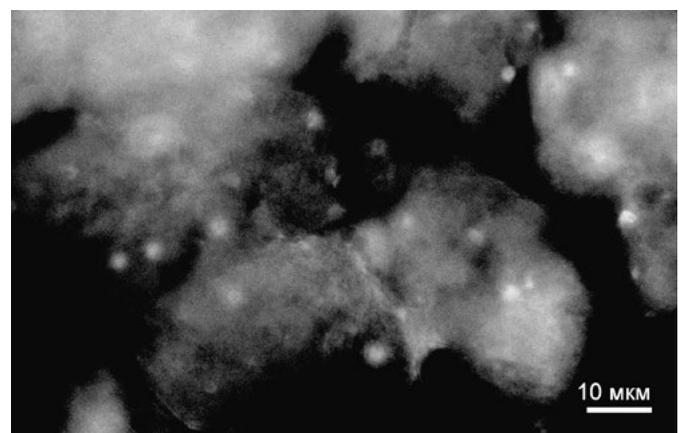


Рисунок 3. Иммунофлуоресцентное окрашивание слюнных желез клопа вредная черепашка (поперечный срез имаго клопа на уровне груди) с использованием поликлональных антител кролика к рекомбинантной протеиназе гGHP3e1 и антикроличьего флуоресцентного конъюгата (вторичные антитела)

виде полипептида, состоящего из сигнальной последовательности, пропептида и зрелого фермента [Konarev et al., 2011]. Сигнальные пептиды секреторных белков, к которым относятся и пищеварительные протеиназы, отщепляются в процессе их транслокации в просвет эндоплазматического ретикулума, а оставшаяся неактивная часть требует отделения пропептида от зрелого фермента для его активации. В природе такой гидролиз осуществляют специальные протеиназы. Путем гетерологической экспрессии в дрожжах нуклеотидной последовательности, соответствующей зрелому ферменту, мы получили активную форму протеиназы gGHP3p1, а экспрессией последовательности, кодирующей пропептид совместно со зрелым ферментом, мы получили соответствующий неактивный профермент (зимоген) [Долгих и др., 2014]. Информация о его аминокислотной последовательности, а именно, наличие остатка аргинина в позиции, предшествующей зрелой форме фермента, позволила нам предположить, по аналогии с некоторыми другими сериновыми протеиназами [Такауама et al., 1997], что отщепление пропептида может быть осуществлено какой-либо протеиназой, специфичной к пептидным связям, образованным аргинином. Такими протеиназами являются трипсины различных животных, в частности коммерческий препарат трипсина быка. С использованием иммобилизованного на полиакриламидом геле трипсина нам удалось отщепить пропептид и получить активную рекомбинантную форму протеиназы gGHP3p2. В данном исследовании мы предположили, что относительно низкая активность протеиназ с молекулярной массой 28 кДа в слюнных железах клопа может объясняться пребыванием фермента в неактивной форме. Для выяснения этого вопроса белки, экстрагированные из слюнных желез, были обработаны иммобилизованным трипсином с использованием различных вариантов со-

отношения реагентов и продолжительности инкубации. Результаты анализировались методом ИЭФ в сочетании с глютеиновой репликой (рис. 4А). Выяснилось, что обработка трипсином приводит к появлению в спектрах протеиназ новых мощных компонентов (рис. 4А, дорожки 3 и 4), существенно превышающих по активности те, что присутствуют в необработанных трипсином препаратах (рис. 4А, дорожки 1, 2 и 6). Темные полосы указывают на полный гидролиз субстрата в соответствующих зонах реплики, тогда как компоненты с меньшей активностью дают белые полосы, опалесцирующие в рассеянном свете. Оптимальные результаты были получены при добавлении 1 мг сухого геля с иммобилизованным трипсином к 30 мкл экстракта из слюнных желез с рН 8.5 и продолжительности инкубации 2 часа при температуре 37°C. Увеличение продолжительности инкубации приводило к падению протеолитической активности. Резкое нарастание активности при обработке трипсином наблюдалось как для нейтральных протеиназ, гидролизующих клейковину (рис. 4А), так и щелочных протеиназ, гидролизующих также желатин (рис. 4Г, дорожки 14 и 15). Контрольная проба с гелем иммобилизованного трипсина без добавления экстракта слюнных желез не содержала свободных протеиназ, что указывает на то, что сам трипсин не вносил вклад в увеличение протеолитической активности препаратов. Сопоставление данных ИЭФ белков слюнных желез в сочетании с субстратными репликами (рис. 4 Б) и иммуноблоттинга с использованием scFv-фрагмента (рис. 4В), а также поликлональных антител к gGHP3e1 выявили перестройку спектра антигенов. При этом вновь появившиеся активные компоненты нейтральных протеиназ (рис. 4Б, дорожка 10) соответствовали отдельным, несколько усиленным компонентам антигенов на нитроцеллюлозной реплике (рис. 4В, 10). Иммуноблоттинг с использованием

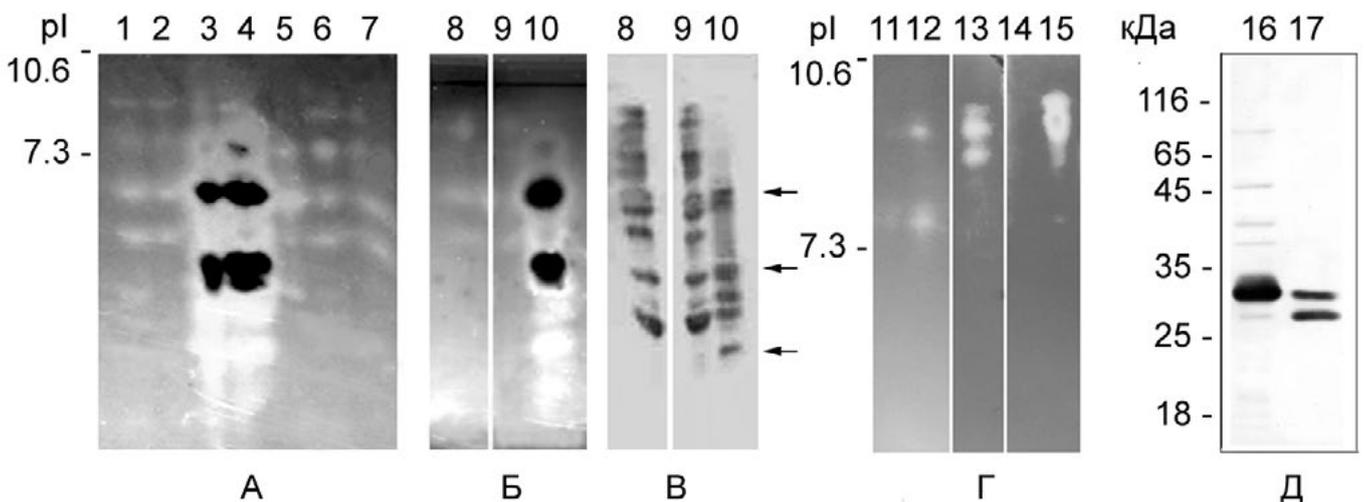


Рисунок 4. Активация протеиназ слюнных желез вредной черепашки под действием иммобилизованного трипсина.

Белки поврежденного зерна и слюнных желез вредной черепашки разделены изофокусированием (А-В – интервал рН 5–8, Г – рН 5–11) и ДСН-ПААГЭ (Д). Протеиназы выявлены субстратными репликами (А и Б – спирторастворимые белки клейковины, Г – желатин), В и Д – иммуноблоттинг с использованием scFv-фрагмента к рекомбинантной протеиназе gGHP3e1.

А. Дорожки 1–6 – белки слюнных желез без обработки (1, 2, 5 и 6) и после обработки трипсином (3–6). 7 – белки зерна пшеницы образца сорта Еге-88, поврежденного вредной черепашкой.

Б и В – реплики, последовательно снятые с одного и того же геля; 8–10 – белки слюнных желез без обработки (8 и 9) и после обработки трипсином (10). Новые или усилившиеся компоненты спектра антигенов (10) указаны стрелками.

Г. 11–13 – белки поврежденных зерен образцов сортов Джангаль (11 и 12, нанесено 1 и 3 мкл соответственно) и Еге-88 (13, 3 мкл); 14 и 15 – белки слюнных желез без обработки и после обработки трипсином.

Д. 16 и 17 – белки слюнных желез без обработки и после обработки трипсином.

scFv-фрагмента выявил заметное ослабление компонента антигена с молекулярной массой около 30–32 кДа и резкое усиление компонента с молекулярной массой около 28 кДа после обработки экстрактов слюнных желез трипсином (рис. 4Д, 16 и 17). По-видимому, более высокомолекулярный компонент соответствует проферменту, а компонент 28 кДа – зрелому ферменту. В следовых количествах компонент 28 кДа присутствует и в необработанном экстракте слюнных желез.

С помощью ДСН-ПААГЭ был изучен характер гидролиза компонентов клейковины – запасных белков глютеинов и глиадинов зерна пшеницы разными препаратами протеолитических ферментов вредной черепашки, выделенными из поврежденного зерна и слюнных желез, а также оценен уровень повышения протеолитической активности в экстрактах слюнных желез после обработки трипсином.

К навескам (1 мг) муки из неповрежденного зерна мягкой пшеницы сорта Gaspard добавляли экстракты белков, выделенных из поврежденного зерна образца сорта твердой пшеницы Ege-88, а также препараты белков слюнных желез, как необработанные, так и обработанные иммобилизованным трипсином. Мука сорта Gaspard была выбрана потому, что характерные для сорта высокомолекулярные глютеины показали высокую атакуемость протеиназами клопов по сравнению с глютеинами других сортов пшеницы, что обеспечило повышенную чувствительность анализа. После инкубации в течение 17 часов при 37 °С пробы наносили на гель для ДСН-ПААГЭ (рис. 5). Очевидно, что препарат протеиназ, выделенных из поврежденного зерна образца пшеницы сорта Ege-88 (рис.5, дорожка 2), в условиях эксперимента гидролизовал практически все компоненты глютеинов (высокомолекулярные фракции белков спектра) и глиадинов (относительно низкомолекулярные фракции). Остались лишь следы некоторых компонентов с молекулярной массой около 67 кДа.

Протеиназы, экстрагированные из слюнных желез клопов, собранных в разные годы в Саратовской области и Краснодарском крае, обладали относительно невысокой активностью и в условиях данного эксперимента практически не гидролизовали запасные белки (рис. 5, 4–6). В свою очередь, препараты протеиназ, обработанные иммобилизованным трипсином, показали высокую активность по отношению ко всем фракциям запасных белков, включая высокомолекулярные глютеины и глиадины. Контрольные пробы показали, что протеолитическая активность не связана непосредственно с самим трипсином, который теоретически мог частично сойти с носителя. Протеолитическая активность наблюдалась даже при использовании для инкубации количеств экстрактов в 50 раз меньших, чем в случае примеров с необработанными препаратами, представленными на рис. 5. Объем обработанного препарата белков слюнных желез, соответствующего 1/10 от объема исходного необработанного препарата, оказалось достаточно для гидролиза практически всех белков в пробе. Таким образом, активность протеиназ в белковых экстрактах из слюнных желез после обработки их трипсином возрастает не менее чем на два порядка. Кроме того установлено, что протеиназы слюнных желез, активируемые обработкой иммобилизованным трипсином, способны гидролизовать все основные фракции запасных белков

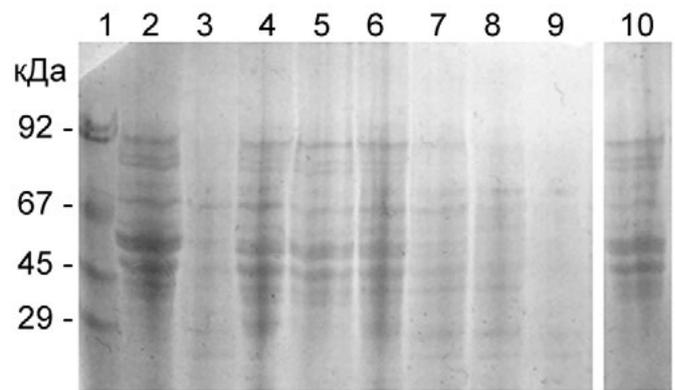


Рисунок 5. Гидролиз запасных белков неповрежденного зерна пшеницы сорта Gaspard. (дорожки 2 и 10, контроль) протеиназами вредной черепашки, извлеченными из поврежденного зерна сорта Ege-88 (дорожка 3) и белками слюнных желез необработанными (4–6) и обработанными (7–9) трипсином. К белкам неповрежденного зерна добавляли протеиназы (3–9) или 0.02 М трис-НСl буфер (2 и 10), инкубировали смеси 17 часов при 37 °С и наносили на гель для ДСН-ПААГЭ в объеме 0.9 мкл. Объем обработанных иммобилизованным трипсином препаратов белков слюнных желез (7–9) в пересчете составлял 1/50, 1/25 и 1/10 соответственно от объема исходного необработанного препарата, нанесенного на дорожку 6. 4 – с добавлением препарата слюнных желез клопов из Саратовской области (сбор 2006 года), 5 и 6 – из Краснодарского края (2015 год). Дорожка 1 – маркеры молекулярной массы.

зерна, как и протеиназы, содержащиеся в зерне, поврежденном вредной черепашкой.

Анализ нативных и рекомбинантных белков слюнных желез клопа вредная черепашка и поврежденных зерен пшеницы с помощью ДСН-ПААГЭ и ИЭФ в сочетании с методами субстратных реплик и иммуноблоттинга позволил оценить сложность состава комплекса протеолитических ферментов, участвующих во внекишечном пищеварении вредителя, и выявить ряд новых закономерностей его функционирования. С помощью иммунохимических подходов прямо показано присутствие протеиназы GHP3 в слюнных железах в форме неактивного профермента (зимогена), хранящегося, видимо, в секреторных гранулах. Это подтверждает высказанное нами ранее предположение, основанное на данных, полученных с помощью аффинной хроматографии и электрофореза протеиназ слюнных желез и поврежденного зерна (Конарев и др., 2014). Существование протеолитических ферментов в форме неактивных проферментов с активацией при возникновении необходимости – при питании, запуске каскада защитных реакций на нападение патогенов и т.д. широко известно у многих организмов, включая некоторых насекомых, но пока не было изучено у хлебных клопов. При поступлении в слюнные железы, например, таракана сигнала по нервной системе и с участием нейромедиатора серотонина [Walker, 2009] происходит выделение содержимого секреторных гранул из клеток в выводящие пути, после чего осуществляется активация проферментов. По аналогии с известными пищеварительными протеиназами млекопитающих и насекомых можно предположить, что при появлении адекватной пищи – зерна злаков, по сигналу, переданному нервной системой и нейрогормональными факторами, в слюнных железах вредной черепашки синтезируется или активируется какая-то пока неизвестная се-

риновая протеиназа, которая, в свою очередь, активирует профермент протеиназы GHP3, а также активаторы других протеиназ, в частности щелочных. У млекопитающих таким ферментом является энтерокиназа, которая превращает трипсиноген в активный трипсин, который затем сам осуществляет активацию других молекул трипсиногена [Яровая, 2003]. У чешуекрылых такими активирующими ферментами в кишечнике служат трипсиноподобные протеиназы [Parde, 2009]. Наши эксперименты показали, что активатором профермента протеиназы GHP3 в слюнных железах вредной черепашки может быть протеиназа со специфичностью, как у трипсина. Сам профермент протеиназы GHP3, по-видимому, не может активироваться автокатализом ввиду ее иной, отличной от трипсина, субстратной специфичности. По данным Amiri et al. [2015], питание зерном пшеницы запускает синтез мРНК, кодирующих наряду с другими ферментами протеиназу GHP3 (в их работе, обозначенной как G1), причем как в слюнных железах, так и, в меньшей степени, в кишечнике. Наши данные по иммунохимии также свидетельствуют о присутствии антигена, соответствующего GHP3, в кишечнике клопа. Интересно, что уровень экспрессии мРНК при питании зернами ржи, тритикале и ячменя был значительно ниже, чем при питании зернами пшеницы [Amiri et al., 2015], что, возможно, свидетельствует о большей функциональной направленности GHP3 (G1) на гидролиз запасных белков пшеницы. По-видимому, при питании зерном пшеницы, в зависимости от уровня потребности в ферменте, в слюнных железах клопа могут идти независимо или взаимосвязанно один или два процесса – синтез фермента *de novo* и активация зимогена (мобилизация запасов). В любом из этих случаев процесс проходит стадию активации протеиназы. Ключевая роль фермента, запускающего активацию пищеварительной протеиназы, указывает на один из возможных путей борьбы с вредителем. Если сама протеиназа GHP3 не чувствительна к известным белковым ингибиторам [Konarev et al., 2011; Долгих и др., 2014], то трипсиноподобная протеиназа, активирующая ее профермент, может оказаться подходящей мишенью для ингибиторов, по крайней мере ее кишечная форма. Уже установленная возможность использования такого подхода в борьбе с чешуекрылыми [Parde, 2009] указывает на перспективность поиска и изучения протеиназ, активирующих проферменты GHP3 и других пищеварительных протеиназ вредной черепашки.

Полученные данные также свидетельствуют о том, что обработка белков слюнных желез трипсином, помимо нейтральной протеиназы GHP3, способной гидролизовать запасные белки пшеницы, активирует и щелочные протеиназы, гидролизующие как белки клейковины, так и желатин. Эти данные указывает на то, что и щелочные протеиназы клопа могут находиться в форме зимогена. Щелочные протеиназы, присутствующие также в поврежденных зернах, проявляют более высокую изменчивость по составу компонентов ИЭФ спектра по сравнению с нейтральными протеиназами, что может указывать, на

пример, на внутривидовую изменчивость клопов по составу секретируемых щелочных протеиназ или на зависимость состава таких ферментов от сортовых особенностей белков зерна, которым питается клоп.

Трудно интерпретируемым результатом является то, что в описанных условиях эксперимента в поврежденном зерне не было выявлено антигенов, реагирующих с разными типами антител к рекомбинантной протеиназе GHP3, хотя нуклеотидная последовательность, кодирующая GHP3, была клонирована на основании данных секвенирования протеиназы 28 кДа, выделенной из поврежденного зерна [Konarev et al., 2011]. Среди возможных объяснений – недостаточная чувствительность использованных методов (локализацию иммунных комплексов проводили после ИЭФ) и низкая концентрация секретируемой формы GHP3 в зерне. Возможно, что GHP3, характеризующаяся высоким содержанием в слюнных железах клопа (в форме зимогена) после секреции в зерно в значительной мере деградирует в ходе его созревания в отличие от ряда других форм протеиназ, сохраняющих активность в поврежденном зерне в течение длительного времени. То же, видимо, происходит и с пролил-специфичной эндопептидазой, синтезирующейся в слюнных железах черепашки, но представленной в поврежденном зерне лишь в следовых количествах [Yandamuri et al., 2014]. Не было выявлено и взаимодействия поликлональных антител к гомогенату слюнных желез, полученных в кроликах и мышах, с белками поврежденного зерна или кишечника клопа. По-видимому, несмотря на относительно высокое содержание в слюнных железах секретируемые в зерно белки, включая протеиназы, в присутствии множества других белков гомогената, обладающих более высокой иммуногенностью, не проявляли достаточной способности вызывать иммунный ответ. Поскольку другими авторами [Гаврилюк и др., 1975; Vaccino et al., 2016] была показана возможность иммунодиагностики повреждения зерна клопами, основанной на использовании антител к белкам слюнных желез, можно предположить, что условия осуществления иммунизации, особенности используемого для иммунизации материала и т.д. могут влиять на конечный результат. Выходом из данной ситуации может быть стандартизация условий анализа. Получение высокоспецифичных моноклональных антител к конкретным белкам, секретируемым слюнными железами, в том числе одноцепочечных scFv-фрагментов антител к протеиназе GHP3 и другим секретируемым ферментам, а также использование более эффективных методов фракционирования белков в сочетании с высокочувствительными вариантами выявления иммунных комплексов может быть решением данной проблемы [Долгих и др., 2017]. Такие подходы расширяют арсенал эффективных методов анализа пищеварительных ферментов вредителей, а также будут полезны при разработке новых, более достоверных по сравнению с существующими, методов диагностики повреждения растений вредителями.

Заключение

Методами ДСН-ПААГЭ и ИЭФ в сочетании с методами иммуноблоттинга и субстратных реплик оценена сложность состава комплекса протеолитических фермен-

тов, участвующих во внекишечном и внутрикишечном пищеварении клопа вредная черепашка, и выявлен ряд особенностей его функционирования. Обнаружено, что

слюнные железы клопа и поврежденные зерна пшеницы содержат ряд компонентов протеиназ, отличающихся по ИЭТ и субстратной специфичности. Нейтральные протеиназы, выявленные в поврежденных зернах и, по-видимому, играющие ведущую роль в гидролизе белков клейковины, не действуют на животный белок желатин, тогда как щелочные протеиназы гидролизуют как запасные белки, так и желатин.

С помощью иммунофлуоресцентной микроскопии установлено присутствие протеиназы GHP3, способной гидролизовать белки клейковины пшеницы, в секреторных гранулах клеток слюнных желез клопа вредная черепашка в форме неактивного профермента. Показана возможность активации проферментов протеиназы GHP3, а также других протеиназ, содержащихся в слюнных же-

лезях клопа, обработкой иммобилизованным трипсином. Полученные данные позволяют предположить наличие в слюнных железах протеиназ, осуществляющих активацию проферментов *in vivo* при поступлении сигнала о наличии соответствующей белковой пищи. Подобные активирующие протеиназы, присутствующие как в слюнных железах, так и в кишечнике клопов, наряду с самими пищеварительными ферментами, также могут рассматриваться в качестве потенциальных “мишеней” для белковых ингибиторов при создании устойчивых к вредителю форм пшеницы. Поликлональные антитела и одноцепочечные scFv-фрагменты антител могут являться эффективными инструментами для изучения пищеварительных протеиназ хлебных клопов, а также разработки новых подходов к защите пшеницы от данных вредителей.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-08-04247).

Библиографический список (References)

- Вилкова Н.А., Экман-Буринская Н.В. Некоторые аспекты белкового питания вредной черепашки *Eurygaster integriceps* Put. на различных по устойчивости сортах пшеницы // Труды ВИЗР. 1977. N 52. С. 39–44.
- Гаврилюк И.П., Конярев В.Г., Шапиро И.Д., Вилкова Н.А., Семенова А.Я., Литвинов А.М. Способ определения поврежденности зерна и муки пшеницы вредителями // Бюлл. открытий, изобретений, пром. образцов и товарных знаков. 1975. N 38. А.с. N 487627.
- Долгих В.В., Сендерский И.В., Конярев А.В. Получение и свойства рекомбинантных протеиназ *Eurygaster integriceps* Put., гидролизующих глютен // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. N. 5. P. 466–474.
- Долгих В.В., Царев А.А., Сендерский И.В., Тимофеев С.А., Конярев А.В. Рекомбинантные одноцепочечные антитела как инструмент для выявления и изучения глютен-гидролизующих протеиназ клопа вредная черепашка (*Eurygaster integriceps* Put.) // Вестник защиты растений. 2017 N 1. С. 21–26.
- Капусткина А.В., Нефедова Л.И. Прорастание и морфогенез семян пшеницы при повреждении вредной черепашкой // Вестник защиты растений. 2013. N 2. С. 48–55.
- Конярев Ал.В., Конярев А.В., Нефедова Л.И., Губарева Н.К., Д.Сиври Озай. Анализ полиморфизма гидролизующих клейковину протеиназ в зерновках пшеницы, поврежденных вредной черепашкой *Eurygaster integriceps* Put. и родственными ей клопами // Доклады РАСХН. 2013. N 5. P. 7–11.
- Конярев Ал.В., Фомичева Ю.В. Перекрестный анализ взаимодействия компонентов α -амилазы и протеиназ насекомых с белковыми ингибиторами из эндосперма пшеницы // Биохимия. 1991. Т.56. N 4. С.628–638.
- Конярев А.В., Долгих В.В., Сендерский И.В., Нефедова Л. И., Конярев Ал. В., Губарева Н. К. Свойства нативных и рекомбинантных протеиназ слюнных желез клопа вредная черепашка (*Eurygaster integriceps* Put.), гидролизующих клейковину пшеницы // Вестник защиты растений. 2014. N 2. С. 3–16.
- Мосолов В.В., Валуева Т. А. Ингибиторы протеиназ в биотехнологии растений // Прикл. биохим. и микробиол. 2008. Т. 44. N 3. P. 261–269.
- Павлюшин В.А., Вилкова Н.А., Сухорученко Г.И., Нефедова Л.И., Капусткина А.В. Вредная черепашка и другие хлебные клопы. Санкт-Петербург.: 2015. 280 с.
- Яровая Г. А. Биорегулирующие функции и патогенетическая роль протеолиза // Лабораторная медицина. 2003. N 6. С. 48–54.
- Every D., Sutton K.H., Shewry P.R., Tatham A.S., Coolbear T. Specificity of action of an insect proteinase purified from wheat grain infested by the New Zealand wheat bug, *Nysius huttoni* // J. Cereal Sci. 2005. V. 42. P. 185–191.
- Jamal F., Pandey P.K., Singh D., Khan M.Y. Serine protease inhibitors in plants: nature’s arsenal crafted for insect predators // Phytochemistry Reviews. 2012. P. 1–34. doi: 10.1007/s11101-012-9231-y
- Konarev A.V., Beaudoin F., Marsh J., Vilkova N.A., Nefedova L.I., Sivri D., Koxsel H., Shewry P.R., Lovegrove A. Characterization of a glutenin-specific serine proteinase of sunn bug *Eurygaster integriceps* Put // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. V. 59. N. 6. P. 2462–2470.
- Konarev A.V., Lovegrove A. Novel detection methods used in conjunction with affinity chromatography for the identification and purification of hydrolytic enzymes or enzyme inhibitors from insects and plants, *Affinity Chromatography*, Magdeldin, S., Ed., InTech, 2012, pp. 188–210. ISBN: 978-953-51-0325-7. DOI: 10.5772/37618. Available from: <http://www.intechopen.com/books/affinity-chromatography/novel-detection-methods-used-in-conjunction-with-affinity-chromatography-for-the-identification-and-> (accessed: 29.01.2017)
- Lait C. G., Miller D.R., Bates, S.L., Borden J.H., Kermode A.R. Biochemical assay detects feeding damage to loblolly pine seeds caused by the leaf-footed pine seed bug (Hemiptera: Coreidae) // Journal of Entomological Science. 2003. V. 38. N. 4. P. 644–653.
- Olanca B., Koxsel H., Ozderen N.T., Ozay, D.S. Determination of wheat bug (*Eurygaster* spp.) damage in durum wheat (*Triticum durum* L.) by electrophoresis and rapid visco analyser. Journal of Cereal Science. 2016. V. 72. P. 69–74.
- Parde V. D. Inhibition of *Helicoverpa armigera* gut zymogen activation by plant protease inhibitors (Doctoral dissertation, Dr. Babasaheb Ambedkar Marathwada University). 2009. 204 p. http://oar.icrisat.org/128/1/merged_document-3.pdf (Accessed 09.12.2016)
- Salis L., Goula M., Valero J., Gordún E. Prolamin proteins alteration in durum wheat by species of the genus *Eurygaster* and *Aelia* (Insecta, Hemiptera) // Spanish journal of agricultural research. 2010. V.8. N 1. P. 82–90.
- Shamsi, T. N., Parveen R., Fatima S. «Characterization, Biomedical and Agricultural applications of Protease Inhibitors: A review // International journal of biological macromolecules. 2016. V. 91.P. 1120–1133.
- Sivri D., Koxsel H. Characterisation and partial purification of gluten hydrolysing proteinase from bug (*Eurygaster* spp.) damaged wheat // In Wheat Gluten, Royal Society of Chemistry: London. 2000. P. 526–530.
- Takayama T.K., Fujikawa K., Davie E.W. Characterization of the precursor of prostate-specific antigen activation by trypsin and by human glandular kallikrein // Journal of Biological Chemistry. 1997. V. 272. N 34. P. 21582–21588.
- Vaccino P., Ingegno B., Pansa M., Copta T., and Tavella L. Common wheat and cereal bug interactions: kernel quality depletion and immunodetection of damage // The Journal of Agricultural Science. 2016. P. 1–12. doi: 10.1017/S0021859616000162.
- Walker G. P. Salivary glands // In V. H. Resh, R. T. Carde ed. Encyclopedia of Insects. 2009. Elsevier. P. 897–901.
- Yandamuri R.C., Gautam R., Darkoh C., Daredy V., El-Bouhssini M., Clack B. A. Cloning, expression, sequence analysis and homology modeling of the prolyl endoprotease from *Eurygaster integriceps* Put. // Insects. 2014. V. 5. N. 4. P. 762–782.

Translation of Russian References

- Dolgikh V.V., Senderskii I.V., Konarev A.V. Production and properties of recombinant glutenin-hydrolyzing proteinases from *Eurygaster integriceps* Put. Applied biochemistry and microbiology. 2014. V. 50. N 5. P. 433–440. (English translation).

- Dolgikh V.V., Tsarev A.A., Senderskiy I.V., S. A. Timofeev S.A., Konarev A.V. Production of single chain fragment variable (scFv) antibody against Sunn pest *Eurygaster integriceps* Put. proteinases hydrolyzing wheat gluten. *Vestnik zashchity rastenii*, Saint Petersburg, 2017. N 1. (This Issue).
- Gavriliuk I.P., Konarev V.G., Shapiro I.D., Vilkoval N.A., Semenova A.Ya., Litvinov A.M. A method of determining damage of wheat grain and flour by pests. *Bull. otkrytii, izobretenii, prom. obrazstv i tovarnykh znakov*. 1975. N 38. RU Patent N 487627. (In Russian).
- Kapustkina A.V., Nefedova L.I. Germination and morphogenesis of wheat seeds damaged by *Eurygaster integriceps*. *Vestnik zashchity rasternii*, Saint Petersburg, 2013. N2. P. 48–55. (In Russian).
- Konarev A.V., Fomicheva Y.V. Cross analysis of the interaction of alpha-amylase and proteinase components of insects with protein inhibitors from wheat endosperm. *Biokhimiya* (Moscow). 1991. V. 56. N 4. P. 628–638. (English translation).
- Konarev A.V., Konarev A.V., Nefedova L.I., Gubareva N.K., Ozay D.S. Analysis of gluten-hydrolyzing proteinase polymorphism in wheat grains damaged by Sunn Pest *Eurygaster integriceps* Put. and related bugs. *Russian Agricultural Sciences*. 2013. V. 39. N. 5–6. C. 390–395. (English translation).
- Konarev A.V., Dolgikh V.V., Senderskiy I.V., Nefedova L.I., Konarev A.V., Gubareva N.K. Properties of natural and recombinant Sunn pest (*Eurygaster integriceps*) salivary gland proteinases hydrolyzing wheat gluten. *Vestnik zashchity rasternii*, Saint Petersburg, 2014. N2. P. 3–16. (In Russian).
- Mosolov V.V., Valueva T.A. Proteinase inhibitors in plant biotechnology: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2008. V. 44. N 3. C. 233–240. (English translation).
- Pavlyushin V.A., Vilkoval N.A., Sukhoruchenko G.I., Nefedova L.I., Kapustkina A.V. Sunn pest and other grain bugs. Saint Petersburg. 2015. 280 p. (In Russian).
- Vilkoval N.A., Ekman-Burinskaya N.V. Some aspects of Sunn pest *Eurygaster integriceps* Put protein nutrition on different by resistance wheat varieties. In: *Trudy VIZR*. Leningrad: 1977. N 52. P. 39–44. (In Russian).
- Yarovaya G.A. Bioregulating functions and pathogenetic role of the proteolysis. *Laboratornaya meditsina*. 2003. N 6. P.48–54. (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 1(91), p. 12–20

IMMUNOCHEMICAL ANALYSIS OF SUNN PEST *EURYGASTER INTEGRICEPS* PROTEINASE COMPLEX HYDROLYZING WHEAT GLUTEN PROTEINS

Al.V. Konarev¹, V.V. Dolgikh¹, I.V. Senderskiy¹, A.V. Konarev², A.V. Kapustkina¹, L.I. Nefedova¹, N.K. Gubareva²

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

²N.I.Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR), St. Petersburg, Russia

Sunn pest and other wheat bugs' salivary gland proteinases capable to hydrolyze main wheat gluten proteins (glutenins and gliadins) are responsible for deterioration of quality of flour made of damaged grains. Proteinase activity restriction may be one of the ways to reduce the damage caused by pests, necessitating the study of those enzymes. Using methods of isoelectric focusing, electrophoresis and immunoblotting in conjunction with substrate replica methods, the complexity of the set of participating in Sunn pest extra- and intractintestinal digestion proteinases was estimated, and a number of features of their functioning were revealed. The presence of wheat grain storage protein hydrolyzing proteinase GHP3 in secretory granules of salivary gland cells in form of the inactive zymogen was shown with the help of immunochemical methods. The treatment of bug salivary gland proteins with trypsin leads to the cleavage of propeptides and appearance of active forms of GHP3 and other proteinases. Data obtained allowed to suppose the presence in salivary glands and gut of specific trypsin-like proteinases performing activation of zymogens, when the bugs feed grain. The possibilities of the research data use for the solving plant protection tasks are discussed.

Keywords: Sunn pest; salivary gland; damaged grain; proteinase; GHP3; gluten; substrate replica; antibody; recombinant proteinase.

Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация

* Конярев Александр Васильевич. доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, e-mail: alv-konarev@yandex.ru

Долгих Вячеслав Васильевич. Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: dol1slav@yahoo.com

Сендерский Игорь Вадимович. Младший научный сотрудник, e-mail: senderskiy@mail.ru

Капусткина Александра Валерьевна. Научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: ydati@mail.ru

Нефедова Людмила Ивановна. Ведущий научный сотрудник, кандидат сельскохозяйственных наук, e-mail: li-nefedova@yandex.ru

Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44, Российская Федерация

Конярев Алексей Васильевич. Зав. отд. биохимии и молекулярной биологии, доктор биол. наук, профессор, e-mail: a.konarev@vir.nw.ru

Губарева Наталья Константиновна. Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: nk-gubareva@yandex.ru

Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation

* Konarev Alexander Vasilievich. Leading Researcher, DSc in Biology, e-mail: alv-konarev@yandex.ru

Dolgikh Vyacheslav Vasilievich. Leading Researcher, PhD in Biology, e-mail: dol1slav@yahoo.com

Senderskiy Igor Vadimovich. Researcher, e-mail: senderskiy@mail.ru

Kapustkina Aleksandra Valerievna. Senior Researcher, PhD in Biology, e-mail: ydati@mail.ru

Nefedova Lyudmila Ivanovna. Leading Researcher, PhD in Agriculture, e-mail: li-nefedova@yandex.ru

N.I.Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42-44, B.Morskaya Street, 90000, St. Petersburg, Russia

Konarev Alexey Vasilievich. Head of Biochemistry and molecular biology department, DSc in biology, Professor, e-mail: a.konarev@vir.nw.ru

Gubareva Natalia Konstantinovna. Leading Researcher, PhD in Biology, e-mail: nk-gubareva@yandex.ru

* Ответственный за переписку

* Responsible for correspondence

УДК 632.754:633.11:577.151:577.27

РЕКОМБИНАНТНЫЕ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ АНТИТЕЛА КАК ИНСТРУМЕНТ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ ГЛЮТЕНИН-ГИДРОЛИЗУЮЩИХ ПРОТЕИНАЗ КЛОПА ВРЕДНАЯ ЧЕРЕПАШКА (*EURYGASTER INTEGRICEPS* PUT.)

В.В. Долгих, А.А. Царев, И.В. Сендерский, С.А. Тимофеев, А.В. Конарев

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Хлебные клопы рода *Eurygaster* Lap. наносят огромный ущерб качеству зерна пшеницы в России и за ее пределами. Протеиназы слюнных желез таких клопов как вредная черепашка, гидролизующие основные белки клейковины пшеницы – глиадины и глютенены, являются важными факторами вредоносности. В предыдущих исследованиях мы осуществили гетерологичную экспрессию глютенин-гидролизующей протеиназы GHP3 клопа вредная черепашка *E. integriceps* в бактериях *E. coli*. В данном исследовании была сконструирована библиотека одноцепочечных антител на основе переменных фрагментов иммуноглобулинов мышей, иммунизированных выделенной рекомбинантной протеиназой. Использование технологии фагового дисплея позволило отобрать из полученной библиотеки рекомбинантное мини-антитело, распознающее GHP3 в пробах белков слюнных желез клопа. Иммуноблоттинг с использованием полученного scFv-фрагмента подтвердил факт присутствия незначительных количеств зрелой формы фермента в поврежденном зерне. Рассматриваются перспективы использования одноцепочечных рекомбинантных антител для дальнейшего изучения протеиназы вредной черепашки, а также для создания ингибиторов глютенин-гидролизующей активности фермента.

Ключевые слова: вредная черепашка, слюнная железа, поврежденное зерно, клейковина, глютенин, протеиназа, одноцепочечные антитела, фаговый дисплей, ингибиторы, иммунодиагностика.

Хлебные клопы рода *Eurygaster* Lap. наносят большой ущерб качеству зерна пшеницы в России, Европе и на Ближнем Востоке [Critchley, 1998; Алехин, 2002; Sivri et al., 2002; Vaccino et al., 2006; Павлюшин и др., 2010]. Одним из самых опасных вредителей пшеницы является клоп вредная черепашка *Eurygaster integriceps* Put. При питании насекомое вводит в эндосперм зерна секрет слюнных желез, содержащий протеиназы и другие пищеварительные ферменты, а затем всасывает частично гидролизованные продукты. При этом ферменты, оставшиеся в зерне в следовых количествах, не только негативно влияют на всхожесть семян [Капусткина, Нефедова, 2013], но и нарушают процесс формирования клейковины при замесе теста [Nariri et al., 2000; Гапонов и др., 2009; Каменченко и др., 2010; Torbica et al., 2014]. Основной мишенью протеиназ хлебных клопов являются главные белки клейковины – глиадины и глютенены.

Среди возможных экологически безопасных подходов к снижению потерь, вызываемых хлебными клопами, можно выделить использование устойчивых сортов [Вилкова, Конарев, 2010; Крупнов, 2011]. Такая устойчивость может быть основана на особенностях структуры запасных белков зерна [Fatehi et al., 2008; Werteker, Kramreither, 2008] или на внедрении в растение генов белковых ингибиторов протеиназ и других гидролаз [Dunaevsky et al., 2005; Gatehouse, 2011; Jamal et al., 2012]. Поиск и конструирование новых специфичных ингибиторов гидролаз хлебных клопов весьма актуальны, поскольку ферменты их слюнных желез малочувствительны к известным растительным ингибиторам [Konarev et al., 2011]. В медицине конструирование специфичного ингибитора может быть успешно осуществлено, если взять за основу одну из известных форм. Например, циклический ингибитор трипсина из подсолнечника SFTI-1 [Luckett et al., 1999; Konarev et al., 2000] можно химически модифицировать и сделать специфичный ингибитор к протеиназам, активность которых возрастает при различных патологиях [Avrutina et al., 2012; Zoller et al., 2012]. Другой способ создания специ-

фичных ингибиторов – использование антител, специфичных к активному центру фермента [Ganesan et al., 2010].

Для использования в области защиты растений большой интерес представляют рекомбинантные одноцепочечные антитела (scFv-фрагменты), представляющие собой два переменных фрагмента легкой и тяжелой цепи иммуноглобулинов, соединенные между собой с помощью гибкого линкера. В отличие от иммуноглобулина, scFv-фрагмент представляет собой единую полипептидную цепь и его ген может быть встроен в геном растения для блокирования активности чужеродных ферментов. Наряду с созданием устойчивых сортов растений, рекомбинантные одноцепочечные антитела к гидролазам хлебных клопов могут быть использованы и для разработки систем иммунодиагностики поврежденного зерна. К преимуществам использования scFv-молекул относятся их низкая себестоимость наработки в бактериях и возможность внесения самых разнообразных модификаций в последовательность белка для придания новых свойств [Albrecht et al., 2006].

В данном исследовании планировалось сконструировать библиотеку одноцепочечных антител (scFv-фрагментов) на основе переменных фрагментов иммуноглобулинов мышей, иммунизированных рекомбинантной формой глютенин-гидролизующей протеиназы rGHP3e клопа вредная черепашка *E. integriceps*, экспрессированной в бактериях *E. coli* [Долгих и др., 2014]. Далее, с использованием технологии фагового дисплея мы попытались отобрать из полученной библиотеки рекомбинантное мини-антитело, специфичное против глютенин-гидролизующей протеиназы GHP3, и оценить возможность и перспективы использования одноцепочечных рекомбинантных антител для дальнейшего изучения протеиназы вредной черепашки, а также для создания ингибиторов глютенин-гидролизующей активности фермента.

Методика исследований

Создание библиотеки рекомбинантных антител к протеиназе rGHP3e. Гетерологичную экспрессию протеиназы GHP3 в бактериях *E. coli*, выделение и солубилизацию рекомбинантной

протеиназы проводили по ранее описанной методике [Долгих и др., 2014]. Мышей иммунизировали рекомбинантным белком в ходе 4 внутрибрюшинных инъекций с 10 дневным интервалом, используя полный адъювант Фрейнда при первой инъекции и неполный при последующих. Общую РНК селезенки иммунизированных животных выделяли с использованием реагента Trizol (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкции производителя. Синтез кДНК осуществляли в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 2.5 мкг РНК, 10 mM Трис-Cl (pH 8.8), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM каждого дНТФ, 1 мкг олиго-дТ в качестве затравки, 200 ед. RevertAidTM-MuLV-обратной транскриптазы (Thermo Fisher Scientific) и 5 ед. ингибитора РНКазы в течение часа при 37 °С. После этого смесь прогревали 5 мин при 95 °С и использовали 1.6 мкл смеси для постановки ПЦР. 20 мкл смеси для проведения ПЦР помимо кДНК содержала 67 mM Трис-Cl (pH 8.6), 2.5 mM MgCl₂, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 0.5 mM каждого дНТФ, 10 пмоль праймеров и 2.5 ед. *Taq* ДНК полимеразы (Силекс). Для амплификации всего разнообразия последовательностей переменных фрагментов тяжелых (VH) и легких (VL) цепей IgG мыши были использованы 22 сочетания специально подобранных праймеров (Progen). Матрицу денатурировали 3 мин при 94 °С и ДНК амплифицировали в течение 30 циклов каждый из которых включал денатурацию (94 °С, 30 сек), отжиг (55 °С, 30 сек) и синтез (72 °С, 30 сек). ПЦР-продукты размером около 400 пн выделяли из агарозного геля и использовали в качестве матрицы для проведения второго раунда ПЦР с праймерами, содержащими на 5'-конце сайты рестриктаз для встраивания в вектор pSEX81 (Progen). ПЦР-продукты, кодирующие VH-фрагменты, после электрофореза выделяли из агарозного геля, объединяли и встраивали в вектор по сайтам рестриктаз *NcoI* и *HindIII*. Клетки *E. coli* (штамм XL1-Blue MRF[']) трансформировали полученными конструкциями с помощью электропорации, высевали на твердую среду SOB, содержащую ампицилин (100 мкг/мл), 0.1 M глюкозу (SOB-ГА) и растили в течение суток при 30 °С. Бактериальные клетки соскребали стеклянным шпателем с чашек и хранили при -80 °С в среде 2xYT с ампицилином (100 мкг/мл) и 0.1 M глюкозой (2xYT-ГА) в присутствии 25% глицерина. Плазмидная ДНК из приблизительно полумиллиона бактериальных колоний была выделена с помощью метода щелочного лизиса и использована для встраивания последовательностей, кодирующих VL-фрагменты легких цепей иммуноглобулинов по сайтам рестрикции *MluI* / *NotI*. Электропорация клеток XL1-Blue MRF['] конструкциями после лигирования позволила получить библиотеку, высеванную на 20 чашек с твердой средой SOB-ГА и также состоящую приблизительно из 500 тысяч колоний-трансформантов. Бактериальные клетки соскребали с чашек стеклянным шпателем и полученную библиотеку хранили при -80 °С в 2xYT-ГА в присутствии 25% глицерина.

Отбор рекомбинантных scFv-фрагментов к rGNP3e. Полученную библиотеку в виде 50 мл бактериальной суспензии в среде 2xYT-ГА с плотностью 0.025 оптических единиц при длине волны 600 нм (OD₆₀₀ 0.025) дорастивали при 37 °С до OD₆₀₀ 0.1 и заражали хелперным гиперфагом M13 K07ΔpIII (Progen), добавляя приблизительно 100 фаговых частиц на каждую бактериальную клетку. После инкубации 20 мин при 37 °С без перемешивания и 50 мин при перемешивании на орбитальном шейкере (260 об/мин), среду заменяли на 2xYT с ампицилином (100 мкг/мл) и канамицином (50 мкг/мл). Бактериальную культуру инкубировали на орбитальном шейкере в течение ночи при 37 °С, клетки осаждали центрифугированием и к супернатанту добавляли 1/5 объема 20% ПЭГ6000 (Serva), содержащего 2.5 M NaCl. После инкубации суспензии на льду в течение часа фаговые частицы осаждали центрифугированием при 14000 g и температуре 4 °С в течение 20 мин, ресуспендировали в 4.5 мл буфера для разведения фаговых частиц (10 mM Трис-Cl (pH 7.5), 20 mM NaCl, 2 mM ЭДТА) и хранили при -80 °С. Для отбора вирусных частиц, несущих антитела к rGNP3e, 0.75 мл (1/6 часть) полученной суспензии фагов разводили 1:5 в Трис-солевом буферном растворе

(ТСБ, 50 mM Трис-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl), содержащем 1% БСА, инкубировали 15 мин при комнатной температуре и переносили в пробирки с рекомбинантным белком, иммобилизованным на полосках нитроцеллюлозы. Для иммобилизации антигена рекомбинантный белок rGNP3e, наработанный в бактериях *E. coli*, разделяли с помощью электрофореза в присутствии додецилсульфата Na (ДСН-ПААГЭ) в 12% геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и окрашивали с помощью красителя Понсо. Мажорную полосу, соответствующую рекомбинантному белку, вырезали, фрагментировали, отмывали буфером ТСБТ (ТСБ, 0.1% Твин-20) и блокировали 2 часа в том же буфере в присутствии 1% БСА. Далее полоски инкубировали в присутствии суспензии фаговых частиц, переворачивая в течение ночи при 4 °С.

После тщательной отмывки ТСБТ, а затем ТСБ связавшихся фагов элюировали в течение 5 мин в 0.75 мл 0.1 M триэтиламина и элюант быстро нейтрализовали добавлением равного объема 1M Трис-Cl (pH 7.5). Полученную суспензию фагов добавляли к 20 мл культуры клеток *E. coli* XL1-Blue MRF['], дороженных в 2xYT при 37 °С до OD₆₀₀ 0.4. После инкубации 20 мин при 37 °С без перемешивания и 50 мин при перемешивании на орбитальном шейкере (260 об/мин) инфицированных фагом бактерий высевали на 5 чашек с твердой селективной средой SOB-ГА и колонии трансформантов выращивали при 30 °С. Общее количество колоний, полученных после первого раунда селекции, составило приблизительно 60 тысяч.

Повторное заражение бактериальной суспензии хелперным фагом, наработка и ПЭГ-преципитация фаговых частиц, несущих рекомбинантные антитела, инкубация суспензии в присутствии иммобилизованного антигена и последующая элюция вирусов позволили заразить ими клетки *E. coli* и осуществить таким образом второй, а затем и третий раунд отбора. После третьего раунда селекции было осуществлено выделение плазмидной ДНК и переклонирование последовательностей, кодирующих рекомбинантные антитела в экспрессирующий вектор rPE101 (Progen) по сайтам рестрикции *NcoI* / *NotI*.

Гетерологичная экспрессия scFv-фрагментов в бактериях *E. coli*. Полученные конструкции были использованы для трансформации бактерий XL1-Blue MRF['] методом электропорации. Выросшие на чашках с селективной средой SOB-ГА при 30 °С колонии-трансформанты переносили в виде реплик на нитроцеллюлозную мембрану и помещали на ту же среду, но без глюкозы и с добавлением 0.4 mM ИПТГ – специфичного индуктора промотора, контролирующего экспрессию антител. После инкубации колоний на чашках 4 часа при 30 °С мембрану кипятили 5 мин в 0.5% ДСН и использовали для Вестерн-блот анализа с антителами к полигистидиновой последовательности (Sigma-Aldrich), входящей в состав рекомбинантных антител. Отдельные колонии, показавшие высокий уровень экспрессии антител, переносили в лунки иммунологических планшетов, дорастивали в жидкой среде 2xYT-ГА до OD₆₀₀ 0.4, осаждали клетки центрифугированием и ресуспендировали в той же среде с добавлением 0.04 mM ИПТГ, но без глюкозы. После экспрессии рекомбинантных антител в течение 4 часов при комнатной температуре к суспензии добавляли 1 mM ФМСФ, 1 mM ЭДТА-Na₂, 1мкг/мл пепстатина А (указаны конечные концентрации), бактерий разрушали ультразвуком, дебрис осаждали центрифугированием планшетов при 2500 об/мин 30 мин и супернатант использовали для тестирования антиген-связывающей активности антител. В каждую лунку помещалась полоска нитроцеллюлозы с иммобилизованной рекомбинантной протеиназой. Поскольку при иммуноблоттинге использовались антитела к полигистидиновой последовательности, входящей в состав рекомбинантного антитела, для тестирования антител рекомбинантную протеиназу экспрессировали в векторе pRSETa, в котором полигистидиновая последовательность была заменена на последовательность FLAG (DYKDDDDK). Данная плазмида была любезно предоставлена сотрудником ВНИИХМ Долгих Е.А. В качестве

контрольного белка на нитроцеллюлозную мембрану наносили рекомбинантный экстраклеточный домен рецептора HER2 человека, экспрессированный в *E. coli* в составе того же вектора.

Наработку антител в большем объеме бактериальной культуры (50 мл) осуществляли по методике, использованной для анализа колоний в иммунологических планшетах. Клетки осаждали центрифугированием и разрушали ультразвуком на льду в 5 мл ТСБ с добавлением ФМСФ, пепстатина А и ЭДТА. После разрушения гомогенат центрифугировали 15 мин на холоду при 14 000 g и супернатант в небольших аликвотах хранили при -80°C .

ДСН-ПААГЭ и иммуноблоттинг. Отпрепарированные слюнные железы вредной черепашки *E. intrgriceps* выделяли из взрослых клопов, собранных в Краснодарском крае в 2013 и 2015 гг., гомогенизировали в микроцентрифужных пробирках с помощью пластикового пестика в присутствии ТСБ с добавлением ФМСФ, пепстатина А и ЭДТА. Полученный гомогенат центрифугировали 15 мин при 14000 g и супернатант использовали для приготовления проб.

Образцы зерна пшеницы, поврежденного вредной черепашкой, были получены из Саратовской области (сорт Джангаль, 2009 г.) и Турции (сорт Ege-88, 2004 г.). Неповрежденные зерна использовали в качестве контроля. Для приготовления проб белков поврежденного и контрольного зерна пшеницы приблизительно 150 мг муки каждого из вариантов ресуспендировали в 1 мл того же раствора, инкубировали в течение часа при 37°C , периодически перемешивая, и после осаждения нерастворимого материала центрифугированием при 14000 g 15 мин супернатант использовали для приготовления проб.

Полученные супернатанты смешивали с равным объемом 125 мМ Трис-Cl буфера содержащего 4% ДСН, 10% 2-меркаптоэтанол, 20% глицерина и инкубировали в течение 10 мин при 95°C . Белки разделяли с помощью ДСН-ПААГЭ в 12% геле с использованием камеры Mini-PROTEAN® (Bio-Rad) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану того же производителя с помощью вкладыша для блоттинга Mini-Trans-Blot® согласно

Результаты исследований

Переклонирование последовательностей, отобранных в результате трех раундов селекции, в экспрессирующий вектор позволило наработать рекомбинантные антитела в бактериях в растворимой форме и показать, что часть полученных трансформантов продуцируют антитела, распознающие протеиназу гНРЗе в ходе иммуноблоттинга. Из 96 проанализированных колоний приблизительно 10% трансформантов продуцировали антитела, специфично распознающие рекомбинантный белок, иммобилизованный на полосках нитроцеллюлозы. Выделение плазмидной ДНК из пяти положительных колоний-трансформантов, амплификация белок-кодирующих последовательностей с использованием праймеров pSEX Nco for (TGCTGCTGCTGGCAGCTCAG) и pSEX Not rev (TGATATCTTTGGATCCAG) и последующий рестрикционный анализ ПЦР-продуктов с помощью частощепящей рестриктазы *HaeIII* показали, что отобранные положительные трансформанты дают идентичный рисунок рестрикции (рис. 1) и продуцируют один тип антител.

Расшифровка белок-кодирующей последовательности в составе вектора pOPE 101 показала, что в состав рекомбинантного антитела входят VH и VL-фрагменты, состоящие, соответственно, из 130 и 116 аминокислотных остатков (рис. 2). BLAST-анализ аминокислотной последовательности VH выявил 84–85% идентичности с некоторыми вариантами переменных фрагментов иммуноглобулинов мыши (BAC54674.1, BAC54572.1), пред-

инструкции. Мембраны блокировали час в присутствии ТСБТ, 1% БСА, инкубировали ночь при 4°C с разбавленными тем же раствором 1:50 рекомбинантными антителами, выделенными из бактерий, и отмывали ТСБТ. Далее мембраны последовательно инкубировали 2 часа при комнатной температуре с моноклональными антителами к полигистидиновой последовательности (Sigma-Aldrich), разбавленными ТСБТ 1:2000, а затем с поликлональными антителами к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена (Bio-Rad), с промежуточной отмывкой ТСБТ. Обработку мембран поликлональными антителами к гНРЗе осуществляли по методике, описанной ранее [Dolgikh et al., 2011]. После отмывки в ТСБТ, а затем ТСБ мембраны инкубировали в свежеприготовленном растворе для проявления пероксидазной реакции содержащем ТСБ, 15% метанол, 0.05% 4-хлоро-1-нафтол (Sigma-Aldrich), 0.02% H_2O_2 .

Анализ последовательности, кодирующей отобранное антитело. Плазмидную ДНК выделяли из выращенных в 2xYT-ГА бактерий и последовательность в составе вектора pOPE, кодирующую отобранное рекомбинантное антитело, секвенировали с использованием праймеров AAGAGGAGAAATTAACCATGA (прямой) и TCATTAGCACAGGCCTCTAGA (обратный).

Иммобилизация scFv-антител на Ni-содержащей смоле и попытка выделения протеиназы из гомогената слюнных желез вредной верепашки. Рекомбинантные антитела, выделенные из 50 мл бактериальной культуры в 5 мл ТСБ с добавлением ФМСФ, пепстатина А и ЭДТА, инкубировали в течение ночи с 0.1 мл смолы HIS-Select® Nickel Affinity Gel (Sigma-Aldrich) при 4°C . После этого смолу отмывали ТСБ и продолжали инкубацию при тех же условиях с 3 мл растворимой фракции белков слюнных желез клопа вредная черепашка, приготовленную также как и при приготовлении проб для ДСН-ПААГЭ. После тщательной отмывки ТСБ связавшиеся белки элюировали в присутствии 0.3 М имидазола или 0.1 М триэтиламина с последующей нейтрализацией равным объемом 1 М Трис-Cl буфера (pH 7.4). Пробы анализировали с помощью иммуноблоттинга с использованием рекомбинантного или поликлональных антител.

ставленных на сайте Национального центра биотехнологической информации США (NCBI). Последовательность VL показала 97–96% идентичности с некоторыми вариантами переменных фрагментов каппа легких цепей иммуноглобулинов мыши (AAG12167.1, AAL24040.1). Наиболее близкое из представленных на сайте NCBI рекомбинантное антитело (CAB60133.1) имеет 74.4 и 95.4% идентичности, соответственно, для VH и VL-фрагментов. Таким образом, в результате выполненных исследований нами получено новое рекомбинантное антитело, не имеющее полной гомологии с какими-либо известными последовательностями.

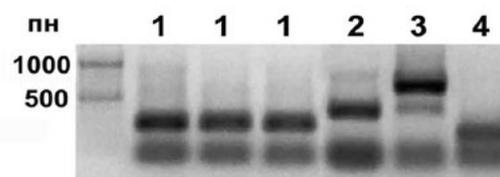


Рисунок 1. Анализ последовательностей ДНК, кодирующих scFv-фрагменты, с использованием частощепящей рестриктазы *HaeIII*. Плазмидную ДНК из различных колоний использовали для амплификации белок-кодирующих последовательностей с последующим рестрикционным анализом ПЦР-продуктов. Все трансформанты, продуцирующие специфичные к протеиназе антитела, показали идентичный рисунок рестрикции (обозначенные цифрой 1 дорожки). Дорожки 2–4 – другие варианты антител.

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAQVQLQQPGAELVRPSSVKLSCKTSGYTFSTYWLHWVKRRPGQGLEWIGNINPS
TGGTNSNEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARGNDGYPPYAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPKL
EEGEFSEARVDILMTQSQKFMSTSVGDRVSVTKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPQALIYSASYRYSGVPDRFTGS
GGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGGGKLEIKRADAAPTVAAGSEQKLISEEDLSHHHHHHH

Рисунок 2. Аминокислотная последовательность рекомбинантного scFv-фрагмента, специфичного к глютеин-гидролизующей протеиназе вредной черепашки, в составе вектора рОPE101. Варибельные фрагменты тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей иммуноглобулинов подчеркнуты, N-концевая сигнальная последовательность PeIb, ответственная за транспорт гетерологичного белка в периплазматическое пространство бактерий *E. coli*, и полигистидиновая последовательность выделены курсивом.

Имуноблоттинг показал, что отобранное рекомбинантное антитело распознает глютеин-гидролизующую протеиназу, накапливающуюся в слюнных железах вредной черепашки в виде предшественника (рис. 3, А, дорожка 1, верхняя мажорная полоса), а также его зрелую форму с удаленным пропептидом (рис. 3, А, дорожка 1, нижняя полоса). Идентичная картина наблюдалась и при анализе этой пробы с помощью полученных ранее поликлональных антител (иммунной сыворотки) к рекомбинантному белку rGHP3e (рис. 3, Б, дорожка 1). Отобранный scFv-фрагмент также подтвердил накопление зрелой формы протеиназы в пробах поврежденной клопом (рис. 3, А, дорожка 2), но не контрольной (рис. 3, А, дорожка 3) муки. Проведенный эксперимент ясно показал, что изучаемая протеиназа действительно выделяется вредной черепашкой в поврежденное зерно. Два типа независимо полученных антител распознают при иммуноблоттинге белков поврежденного зерна одну и ту же полосу, соответствующую по своему размеру зрелой форме протеиназы, присутствующей в слюнных железах клопа.

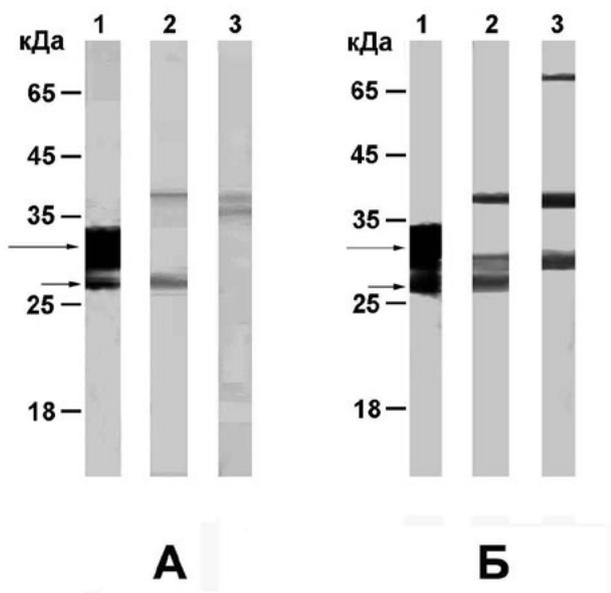


Рисунок 3. Иммуноблоттинг белков слюнных желез вредной черепашки (дорожки 1), поврежденной клопом (дорожки 2) и контрольной (дорожки 3) муки пшеницы с помощью отобранного scFv-фрагмента (А) и иммунной сыворотки к белку rGHP3e (Б). Длинная и короткая стрелки указывают на белковые полосы, соответствующие предшественнику и зрелой форме протеиназы.

На следующем этапе исследования представляло интерес выяснить, узнает ли полученный scFv-фрагмент протеиназу клопа в нативной конформации. При создании библиотеки (иммунизации мышей) и отборе фаговых ча-

стиц нами была использована денатурированная форма rGHP3e, полученная в ходе солюбилизации нерастворимых включений, часто образующихся при экспрессии гетерологичных белков в бактериях [de Groot et al. 2008]. Таким образом, распознаваемый рекомбинантным антителом эпитоп мог быть пространственно скрыт при нахождении протеиназы в нативной конформации.

Наличие полигистидиновой последовательности в С-концевой области рекомбинантной молекулы позволило успешно иммобилизовать наработанный в *E. coli* scFv-фрагмент на Ni-содержащей агарозной смоле His-Select Nickel Affinity Gel. Инкубация частиц агарозы с растворимой фракцией гомогената слюнных желез вредной черепашки и с растворимыми белками поврежденной клопами муки, отмывка смолы и элюция комплекса антиген-антитело в присутствии 0.3 М имидазола не привели к выделению нативного фермента. Во фракциях после элюции с помощью иммуноблоттинга было обнаружено лишь рекомбинантное антитело размером около 34 кДа (рис. 4, указано стрелкой).

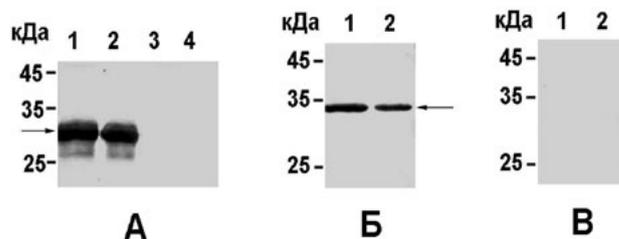


Рисунок 4. Инкубация белков слюнных желез *E. integriceps* и поврежденной вредной черепашкой муки с иммобилизованным на Ni-содержащей смоле scFv-фрагментом не привела к связыванию нативного фермента.

А. Растворимые белки слюнных желез (дорожка 1) инкубировали с иммобилизованным антителом и после промывки частиц агарозы от несвязавшегося материала (дорожка 2) элюцию комплекса антиген-антитело осуществляли в присутствии 0.3 М имидазола в виде двух фракций (дорожки 3 и 4). Перенесенные на нитроцеллюлозу белки анализировали с использованием иммунной сыворотки к rGHP3e. Стрелкой отмечена протеиназа, выявляемая во фракции белков слюнных желез.

Б, В. Растворимые белки поврежденной клопом муки инкубировали с иммобилизованным антителом и после промывки смолы от несвязавшегося материала элюцию осуществляли или в присутствии 0.3 М имидазола (дорожки 1) или в присутствии 0.1 М триэтиламина (дорожки 2).

Перенесенные на нитроцеллюлозу белки анализировали с использованием scFv-фрагмента и антител к полигистидиновой последовательности (Б) или с помощью иммунной сыворотки к rGHP3e (В). Стрелкой на изображении Б отмечен элюированный со смолы scFv-фрагмент, распознаваемый антителами к полигистидиновой последовательности.

Заключение

В данной работе мы получили рекомбинантное одноцепочечное антитело к обладающей глютеинин-гидролизующей активностью трипсин-подобной протеиназе клопа вредная черепашка и смогли доказать, что фермент действительно выделяется вредителем в эндосперм пшеницы, длительное время сохраняясь в поврежденном зерне в зрелой форме. Кроме того, мы получили данные о том, что отобранный scFv-фрагмент распознает протеиназу черепашки лишь в денатурированной форме и может быть использован для обнаружения фермента при иммуноблоттинге в сочетании с ДСН-ПААГЭ. Для дальнейшего изучения этого фермента, чрезвычайно важного как с практической, так и с научной точек зрения, необходимы новые

эксперименты, связанные с гетерологичной экспрессией протеиназы в нативной конформации. Ранее мы показали, что гетерологичная экспрессия фермента в дрожжевых грибах *Pichia pastoris* позволяет получить протеиназу в растворимой, нативной конформации, обладающую глютеинин-гидролизующей активностью [Долгих и др., 2014; Конарев и др., 2014]. В дальнейших экспериментах мы планируем использовать наработанный в *P. pastoris* фермент для получения новой высокопредставительной библиотеки рекомбинантных антител и приступить к поиску scFv-фрагментов, распознающих протеиназу в нативной конформации и способных ингибировать его глютеинин-гидролизующую активность.

Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, проект № 15-08-04247).

Библиографический список (References)

- Алехин В.Т. Вредная черепашка // Защита и карантин растений. 2002. N 4. С. 65(1)-91(27).
- Вилкова Н. А., Конарев А. В. Современные проблемы иммунитета растений к вредителям // Вестник защиты растений. 2010. N 3. С. 3–15.
- Гапонов С. Н., Васильчук Н. С., Шутарева Г. И. Влияние вредной черепашки (*Eurygaster integriceps* Put.) на качество зерна твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) // Аграрный вестник Юго-Востока. 2009. N 2. С. 23–26.
- Долгих В. В., Сендерский И. В., Конарев А. В. Получение и свойства рекомбинантных протеиназ *Eurygaster integriceps* Put., гидролизующих глютеинин // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. N 4. P. 1–9.
- Каменченко С.Е., Лебедев В.Б., Наумова Т.В. Вредоносность клопа вредная черепашка (*Eurygaster integriceps*) и качество зерна // Аграрный вестник Юго-Востока, 2010. N 1. С. 36–37.
- Капусткина А.В., Нефедова Л.И. Прорастание и морфогенез семян пшеницы при повреждении вредной черепашкой // Вестник защиты растений. 2013. N 2. С. 48–55.
- Конарев Ал.В., Долгих, В.В. Сендерский И.В., Нефедова Л.И., Конарев А.В., Губарева Н.К. Свойства нативных и рекомбинантных протеиназ слюнных желез клопа вредная черепашка (*Eurygaster integriceps* Put.), гидролизующих клейковину пшеницы // Вестник защиты растений. 2014. N 2. С. 3–16.
- Крупнов В. А. Селекция пшеницы на устойчивость к вредным клопам (*Eurygaster* spp.): нет ли риска? // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011. Т. 15. N 3. С. 572–578.
- Павлюшин В.А., Вилкова Н.А., Сухорученко Г.И., Нефедова Л.И. Капусткина А.В. Вредная черепашка и другие хлебные клопы. Санкт-Петербург.: 2015. 280 с.
- Albrecht H., DeNardo G.L., DeNardo S.J. Monospecific bivalent scFv-SH: Effects of linker length and location of an engineered cysteine on production, antigen binding activity and free SH accessibility // J. Immunol. Methods. 2006. V. 310. N 1–2. P. 100–116.
- Avrutina O., Fittler H., Glotzbach B., Kolmar H., Empting M. Between two worlds: a comparative study on in vitro and in silico inhibition of trypsin and matriptase by redoxstable SFTI-1 variants at near physiological pH // Organic and Biomolecular Chemistry. 2012. V. 10. N 38. P. 7753–7762.
- Critchley B.R. Literature review of sunn pest *Eurygaster integriceps* Put. (Hemiptera, Scutelleridae) // Crop Protection. 1998. V. 17. N 4. P. 271–287.
- de Groot N.S., Espargaró A., More M., Ventura S. Studies on bacterial inclusion bodies // Future Microbiol. 2008. V. 3. N 4. P. 423–435.
- Dolgikh V.V., Senderskiy I.V., Pavlova O.A., Naumov A.M., Beznoussenko G.V. Immunolocalization of an alternative respiratory chain in *Antonospora* (*Paranosema*) locustae spores: mitochondria retain their role in microsporidial energy metabolism // Eukaryotic cell. 2011. V. 10. N 4. P. 588–593.
- Dunaevsky Ya.E., Elpidina E.N., Vinokurov K.S., Belozersky M.A. Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects // Molecular Biology. 2005. V. 39. N 4. P. 60–8613.
- Fatehi F., Behamta M. R., Zali A.A. Evaluating the resistance to sunn pest (*Eurygaster integriceps* Put.) and its relationship with high-molecular-weight glutenin subunit in wheat. Proc. 11th Int. Wheat Genet. Symp., Brisbane, Australia, Sydney University Press, 2008, 3, p. 741–743.
- Ganesan R., Eigenbrot C., Kirchhofer D. Structural and mechanistic insight into how antibodies inhibit serine proteases // Biochem. J. 2010. V. 430. N 2. P.179–189.
- Gatehouse J.A. Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects // Current Protein and Peptide Science. 2011. V. 12. N 5. P. 409–416.
- Hariri G., Williams P.C., Jaby E.L., Hamein F. Influence of Pentatomidae insects on the physical dough properties and two layered flat-bread baking quality of Syrian wheat // J. Cereal Sci. 2000. V. 31. P. 111–118.
- Jamal F., Pandey P.K., Singh D., Khan M.Y. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators // Phytochemistry Reviews. 2012. P. 1–34.
- Konarev A.V., Anisimova I.N., GavriloVA V.A., Rozhkova V.T., Fido R., Tatham A.S., P. R. Shewry // Novel proteinase inhibitors in seeds of sunflower (*Helianthus annuus* L.): polymorphism, inheritance and properties // Theoretical and Applied Genetics. 2000. V. 100. N 1. P. 82–88.
- Konarev A.V., Beaudoin F., Marsh J., Vilkova N.A., Nefedova L.I., Sivri D., Koxsel H., Shewry P.R., Lovegrove A. Characterization of a glutenin-specific serine proteinase of sunn bug *Eurygaster integriceps* Put. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011. V. 59. N 6. P. 2462–2470.
- Luckett S., Garcia R.S., Barker J.J., Konarev A.V., Shewry P.R., Clarke A.R., Brady R.L. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds // Journal of molecular biology. 1999. V. 290. N. 2. P. 525–533.
- Sivri D., Sapirstein H. D., Bushuk W., Köksel H. Wheat intercultivar differences in susceptibility of glutenin protein to effects of bug (*Eurygaster integriceps*) protease // Cereal Chem. 2002. V. 79. N. 1. P. 41–44.
- Torbica A.M., Mastilović J. S., Pojić M.M., Kevrešan Ž.S. Effects of wheat bug (*Eurygaster* spp. and *Aelia* spp.) infestation in preharvest period on wheat technological quality and gluten composition // The Scientific World Journal. 2014. Article ID 148025 (<http://dx.doi.org/10.1155/2014/148025>). (Accessed 15.12.2016)
- Vaccino P., Corbellini M., Reffo G., Zoccatelli G., Migliardi M., Tavella L. Impact of *Eurygaster maura* (Heteroptera: Scutelleridae) feeding on quality of bread wheat in relation to attack period // Journal of Economic Entomology. 2006. V. 99. N 3. P. 757–763.
- Werteker M., Kramreither G. Relation between susceptibility to wheat bug attack and digestibility of glutenin // Journal of Cereal Science. 2008. V. 47. N 2. P. 226–232.
- Zoller F., Markert A., Askoxylakis V., Altmann A., Barthe P., Weichert W., Zhao W., Mier W., Haberkorn U. Combination of phage display and molecular grafting generates highly specific tumor-targeting miniproteins // Angewandte Chemie – Int. Edition. 2012. V. 51. N 52. P. 13136–13139.

Translation of Russian References

- Alekhin V.T. Sunn pest. Zashchita i karantin rastenii. 2002. N 4. P. 65(1)–91(27). (In Russian)
- Dolgikh V.V., Senderskiy I.V., Konarev A.V. Production and properties of recombinant glutenin-hydrolyzing proteinases from *Eurygaster integriceps*

- Put. Applied biochemistry and microbiology. 2014. V. 50. N 5. P. 433–440. (English translation).
- Gaponov S.N., Vasilchuk N.S., Shutareva G.I. Sunn pest (*Eurygaster integriceps* Put.) influence on Durum wheat (*Triticum durum* Desf.) grain quality. Agrarnyi vestnik Yugo-Vostoka. 2009. N 2. P. 23–26. (In Russian).
- Kamenchenko S.E., Lebedev V.B., Naumova T.V. Harmfulness of corn bug (*Eurygaster integriceps*) and grain quality. Agrarnyi vestnik Yugo-Vostoka. 2010. N 1. P. 36–37. (In Russian).
- Kapustkina A.V., Nefedova L.I. Germination and morphogenesis of wheat seeds damaged by *Eurygaster integriceps*. Vestnik zashchity rasternii, Saint Petersburg, 2013. N 2. P. 48–55. (In Russian).
- Konarev A.I.V., Dolgikh V.V., Senderskii I.V., Nefedova L.I., Konarev A.V., Gubareva N.K. Properties of natural and recombinant Sunn pest (*Eurygaster integriceps*) salivary gland proteinases hydrolyzing wheat gluten. Vestnik zashchity rasternii, Saint Petersburg, 2014. N2. P. 3–16. (In Russian).
- Krupnov V.A. Wheat Breeding for resistance to harmful bugs (*Eurygaster* spp.): Are there risks? Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii. 2011. V. 15. N 3. P. 572–578.
- Pavlyushin V.A., Vilkoval N.A., Sukhoruchenko G.I., Nefedova L.I., Kapustkina A.V. Sunn pest and other grain bugs. Saint Petersburg. 2015. 280 p. (In Russian).
- Vilkoval N.A., Konarev A.V. Modern problems of immunity of plants to pests. Vestnik zashchity rasternii, Saint Petersburg, 2010. N 3. P. 3–15. (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 1(91), p. 21–26

RECOMBINANT SINGLE CHAIN ANTIBODIES AS IMPLEMENT FOR DETECTION AND STUDYING *EURYGASTER INTEGRICEPS* PROTEINASES HYDROLYZING GLUTEN

V.V. Dolgikh, A.A. Tsarev, I.V. Senderskiy, S.A. Timofeev, A.V. Konarev

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

Wheat bugs of genus *Eurygaster* Lap. cause great damage to the quality of wheat in Russia and abroad. Proteases of the salivary glands of such bug as sunn pest *Eurygaster integriceps*, hydrolyzing the basic proteins of wheat gluten (gliadins and glutelins), are important factors of harmfulness. In previous studies, we over-expressed *E. integriceps* gluten-hydrolyzing proteinase GHP3 in bacteria *E. coli*. Here we have constructed the library of single chain antibodies (scFv-fragments) on the basis of variable fragments of immunoglobulins of mice immunized with recombinant proteinase. Phage display technology has enabled us to select the mini-antibody specifically recognizing GHP3 in samples of bug salivary glands. Immunoblotting using scFv-fragment has also confirmed the presence of minor amounts of the enzyme in damaged grain. The prospects of use of single-chain recombinant antibodies for further study of bug proteinases, as well as for construction of inhibitors of their glutenin-hydrolyzing activity are discussed.

Keywords: Sunn pest; *Eurygaster integriceps*; salivary gland; damaged grain; gluten; glutenin; proteinase; single chain antibody; phage display; inhibitor; immunodiagnosics.

Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация

*Долгих Вячеслав Васильевич. Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: dol1slav@yahoo.com

Царев Александр Александрович. Студент СПбГУ, e-mail: alexandretsarev@gmail.com

Сендерский Игорь Вадимович. Младший научный сотрудник, e-mail: sen54@mail.ru

Тимофеев Сергей Александрович. Ведущий инженер, e-mail: ts-bio@yandex.ru

Конарев Александр Васильевич. Ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, e-mail: al_konarev@hotmail.com

Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation

*Dolgikh Viacheslav Vassiljevich. Leading Researcher, PhD in Biology, e-mail: dol1slav@yahoo.com

Tsarev Alexandr Alexandrovic. Student, Saint-Petersburg State University, e-mail: alexandretsarev@gmail.com

Senderskiy Igor Vadimovich. Researcher, e-mail: sen54@mail.ru

Timofeev Sergey Alexandrovich. Leading Engineer, e-mail: ts-bio@yandex.ru

Konarev Alexander Vasilievich. Leading Researcher, DSc in Biology, e-mail: al_konarev@hotmail.com

* Ответственный за переписку

* Responsible for correspondence

УДК: 632.38:635.21

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПЕРЕНОСА У ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ ХИЩНЫМ КЛОПОМ *ORIUS MAJUSCULUS* REUTER (HEMIPTERA, ANTHOCORIDAE) И ОБЫКНОВЕННОЙ ЗЛАКОВОЙ ТЛЕЙ *SCHIZAPHIS GRAMINUM* RONDANI (HOMOPTERA: APHIDIDAE)

И.М. Пазюк, Т.С. Фоминых, К.Д. Медведева

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт Петербург

В защите овощных культур закрытого грунта часто применяются хищный клоп *Orius majusculus* и обыкновенная злаковая тля *Schizaphis graminum*: первого выпускают против сосущих вредителей, вторую предлагают на растениях-накопителях в качестве источника дополнительного питания для различных энтомофагов. В лабораторных условиях нами была проведена оценка возможности переноса У вируса картофеля этими насекомыми с целью их дальнейшего использования в системе защитных мероприятий меристемного картофеля от вредителей. В результате было показано,

что хищный клоп *O. majusculus* не переносил Y вирус картофеля. Напротив, обыкновенная злаковая тля *Schizaphis graminum* переносила Y вирус картофеля как на растения табака, так и на растения картофеля сортов Импала, Удача и Ред Скарлетт, причем в некоторых случаях достоверно чаще, чем контрольный вид – *Myzus persicae*. Таким образом, необходимо воздержаться от применения в теплицах растений-накопителей с обыкновенной злаковой тлей при выращивании меристемного картофеля.

Ключевые слова: биологический метод, переносчики вирусов, Y вирус картофеля, *Orius majusculus*, *Schizaphis graminum*, *Myzus persicae*.

В настоящее время в связи с развитием отечественного производства безвирусного семенного картофеля в промышленных теплицах актуальной задачей является разработка биологической защиты этой культуры от вредных организмов, среди которых важное место занимают сосущие вредители – переносчики вирусов. На культуре картофеля в теплицах необходимо создать систему долгосрочного превентивного биологического контроля, который обеспечит полное отсутствие переносчиков вирусов. При этом сами агенты биологического контроля должны быть безопасны для безвирусного картофеля. Это требование определяет критерии скрининга энтомофагов и выбор технологий их применения [Белякова, Поликарпова, 2016].

В Российской Федерации картофель поражают 10 вирусов. Наиболее вредоносны пять: Y вирус картофеля, YBK (Potato virus Y, PVY); X вирус картофеля, XBK (Potato virus X, PVX); S вирус картофеля, SBK (Potato virus S, PVS); M вирус картофеля, MBK (Potato virus M, PVM); вирус скручивания листьев картофеля, ВСЛК (Potato leaf roll virus, PLRV). Еще пять вирусов имеют меньшее значение по широте распространения в России и степени вредоносности: A вирус картофеля, ABK (Potato virus A, PVA); вирус аукуба мозаики картофеля, ВАМК (Potato aucuba mosaic virus, PAMV); вирус метельчатости верхушки картофеля, ВМК (Potato mop top virus, PMTV); вирус погремковости табака, «ратлл вирус», ВПТ (Tobacco rattle virus, TRV); вирус черной кольцевой пятнистости томатов, ВЧКПТ (Tomato black ring virus, TBRV) [Анисимов, 2010].

Повсеместное распространение и наиболее ощутимый ущерб картофелеводству в настоящее время причиняет *Potato virus Y* (PVY), Y вирус картофеля (YBK) (род *Potyvirus*, сем. *Potiviridae*), поражение которым в годы эпифитотий снижает урожайность на 56% [Вайдемманн и др., 1999; Рогозина и др., 2012], а пораженность таких высокотоварных сортов как Ред Скарлетт и Импала достигает 85% и 95% соответственно [Фоминых и др., 2017]. Семейство *Potyviridae* является одним из наиболее многочисленных и объединяет более 30% известных фитовирусов. В составе семейства 190 видов, сгруппированных в 8 родов, из которых самый представительный – *Potyvirus*. Вирионы нитевидной формы размерами 680–900 × 11 нм, со спиральной симметрией и шагом спирали 3.4 нм. Температура инактивации 50–62 °С, точка предельного разведения 10, длительность сохранения в соке при 18–22 °С от 7 до 50 дней. Вирус имеет широкий круг хозяев, поражает растения 9 семейств, в том числе представителей 9 родов *Solanaceae* [Лебенштейн и др., 2000].

Симптомы поражения Y вирусом на картофеле варьируют в зависимости от сорта, штамма вируса и условий выращивания. На некоторых сортах развивается резкий некроз вдоль жилок, причем листья нередко могут отмирать полностью. Некротические явления иногда сопровождаются мозаикой и морщинистостью листьев. Морщинистость может развиваться и без некрозов, разные типы

мозаичности нередко связаны со смешанной инфекцией X- и Y-вирусов картофеля. Выделено три группы штаммов по характеру симптомов на *Nicotiana* sp., *Physalis pubescens* L. и картофеле: PVY⁰, PVY^N, PVY^{NTN}. Обыкновенный PVY⁰ распространен во всех странах, некротический PVY^N – поражает картофель в Европе, странах Африки и Южной Америки и PVY^C – штамм, обнаруженный в Европе, Австралии и Индии. Изоляты, относящиеся к некротическому штамму, как правило, вызывают менее заметные симптомы поражения на листьях растений картофеля, нежели изоляты обыкновенного штамма. Некротический штамм подразделяют на группы PVY^N, PVY^{NTN} и PVY^{N-wi}. Изоляты группы PVY^{NTN} вызывают появление некрозов в мякоти клубней. Изоляты группы PVY^{N-wi} серологически сходны с изолятами обыкновенного штамма PVY⁰. Полагают, что их геном – результат рекомбинации между изолятами некротического и обыкновенного штаммов. Рекомбинационные события среди изолятов PVY произошли сравнительно недавно, как результат специализации патогена к паразитированию на определенных сортах картофеля [Visser et al., 2012; Рогозина и др., 2016].

Y вирус картофеля распространяется контактно от растения к растению и семенами. Но в естественных условиях он также может распространяться такими видами тлей, как *Aphis fabae*, *A.nasturtii*, *Myzus persicae*. Известно, что более 50 видов тлей могут переносить Y вируса картофеля. При исследовании причин эпидемий, вызванных YBK в последние 30 лет в Европе, было показано, что еще более 30 видов тли передают этот вирус. По крайней мере 12 видов тлей могут заселять и размножаться на картофеле как на растении – хозяине [Kennedy, 1962; Сухорученко и др., 2016]. По характеру взаимоотношений с тлями вирус относится к неперсистентным. В эксперименте инфекция также передается соком. Вирус сохраняется в клубнях картофеля, а также в многолетних растениях, в том числе в сорных растениях [Самсонова и др., 2001]. Вирус поражает не только картофель, он также выделен из перца, баклажана, томата, табака и др. растений [Амбросов, 1975]. В условиях эксперимента вирусом инфицируются более 400 видов из 30 семейств [Edwardson, Christie, 1997].

Борьба с такими инфекциями как Y вирус является одной из важных задач в семеноводстве картофеля [Симаков, Анисимов, 2006]. Она включает в себя микрклональное размножение картофеля, введение в систему клонового отбора высокочувствительных методов диагностики, таких как иммуноферментный анализ (ИФА), уничтожение переносчиков инфекции [Трофимец, 1990; Созонов, 2005; Анисимов, 2010; Замалиева, 2013]. Это так же и оздоровление растений, например, путем обработки низкомолекулярным фитоактивным хитозаном и салициловой кислотой [Евстигнеева и др., 2012].

Для биологической защиты меристемного картофеля должны быть отобраны насекомые, которые не переносят Y вирус от растения к растению. Потенциальными пере-

носчиками вирусов служат хищные клопы, которые откладывают яйца в ткань растения и питаются растительными соками. Кроме того, очевидна необходимость оценки векторной активности злаковой тли *Schizaphis graminum* Rondani (Homoptera: Aphididae), которую широко используют в теплицах на овощных и цветочных культурах при профилактической колонизации специализированных афидофагов (галлицы-афидимизы, наездников-афидиид).

Одним из объектов нашего исследования был хищный клоп *Orius majusculus* Reut. (Hemiptera, Anthocoridae), так как он весьма перспективен для применения в защите меристемного картофеля в закрытом грунте. *O. majusculus* распространен в Палеарктике: юг ареала находится в северной части Африки, северная его граница доходит до Швеции. Он распространен в Европе, в Центральной Европейской и на юге Европейской части Российской Федерации, встречается на Ближнем востоке. Восточная часть ареала достигает Дальнего Востока Российской Федерации [Pericart, 1996]. В 2008 году вид впервые был описан в Канаде [Henry, 2008]. *O. majusculus* – хищник полифаг, питающийся различными видами тлей, в том числе *Myzus persicae* [Carayon, Steffan 1959; Strawinski 1964; Hejzlar, Kabicek, 2000; Henaut et al, 2000; Messelink et al., 2011, 2013], паутиными клещами, яйцами чешуекрылых [Pericart, 1972], трипсами, в том числе *Frankliniella occidentalis* Pergande и *Thrips tabaci* Lind. [Fischer et al. 1992; Riudavets, Castane, 1998], белокрылками видов *Trialeurodes vaporariorum* Westwood и *Bemisia tabaci* Gennadius [Montserrat et al., 2000; Arno et al., 2008]. Он отмечен и как питающийся пыльцой [Buhl, Bassler, 1992], и соком растений [Cocuzza et al., 1997]. Этот хищник в агробиоценозе обитает на перце, огурце, дыне, бобах, клубнике и других [Arno et al., 2008].

Второй объект нашего исследования – *Schizaphis graminum* – обыкновенная злаковая тля – распространена в южных районах России. Граница ареала простирается на север до Москвы, охватывает Закавказье, юг Сибири, Среднюю Азию, Южное Приморье. Этот вредитель обитает в Южной Европе, Африке, Передней, Малой и Центральной Азии, Северной и Южной Америке, Японии [Васильев, 1987]. Наибольшая вредоносность обыкновенной злаковой тли проявляется в степной и лесостепной зонах: на Северном Кавказе, в Поволжье, в Центральной Черно-

земной зоне, Крыму, на Украине. *S. graminum* – олигофаг, вредит зерновым злакам. Тли образуют колонии и высасывают сок из надземных органов растений. Повреждают ячмень, овес, пшеницу, сорго, просо, рис, рожь, кукурузу, джугару, и многие дикорастущие злаки. Локализуется на листьях, стеблях и листовых влагалищах [Бондаренко и др., 1983].

Обыкновенная злаковая тля переносит вирусы желтой карликовости ячменя и мозаики костра безостого [Орлов, 2006; Маркелова, Кириллова 2009]. По данным полевых и лабораторных тестов по переносу с помощью ловушек, обыкновенная злаковая тля также может быть переносчиком Y вируса картофеля [Perez et al., 1995; Halbert et al., 1999], но авторы не указывают эффект переноса.

Обыкновенную злаковую тлю успешно используют при разведении в лаборатории таких полезных насекомых-афидофагов как, например, *Leis dimidiata* Fabr. [Семьянов, 1996], *Hippodamia convergens* Guerin-Meneville [Phoofolo et al., 2007], *Aphidoletes aphidimyza* Rondani [Бондаренко, Воронова, 1989], *Aphidius colemani* Vier [Elliott et al., 1994; Коржова, 2008], а также разводят на растениях-накопителях (растениях-резерватах; banker plants) в качестве источника для поддержания популяций энтомофагов в теплицах при выращивании овощных культур [Rodrigues et al., 2001; Kim, Kim, 2004; Козлова, 2009]. Сама технология применения растений-накопителей для колонизации полезных насекомых в промышленных теплицах в настоящее время заняла важное место в практике биометода, позволяя не только поддерживать высокую численность выпущенных энтомофагов, но и привлекать природные местные виды полезных насекомых [Pineda, Marcos-Garsia, 2008; Frank 2010; Huang et al., 2011]. Таким образом, встает вопрос об использовании обыкновенной злаковой тли на растениях-накопителях при защите меристемного картофеля от сосущих вредителей – переносчиков вирусов.

Так как в эпидемиологической и экономической литературе насекомые отмечены как один из основных факторов переноса вирусов растений [Aramburu et al., 2010], мы поставили перед собой задачу определить возможность передачи клопом *O. majusculus* Y вируса картофеля на растениях табака и картофеля. А также определить эффект переноса (%) Y вируса картофеля злаковой тлей *S. graminum*.

Материалы и методы

Оценка переноса Y вируса картофеля осуществлялась на модельном виде табака *Nicotiana tabacum* v. Samsun 959, а так же трех сортах картофеля: Удача, Ред Скарлетт и Импала.

Для заражения табака и картофеля был взят изолят Y вируса, выделенный из картофеля сорта Ред Скарлетт (Харабинский район Астраханской области). По симптомам на *Nicotiana tabacum* v. Samsun был отнесен к некротической группе Y^N, которые проявлялись в виде жилкового некроза.

Сорт Удача – отечественной селекции (ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха), высокоурожайный (порядка 40–45 т/га), устойчив к переувлажнению, мокрым и сухим гнилям, раку, парше, мозаичным вирусам, фитофторозу клубней, ризоктониозу, механическим повреждениям [http://sortoved.ru/]. Ред Скарлетт – голландский столовый сорт картофеля, широко распространенный в центральных и южных регионах России. Имеет высокий урожайный потенциал, обеспечивая до 60 т/га. Он обладает хорошим иммунитетом к наиболее известным вирусным заболеваниям, в том числе к вирусу PVY^N, раку, слабоустойчив

к альтернариозу и парше обыкновенной, обладает высокой чувствительностью к фитофторозу ботвы, но в то же время хорошей устойчивостью к фитофторозу клубней [http://sortoved.ru/]. Сорт Импала селекции фирмы AGRICO В.А. (Нидерланды), среднеурожайный (18–36 т/га), устойчив к различным вирусам, в том числе к вирусу А, вирусу Y^N, вирусу курчавости листьев, устойчив к раку, среднеустойчив к фитофторозу ботвы и клубней, к обыкновенной парше [http://alen-agro.ru/].

Семена табака высевали в почвогрунт Terra Vita при температуре 23 °C и фотопериоде 17L:7D. Через 3 недели рассаду табака пикировали в горшки 0.5 л в почвогрунт Terra Vita. Полив растений осуществляли 3 раза, подкормка NPK раз в неделю. Меристемный картофель трех сортов (Удача, Ред Скарлетт и Импала), выращиваемый на питательной среде в течение одного месяца, из пробирок пикировали в почвогрунт Terra Vita в горшки объемом 0.5 л при температуре 23 °C и фотопериоде 16L:8D. Растения заглубляли, оставляя на поверхности пару настоящих листьев. Полив растений осуществляли трижды в неделю, под-

кормка NPK – раз в неделю. По мере роста растений в горшки подсыпали почву.

Безвирусную лабораторную культуру хищного клопа *Orius majusculus* содержали в пластиковых контейнерах в термостатированной комнате при температурах +22+24 °С, влажности воздуха 50–60%, фотопериоде 16L:8D. Пищей для личинок и имаго клопа служили яйца зерновой моли *Sitotroga cerealella* Oliv. и злаковая тля *Schizaphis graminum*. Для экспериментов эксгаустером отбирали 4–6 - дневных самцов и самок ориуса.

Безвирусные лабораторные культуры тлей *S. graminum* и *Myzus persicae* содержали в термостатированной комнате при температурах +22+24 °С, влажности воздуха 50–60%, фотопериоде 16L:8D. Злаковую тлю *S. graminum* разводили на растениях пшеницы по методике Н.А. Попова, Ю.В. Белоусова, [1988], периковую тлю *M. persicae* разводили на растениях бобов по методике В.П. Семьянова [1974]. В наших исследованиях тля *M. persicae* использовалась в качестве контрольного объекта как наиболее важный переносчик Y вируса картофеля [Halbert et al., 1999].

Эксперимент

Оценку переноса ориусами Y вируса картофеля проводили в термостатированной комнате при температуре 23 °С и фотопериоде 17L:7D в садках, отдельно от выращиваемой лабораторной культуры. За 24 часа до начала эксперимента группы хищных клопов ориусов помещали в чашки Петри без пищи с целью выровнять в популяции реакцию на питание.

В садки из органзы (40 x 60 x 40 см) помещали по периметру интактные растения табака либо картофеля: по 6 и по 10 растений на садок соответственно. В центр каждого садка помещали растения табака, зараженные Y вирусом картофеля. Далее в центр садка на зараженные растения выпускали группу хищных клопов, из расчета 12 взрослых особей на интактное растение. Клопам в течение последующих 48 часов позволяли беспрепятственно передвигаться внутри садка, с зараженных на интактные растения (аналогично методике, описанной J. Aramburu et al. [2010]), после чего садки вскрывали, клопов отлавливали и подсчитывали количество живых особей на зараженных, интактных

растениях и внутри на стенках садка. При этом определяли долю выживших хищников.

При оценке возможности переноса Y вируса злаковой тлей использовали бескрылые формы, которые перед постановкой опыта тонкими кисточками переносили в чашки Петри на увлажненную фильтровальную бумагу для голодания в течение часа. После голодания тлей пересаживали на инфицированные растения (по 5 особей на лист), где их выдерживали в течение часа предоставляя возможность питаться. Затем тлей переносили кисточкой на здоровые растения табака либо картофеля, находящиеся в садках (40 x 60 x 40 см), из расчета 20 особей на растение. Тля питалась на здоровых растениях в течение последующих 48 часов, беспрепятственно передвигалась, после чего садки вскрывали и подсчитывали количество живых особей тлей на растениях и внутри на стенках садка. При этом определяли долю выживших особей.

Одновременно с оценкой возможности переноса Y вируса картофеля злаковой, периковой тлей и ориусом были заражены растения картофеля трех сортов (Ред Скарлетт, Импала, Удача) механическим способом.

Испытуемые растения после проведения эксперимента с насекомыми подвергались уходу, как описано выше еще в течение 2–3 недель до оценки внешних признаков проявления Y вируса, а так же проведения иммуноферментного анализа *ELISA-test*.

Содержание антигенов вируса в растениях определяли методом иммуноферментного анализа по сэндвич-варианту с использованием реагентов ВНИИ картофельного хозяйства им. А.Г. Лорха. Оценку результатов ELISA-тест проводили с помощью вертикального фотометра при длине волны 450 нм без остановки реакции серной кислотой [Трофимец и др., 1986, 1989; Barker et al., 1993]. При визуальной оценке результатов анализа, дающей информацию «да» или «нет», применяли следующую шкалу: растение здоровое – едва заметное окрашивание, как в отрицательном контроле; растение зараженное – хорошо заметное окрашивание, отличное от отрицательного контроля. Обработка данных проводилась в программе SYSTAT 12.0.

Результаты и обсуждения

В результате опытов с хищными клопами по переносу Y вируса выживаемость особей через 48 часов пребывания на растениях табака составила 39%, на растениях картофеля – 45%, 57% и 73% для сортов Удача, Ред Скарлетт и Импала соответственно. Таким образом, часть хищников имела возможность в течение вышеуказанного периода передвигаться и потреблять сок растений внутри садков. Хищникам во время эксперимента не предоставлялась животная пища, чтобы их стимулировать к поиску пищи и пробам растений. На растениях картофеля процент выживших особей был выше, чем на растениях табака – вероятно из-за меньшей опушенности, которая может препятствовать передвижению этих мелких (2.5–3 мм) по форме тела плоских хищников.

В опыте с периковой (контроль) и злаковой тлями по переносу Y вируса картофеля выживаемость особей через 48 часов пребывания на растениях табака составила 23% и 12% соответственно. На картофеле выживаемость злаковой тли составила 20%, 14% и 23% для сортов Удача, Ред Скарлетт и Импала, соответственно, выживаемость периковой тли составила 39%, 20% и 30% соответственно. Доля выживших особей периковой тли оказалась невысокой, вероятно в связи с ее адаптацией к питанию на растениях бобов, на которых культуру периковой тли выращивали в течение нескольких десятилетий до проведения эксперимента. Обыкновенная злаковая тля выживала

хуже из-за полной непригодности растений табака и картофеля для ее питания.

Визуальный осмотр экспериментальных растений табака и картофеля спустя 2–3 недели после заселения их хищными *O. majusculus* показал отсутствие каких-либо проявлений Y вируса как на растениях табака, так и на растениях картофеля изучаемых сортов (Удача, Ред Скарлетт и Импала). Проведенный иммуноферментный ELISA-тест так же не выявил наличие Y вируса в тканях растений (табл. 1, 2). В положительном контроле, где растения подвергались механическому заражению вирусом спустя 3 недели, были отмечены признаки вирусной инфекции и отмечено наличие вируса в тканях как растений табака, так и растений картофеля в 100% случаев.

Отрицательный результат переноса Y вируса свидетельствует о том, что *O. majusculus* не является переносчиком этого вируса в данных условиях, как на растениях табака, так и картофеля сортов Удача, Ред Скарлетт и Импала. Хищный клоп *O. majusculus* в принципе может быть переносчиком вирусов и в литературе отмечены случаи переноса им вируса *Parietaria mottle virus* (PMoV) в вегетационных опытах с *Parietaria officinalis* на *Licapersicum esculentum*, *Nicotiana benthamiana* и *N. tabacum* [Aramburu et al., 2010]. Таким образом, именно в отношении Y вируса картофеля данный энтомофаг, по всей видимости, может

быть безопасным для применения его в биологической защите меристемного картофеля.

Визуальный, иммуноферментный анализ и статистическая обработка полученных данных показали, что злаковая тля, так же как и персиковая тля, могут переносить Y вирус картофеля как на табак, так и на картофель. Процент передачи вируса на табаке *Nicotiana tabacum* v. Samsun 959 составил 40% – 90% и различия по переносу вируса между двумя видами тлей не были существенными (табл.1) ($df=1$, $p=0.079$), хотя обнаруживается статистическая тенденция более частого переноса Y вируса персиковой тлей.

Таблица 1. Результаты оценки возможной передачи YBK *O. majusculus*, *M.persicae*, *S. graminum* на *Nicotiana tabacum* v. Samsun 959 методом ELISA-тест (в лабораторных условиях)

№ повторности (№ растения п/п)	Возможные переносчики YBK		
	<i>Orius majusculus</i>	<i>Myzus persicae</i>	<i>Schizaphis graminum</i>
1	–	+	+
2	–	+	+
3	–	+	–
4	–	+	–
5	–	+	–
6	–	–	–
% передачи Y вируса	0%	90% a*	40% a

+, – – положительный либо отрицательный результат ИФА (ELISA-test)

* – значимых различий между двумя видами тлей (по χ^2 Пирсона) нет

Таблица 2. Результаты оценки возможной передачи YBK *O. majusculus*, *M.persicae*, *S. graminum* методом ELISA-тест на сортах меристемного картофеля Ред Скарлетт, Импала, Удача

№ повторности (№ растения п/п)	Возможные переносчики YBK								
	<i>Orius majusculus</i>			<i>Myzus persicae</i>			<i>Schizaphis graminum</i>		
	Ред Скарлетт	Импала	Удача	Ред Скарлетт	Импала	Удача	Ред Скарлетт	Импала	Удача
1	–	–	–	–	+	+	+	+	+
2	–	–	–	–	–	–	+	+	+
3	–	–	–	–	–	–	+	+	+
4	–	–	–	–	–	–	+	+	+
5	–	–	–	–	–	–	–	–	+
6	–	–	–	–	–	–	–	–	+
7	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8	–	–	–	–	–	–	–	–	–
9	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10	–	–	–	–	–	–	–	–	–
% передачи Y вируса	0%	0%	0%	0% a*	10% a	10% a	40% b	40% a	60% b

+, – – положительный либо отрицательный результат ИФА (ELISA-test)

* – различия значимы между двумя видами тлей по каждому сорту картофеля при $p<0.5$ (по χ^2 Пирсона)

Отметим также, что *M. persicae* является широким полифагом, способным поражать более 900 культурных и дикорастущих видов растений [Жук, 2014]. По сравнению с ней, *S. graminum* имеет значительно более узкую пищевую специализацию, питаясь лишь на злаковых [Бондаренко и др., 1983]. При посадке в экспериментальных условиях на растения картофеля особи обоих видов начинали опробовать субстрат для удовлетворения пищевых потребностей. Вероятно, при этом насыщение чаще происходило у персиковой тли, она реже передвигалась по растениям в поиске пищи и, поэтому, могла в меньшей степени передать вирус от растения к растению. В то же время для злаковой тли питание на картофеле, по всей видимости,

При оценке передачи YBK на картофеле отмечена существенная разница между двумя видами тлей (табл. 2). Так, при анализе переноса Y вируса на растения сорта Ред Скарлетт оказалось, что персиковая тля не заразила растения (0%) в отличие от злаковой тли, доля зараженных растений при заселении которой составила 40% ($df=1$, $p=0.025$).

В варианте с сортом Импала доля зараженных персиковой тлей растений составила 10%, а злаковой тлей – 40%. Статистический анализ показал отсутствие различий между эффектом переноса для этих видов тлей ($df=1$, $p=0.121$). При питании на сорте Удача было показано, что злаковая тля значительно чаще переносила Y вирус (60%) по сравнению с персиковой тлей (10%) ($df=1$, $p=0.019$). Таким образом, в двух вариантах из трех (при питании на сортах Ред Скарлетт и Удача) злаковая тля переносила Y вирус картофеля чаще, чем персиковая тля.

Из литературных данных известно, что персиковая тля способна переносить Y вирус картофеля, и зараженность растений при этом варьирует в широких пределах – от 14% до 90%, если время питания на больном растении составляет от 5 секунд до 2 минут, а время голодания до проведения эксперимента – 4 часа [Амбросов, 1975]. Такая методика укладывается в рамки проведенного нами эксперимента (см. материалы и методы), а результаты вполне согласуются с полученными нами.

приводило к постоянному поиску и более частым пробам субстрата, что и смогло в конечном счете привести к более широкому распространению вируса.

Таким образом, оценивая способность к переносу Y вируса обыкновенной злаковой тлей (*S. graminum*) на меристемном картофеле можно прийти к заключению о необходимости исключить растения-накопители из технологии применения афидофагов на данной культуре.

Перенос Y вируса хищным клопом *O. majusculus* нами не выявлен, поэтому данный энтомофаг может быть рекомендован для использования в системе биологической защиты меристемного картофеля в теплицах.

Библиографический список (References)

- Амбросов А.Л. Вирусные болезни картофеля и меры борьбы с ними // А.Л. Амбросов. Издательство «Ураджай». 1975. 208 с.
- Анисимов Б.В. Вирусные болезни и их контроль в семеноводстве картофеля / Б. В. Анисимов // Защита и карантин растений. 2010. N 5. С. 12–18.
- Белякова Н.А. Скрининг энтомофагов для защиты семенного картофеля от тлей-переносчиков вирусов в современных теплицах / Н.А. Белякова, Ю.Б. Поликарпова // Вестник защиты растений. 2016. N 4. С.45–50.
- Бондаренко Н.В. Галица афидимиза: методика массового разведения и применения против тлей на тепличных овощных культурах / Н.В. Бондаренко, О.В. Воронова // под ред. Н.А. Филиппова. Сборник научных трудов: Биологический метод борьбы с вредителями овощных культур. Москва ВО Агропромиздат. 1989. С. 8–19.
- Бондаренко Н.В. Общая и сельскохозяйственная энтомология // Н.В. Бондаренко, С.М. Пospelов, М.П. Персов. Москва: Колос. 1983. 415 с.
- Вайдемманн Х.Л. Новый опасный штамм Y вируса картофеля в Европе / Х.Л. Вайдемманн, Д. Шпаар, Ж.В. Блоцкая // Известия академии аграрных наук Республики Беларусь. 1999. N 1. С. 48–51.
- Васильев В.П. Вредители сельскохозяйственных культур и лесных насаждений / В.П. Васильев // В 3-х т. Под общ. ред. В.П. Васильева. Т. 1. Вредные нематоды, моллюски, членистоногие. Ред. тома В.Г. Долин. К.: Урожай. 1987. 440 с.
- Евстигнеева Т.А. Действие фитоактивного хитозана и салициловой кислоты на устойчивость растений картофеля к вирусу Y // Т.А. Евстигнеева, Н.А. Павлова, С.Л. Тютюрев // Вестник защиты растений. 2012. N 2. С. 27–33.
- Жук Р.Ю. Поведение тли *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) в Т-образном лабиринте при тестировании ее трофических предпочтений / Р.Ю. Жук // Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства. 2014. Т.2. N 7. URL: <http://cyberleninka.ru/article/n/povedenie-tli-myzus-persicae-sulzer-1776-v-t-obraznom-labirint-pri-testirovanii-eyo-troficheskikh-preferentsiy> (дата обращения: 19.02.2017).
- Замалиева Ф.Ф. Борьба с вирусными болезнями картофеля / Ф.Ф. Замалиева // Защита и карантин растений. 2013. N 3. С. 17–21.
- Козлова Е.Г. Энтомофаги в защите зеленных культур при возделывании на салатных линиях / Е.Г. Козлова // Защита и карантин растений. 2009. N 5. С. 23–25.
- Коржова В. И. Технология массового разведения *Aphidius colemani* Vier. / В. И. Коржова // Защита и карантин растений. 2008. N 1. С. 31–32.
- Лебенштейн Г. Вирусные и вирусоподобные болезни и семеноводство картофеля / Г. Лебенштейн, Ф.Х. Бергер, А.А. Брант, Р.Х. Лоусон // Санкт-Петербург. Пушкин. ВИЗР. 2000. 275 с.
- Маркелова Т.С. Симптомы вирусных, микоплазменных и неинфекционных болезней пшеницы в Поволжье / Т.С. Маркелова, Т.В. Кириллова // Аграрный Вестник Юго-Востока. 2009. N 1. С. 34–35.
- Орлов В.Н. Вредители зерновых колосовых культур // В.Н. Орлов. Москва: Печатный город. 2006. 104 с.
- Попов Н.А. Методика массового разведения хищной галлицы на злаковых тлях / Н.А. Попов, Ю.В. Белоусов // Применение биологических методов защиты растений в сельскохозяйственном производстве. Кишнев. 1988. С. 3–9.
- Рогозина Е.В. Межвидовое и внутривидовое разнообразие картофеля по устойчивости к Y-вирусу / Е.В. Рогозина, О.Ю. Шувалов, О.Ю. Антонова, Т.А. Гавриленко // Сельскохозяйственная биология. 2012. N 5. С. 64–69.
- Рогозина Е.В. Широко распространенные и потенциально опасные для российского агропроизводства возбудители вирусных заболеваний картофеля / Е.В. Рогозина, Н.В. Мироненко, О.С. Афанасенко, Ю. Мацухито // Вестник защиты растений. 2016. N 4. С. 24–33.
- Самсонова Л.Н. Диагностика вирусных и фитоплазменных болезней овощных культур и картофеля / Л.Н. Самсонова, А.Е. Цыпленков, Т.А. Якуткина. СПб. 2001. 47 с.
- Семенной картофель. Сорт Импала / <http://alen-agro.ru/> (дата обращения: 19.02.2017).
- Семьянов В. П. Методика лабораторного разведения семиточечной коровки / В. П. Семьянов // Защита растений. 1974. N 6. С. 32.
- Семьянов В.П. Методика разведения и длительного хранения тропического вида кокцинееллид *Leis dimidiata* (Fabr.) (Coleoptera, Coccinellidae) / В.П. Семьянов // Энтомологическое обозрение. 1996. Т. 75. N 3. С. 714–720.
- Симаков Е.А. Приоритеты развития селекции и семеноводства картофеля / Е.А. Симаков, Б.В. Анисимов // Картофель и овощи. 2006. N 8. С.4–5.
- Созонов А. Н. Вирус Y картофеля в Северо-Западном регионе РФ: распространение, штаммовый состав и профилактика вызываемых им заболеваний / А. Н. Созонов: Автореф. ... канд. дис. СПб. 2005. 19 с.
- Сорта картофеля Удача и Ред Скарлет / <http://sorted.ru/> (дата обращения: 19.02.2017).
- Сухорученко Г.И. Система интегрированной защиты репродукционного семенного картофеля от комплекса вредных организмов в Северо-Западном регионе Российской Федерации / Г.И. Сухорученко, Г.П. Иванова, С.А. Волгарев и др. // ФБГНУ ВИЗР. СПб. Пушкин. 2016. 64 с.
- Трофимец Л.Н. Биотехнология в картофелеводстве / Л.Н. Трофимец // Москва. 1989. 45 с.
- Трофимец Л.Н. Вирусные болезни картофеля: Приложение к журналу «Защита растений» / Л.Н. Трофимец // Москва: Агропромиздат. 1990. 79 с.
- Трофимец Л.Н. Разработка и применение метода иммуноферментного анализа для диагностики вирусных и бактериальных болезней картофеля / Л.Н. Трофимец, Ю.А. Варицев, В.П. Князева, К.Ф. Герасимова, А.И. Усков, А.В. Бабоша, Л.Б. Зимица, Л.И. Егорова, Е.Я. Рушинова, В.А. Плетнева // В кн.: Селекция картофеля на иммунитет и защита от болезней и вредителей. Научные труды. Госагропром РСФСР, НИИ картофельного хозяйства. М.: 1986. С. 42–50.
- Фоминых Т.С. Проблемы вирусных болезней в современном картофелеводстве / Т.С. Фоминых, Г.П. Иванова, Е.В. Макаренко // Сборник науч. Трудов: Научное обеспечение развития АПК в условиях импортозамещения. 2017. Ч.1. С. 169–173.
- Aramburu J. Mode of transmission of Parietaria mottle virus / J. Aramburu, L. Galipienso, F. Aparicio, S. Soler, C. López // Journal of Plant Pathology. 2010. 92 (3). P. 679–684.
- Arno J. Evaluation of *Orius majusculus* and *O. laevigatus* as predators of *Bemisia tabaci* and estimation of their prey preference / J. Arno, J. Roig, J. Riudavets // Biological Control. 2008. 44. P. 1–6.
- Barker H. Detection of potato virus Y in potato tubers: a comparison of polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay / H. Barker, K.D. Websyter, B. Reavy // Potato Research. 1993. 36(1). P.13–20.
- Buhl R. Biologische Bekämpfung von Thrips, Blattläusen und Minierfliegen / Buhl R., Bassler R. // Gemuse. 1992. 28(3). P. 155–158.
- Carayon, J. and J. R. Steffan. 1959. Observations sur le regime alimentaire des Orius et particulièrement d'*Orius pallidicornis* (Reuter) (Heteroptera: Anthocoridae). Cahiers des Naturalistes. Bulletin N.P. (n.s.). 15. P. 53–63.
- Cocuzza G.E. Reproduction of *Orius laevigatus* and *Orius albipennis* on pollen and *Ephesia kuehniella* eggs / G.E. Cocuzza, P.DeClercq, M.V.Veire, A. DeCock, D. Degheele, V. Vacante // Ent. Exp. et Appl. 1997. 82. P. 101–104.
- Edwardson J.R. Viruses infecting peppers and other solanaceous crops / J.R. Edwardson, R.G. Christie // Monogr. Agric. Exp.Stn. Univ. Florida 18. 1997. 1. P. 106–123.
- Elliott N. C. Parasitism, adult emergence, sex ratio, and size of *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Aphidiidae) on several aphid species / N.C. Elliott, B.W. French, J.D. Burd, S.D. Kindler, D.K. Reed // The Great Lakes entomologist. 27(3). P. 137–142.
- Fischer S. Biologie et utilisation de la punaise *Orius majusculus* Reuter (Heteroptera: Anthocoridae) dans la lutte contre le thrips *Frankliniella occidentalis* Perg. et *Thrips tabaci* Lind., en serre / S. Fischer, C. Linder, J. Freuler // Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic. 1992. 24. P. 119–127.
- Frank S.D. Biological control of arthropod pests using banker plant systems: Past progress and future directions / S.D. Frank // Biological Control. 2010. 52. P. 8–16.
- Halbert S. Epidemiology and control of aphid transmitted potato viruses / S. Halbert, D. Corsini, L. Sandvol, P. Nolte // Idaho Cooperative Extension. BUL 809. 1999. 13 pp.
- Hejzlar P. The nymphal development of the predatory bug *Orius majusculus* (Reuter) (Heteroptera: Anthocoridae) reared on four aphid species / P. Hejzlar, I. Kabicek // Plant Protection Science. 2000. 36(3). P.91–94.
- Henaut Y., Effect of nymphal diet on adult predation behavior in *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae) / Y. Henaut, C. Alauzet, A. Ferran, T. Williams // J. Econ. Entomol. 2000. 93(2). P. 252–255.
- Henry T.J. First North American records for the palaearctic *Orius majusculus* (Reuter) (Hemiptera: Heteroptera: Anthocoridae) / T.J. Henry // Proceedings of the Entomological Society of Washington. 2008. 110(4). P. 953–959.
- Huang N., The banker plant method in biological control / N. Huang, A. Enkegaard, L.S. Osborn, P.M.J. Ramakers, G. J. Messelink, J. Pijnakker, G. Murphy // Critical Reviews in Plant Sciences. 2011. 30(3). P. 259–278.
- Kennedy J.S. A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses / J.S. Kennedy, M.F. Day, V.F. Eastop // Visser J.C. Commonwealth Institute of Entomology. London. 1962. 114 p.
- Kim Y.H. Biological control of aphids on cucumber in plastic green houses using banker plants / Y.H. Kim, J.H. Kim // Agris Records. 2004. <http://agris.fao.org/aos/records/KR2004004025> (дата обращения: 19.02.2017).

- Messelink G. J. Biological control of aphids in the presence of thrips and their enemies / G.J. Messelink, M.J. Chantal, B.M.W. Sabelis, A. Janssen // *BioControl*. 2013. 58. P. 45–55.
- Messelink G. J. Generalist predatory bugs control aphids in sweet pepper / G.J. Messelink, C.M.J. Bloemhard, L. Kok, A. Janssen // *Integrated control in protected crops, temperate climate IOBC. wprs Bulletin*. 2011. 68. P. 115–118.
- Montserrat M. Functional response of four heteropteran predators preying on greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) and western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae) / M. Montserrat, R. Albajes, C. Castane // *Environ. Entomol.* 2000. 29(5). P. 1075–1082.
- Perez P. Estimation of vector propensity of potato virus Y in open - field pepper crops of central Spain / P. Perez, L. Collar, C. Avilla, M. Duque, A. Fereres // *J. Econ. Entomol.* 1995. 88. P. 986–991.
- Pericart J. Family Anthocoridae / J. Pericart // p. 108–141. In: Aukema B., Rieger Ch. (eds.). *Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic region*. 1996. 2. Cimicomorpha I. Amsterdam: The Netherland entomological society. XIV. 361 p.
- Pericart J. Hemipteres Anthocoridae, Cimicidae et Microphysidae de l'Ouest-Palaearctique. Faune de l'Europe et du bassin mediterraneen // J. Pericart. 1972. 7. Paris: Masson et Cie (Ed.). 401 p.
- Translation of Russian References**
- Ambrosov A.L. Potato virus diseases and their control. Minsk: Uradzhyay. 1975. 208 p. (In Russian).
- Anisimov B.V. Viral diseases and their control in seed potatoes. *Zashchita i karantin rasteniy*. 2010. N 5. P. 12–18. (In Russian).
- Belyakova N.A., Polikarpova Yu.B. Entomophages for biological control of seed potato against aphid vectors of viruses in modern greenhouses. *Vestnik zashchity rasteniy*. 2016. N 4. P. 45–50. (In Russian).
- Bondarenko N.V., Pospelov S.M., Persov M.P. General and agricultural entomology. Moscow: Kolos. 1983. 415 p. (In Russian).
- Bondarenko N.V., Voronova O.V. Predatory midge Aphidimyza: methods of mass rearing and use against aphids on greenhouse vegetable crops. In: N.A. Fillipova (Ed.). *Sbornik nauchnykh trudov: Biologicheskii metod borby s vreditel'yami ovoshchnykh kultur*. Moscow: Agropromizdat. 1989. P. 8–19. (In Russian).
- Evstigneeva T.A., Pavlova N.A., Tyuterev S.L. Action of phytoactive salicylic acid and chitosan on plant resistance to potato virus Y. *Vestnik zashchity rasteniy*. 2012. N 2. P. 27–33. (In Russian).
- Fominykh T.S., Ivanova G.P., Makarenko E.V. Problems of viral diseases in modern potato. In: *Sbornik nauchnykh trudov: Nauchnoe obespechenie razvitiya APK v usloviyakh importozameshcheniya*. 2017. V. 1. P. 169–173. (In Russian).
- Korzhova V. I. Mass rearing technology for *Aphidius colemani* Vier. *Zashchita i karantin rasteniy*. 2008. N 1. P. 31–32. (In Russian).
- Kozlova E.G. Entomophages for pest protection on salad cultivation. *Zashchita i karantin rasteniy*. 2009. N 5. P. 23–25. (In Russian).
- Lebenshtein G., Berger F.H., Brant A.A., Louson R.H. Virus and virus-like diseases and seed potatoes. St. Petersburg, Pushkin: VIZR. 2000. 275 p. (In Russian).
- Markelova T.S., Kirillova T.V. Symptoms of viral, mycoplasma and non-infection wheat diseases in the Volga region. *Agrarnyy Vestnik Yugo-Vostoka*. 2009. N 1. P. 34–35. (In Russian).
- Orlov V.N. Pests of cereal crops. Moscow: Pechatnyy gorod. 2006. 104 p. (In Russian).
- Popov N.A., Belousov Yu.V. Methods of mass rearing of predatory midge on cereal aphids. In: *Primenenie biologicheskikh metodov zashchity rasteniy v selsko-khozyaystvennom proizvodstve*. Kishinev. 1988. P. 3–9. (In Russian).
- Potato varieties Udacha and Red Skarlet. <http://sortoved.ru>. (In Russian).
- Rogozina E.V., Mironenko N.V., Afanasenko O.S., Matsuhito Yu. Widespread and potentially dangerous pathogens of potato viral diseases for Russian agriculture. *Vestnik zashchity rasteniy*. 2016. N 4. P. 24–33. (In Russian).
- Rogozina E.V., Shuvalov O.Yu., Antonova O.Yu., Gavrilenko T.A. Interspecific and intraspecific diversity of potato and resistance to viruses. *Selskokhozyaystvennaya biologiya*. 2012. N 5. P. 64–69. (In Russian).
- Phoofolo M. W. Quantitative evaluation of suitability of the greenbug, *Schizaphis graminum*, and the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*, as prey for *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) / M. W. Phoofolo, K. L. Giles, N. C. Elliott // *Biological Control*. 2007. 41. P. 25–32.
- Pineda A. Introducing barley as aphid reservoir in sweet-pepper greenhouses: Effects on native and released hoverflies (Diptera: Syrphidae) / A. Pineda, M. A. Marcos-Garcia // *Eur. J. Entomol.* 2008. 105. P. 531–535.
- Riudavets J. Identification and evaluation of native predators of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Tripidae) in the Mediterranean / J. Riudavets, C. Castane // *Environmental Entomology*. 1998. 27. P. 86–93.
- Rodrigues S.M.M. Development and evaluation of an open rearing system for the control of *Aphis gossypii* Glover (Hem.: Aphididae) by *Lysiphlebus testaceipes* (Cresson) (Hym.: Aphididae) in greenhouses / S.M.M. Rodrigues, V.H.P. Bueno, J.S.S. Bueno Filho // *Neotropical Entomology*. 2001. 30. P. 433–436.
- Strawinski K. Zoophagism of terrestrial Hemiptera Heteroptera occurring in Poland // K. Strawinski. *Ekol. Polsk.* 1964. 12. P. 429–452.
- Visser J.C. The Recent Recombinant Evolution of a Major Crop Pathogen, Potato virus Y / J.C. Visser, D.U. Bellstedt, M.D. Pirie // *PLoS ONE*. 2012. 7(11). P.e50631. doi:10.1371/journal.pone.0050631.
- Samsonova L.N., Tsyplenkov A.E., Yakutkina T.A. Diagnostics of viral and phytoplasma diseases on vegetable crops and potatoes. St. Petersburg. 2001. 47 p. (In Russian).
- Seed potato. Sort Impala. <http://alen-agro.ru>. (In Russian).
- Semyanov V. P. Methods of *Coccinella septempunctata* laboratory breeding. *Zashchita rasteniy*. 1974. N 6. P. 32. (In Russian).
- Semyanov V.P. Methods of breeding and storage of tropical species *Leis dimidiata* (Fabr.) (Coleoptera, Coccinellidae). *Entomologicheskoe obozrenie*. 1996. V. 75. N 3. P. 714–720. (In Russian).
- Simakov E.A., Anisimov B.V. Priorities of development and selection of potato seed. *Kartofel i ovoschi*. 2006. N 8. P. 4–5. (In Russian).
- Sozonov A. N. Potato Y-virus in the North-West region of the Russian Federation: spread, composition of strains and prevention of diseases caused by the virus. PhD Thesis. St. Petersburg: VIZR. 2005. 19 p. (In Russian).
- Sukhoruchenko G.I., Ivanova G.P., Volgarev S.A. et al. System of integrated protection of reproduction of seed potatoes from the complex of pests in the Northwest region of the Russian Federation. St. Petersburg: VIZR. 2016. 64 p. (In Russian).
- Trofimets L.N. Biotechnology of potato. Moscow. 1989. 45 p. (In Russian).
- Trofimets L.N. Virus diseases of potato. In: *Zashchita rasteniy. Prilozhenie*. Moscow: Agropromizdat. 1990. 79 p. (In Russian).
- Trofimets L.N., Varitsev Yu.A., Knyazeva V.P., Gerasimova K.F., Uskov A.I., Babosha A.V., Zimina L.B., Egorova L.I., Rusinova E.Ya., Pletneva V.A. Development and application of ELISE-test method for diagnostics of virus and bacterial diseases of potato. In: *Seleksiya kartofelya na immunitet i zashchita ot bolezney i vrediteley*. Nauchnyye trudy. Moscow: Gosagroprom RFSFR, NII kartofelnogo khozyaystva. 1986. p. 42–50. (In Russian).
- Vaidemann H.L., Shpaar D., Blotskaya Zh.V. A new dangerous strain of potato virus Y in Europe. *Izvestiya akademii agrarnykh nauk Respubliki Belarus*. 1999. N 1. P. 48–51. (In Russian).
- Vasiliev V.P. Pests of agriculture and forest plantations. In 3 vols. V.P. Vasilev (Ed.). V. 1. *Vrednyie nematodyi, mollyuski, chlenistonogie*. V.G. Dolin (Ed.). Kiev: Urozhay. 1987. 440 p. (In Russian).
- Zamalieva F.F. Control of potato viral diseases. *Zashchita i karantin rasteniy*. 2013. N 3. P. 17–21. (In Russian).
- Zhuk R.Yu. Behavior of aphid *Myzus persicae* (Sulzer, 1776) in T-tube test at its trophic preferences. In: *Sbornik nauchnykh trudov Stavropolskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta zhivotnovodstva i kormoproizvodstva*. 2014. V. 2. N 7. URL: <http://cyberleninka.ru/article/n/povedenie-tli-myzus-persicae-sulzer-1776-v-t-obraznom-labirinte-pri-testirovanii-eyo-troficheskikh-preferentsiy> (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 1(91), p. 26–33

ASSESSMENT OF *ORIUS MAJUSCULUS* (HEMIPTERA, ANTHOCORIDAE) AND *SCHIZAPHIS GRAMINUM* (HOMOPTERA: APHIDIDAE) AS POSSIBLE VECTORS OF POTATO VIRUS Y

I.M. Pazyuk, T.S. Fominykh, K.D. Medvedeva

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

Both the predatory bug *Orius majusculus* Reuter and greenbug *Schizaphis graminum* Rondani are often used on vegetable crops in greenhouses to control sucking pests (*O. majusculus*) on bunker-plants to provide additional nutrition for some

natural enemies (*S. graminum*). These species were tested in laboratory for potato virus Y transferability to allow their safe application on meristem potato culture. It was shown that *O. majusculus* did not transfer the Y potato virus. On the contrary, *S. graminum* was shown to be capable of transmitting this virus on tobacco plants and potato varieties Impala, Udacha and Red Scarlet, occasionally more frequently than *Myzus persicae* (control). Thus, bunker-plants with the common cereal aphid are not to be used in potato growing in greenhouses.

Keywords: biological control; virus vector; potato virus Y; *Orius majusculus*; *Schizaphis graminum*; *Myzus persicae*.

Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация
*Пазюк Ирина Михайловна. Научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: ipazyuk@gmail.com
Фоминых Татьяна Сергеевна. Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: fominyh.tatjana@yandex.ru
Медведева Ксения Дмитриевна. Лаборант-исследователь, e-mail: medved-ksu@rambler.ru

* Ответственный за переписку

Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation
*Pazyuk Irina Mikhailovna. Senior Researcher, PhD, e-mail: ipazyuk@gmail.com
Fominykh Tatyana Sergeevna. Senior Researcher, PhD, e-mail: fominyh.tatjana@yandex.ru
Medvedeva Kseniya. Laboratorian Researcher, e-mail: medved-ksu@rambler.ru

* Responsible for correspondence

УДК: 632.51

РАСПРОСТРАНЕНИЕ СОРНЫХ РАСТЕНИЙ В РЕГИОНАХ (НА ПРИМЕРЕ РЕСПУБЛИКИ МОРДОВИЯ И ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ)

Н.Н. Лунева¹, А.Н. Никольский², Д.В. Бочкарев²

¹Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

²ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарёва», Саранск

Засоренность сельскохозяйственных культур формируется в каждом из сравниваемых регионов более, чем 200 видами сорных растений практически из одних и тех же семейств, но видовое разнообразие на уровне семейств и родов в сеgetальной флоре Ленинградской области выше, чем в Республике Мордовия. Каждое ведущее семейство представлено не только комплексом одинаковых для двух регионов видов, но также рядом видов, произрастающих только в конкретном регионе. Видовое различие подтверждается произрастанием на территории Ленинградской области, более обеспеченной влагой, видов, приспособленных к росту и развитию в местообитаниях с достаточной и высокой увлажненностью, а на значительно менее обеспеченной влагой территории Республика Мордовия – видов, приспособленных к произрастанию в сухих местообитаниях.

Ключевые слова: сеgetальная флора, флористический анализ, влагообеспеченность территории местообитаний, требовательность видов сорных растений к влаге.

Одним из важнейших результатов исследований в области географии растений является выявление зависимости распространения, как отдельных видов растений, так и растительных сообществ от ряда факторов, важнейшими из которых являются водный и температурный режим территорий [Алехин, 1944.; Агаханянц, 1986]. Именно этими факторами в первую очередь обусловлено различие меж-

ду растительными сообществами разных регионов. Целью работы является выявление различий видового состава комплексов сорных растений в агроценозах на территориях двух регионов, отличающихся по показателям тепло- и влагообеспеченности, каковыми являются Республика Мордовия и Ленинградская область.

Методика исследований

Наиболее часто применяемыми критериями для оценки влияния водного и температурного режимов на распространение и развитие биологических объектов являются такие прикладные климатические индексы, как среднегодовая сумма активных температур воздуха выше определенного температурного порога (обычно >10 °C) и среднегодовая сумма осадков. Выбор сравниваемых территорий обусловлен значительными различиями в этих показателях: среднегодовая сумма осадков в республике Мордовия 450–500 мм, а в Ленинградской области 550–650 мм; сумма активных температур в республике Мордовия 2250–2400 °C, а в Ленинградской области 1500–1900 °C.

Материалом для анализа явились данные полевых исследо-

ваний, осуществленных на территории обоих регионов в течение длительного времени [Бочкарев, 2013, 2015; Смолин, 2013; Лунева и др., 2005; Лунева, 2016].

Анализ данных осуществлялся с использованием флористического метода, включающего составление списков видов сорных растений, выявление флористического богатства и систематического разнообразия, формирование и сравнение флористических спектров, выявление сходства видового состава сорных растений разных регионов, анализ видов по требовательности к влагообеспеченности местообитаний [Шмидт, 1980; Толмачев, 1986; Jaccard, 1901].

Результаты и обсуждение

Анализ флористического богатства (количества видов) и систематического разнообразия (распределения видов по таксонам разного ранга) осуществляется только по данным присутствия (отсутствия) вида в агроценозе, без учета его численности (табл. 1).

Таблица 1. Флористическое богатство и систематическое разнообразие сеgetальных флор Республики Мордовия и Ленинградской области

Названия регионов	Республика Мордовия		Ленинградская область	
	видов	родов	видов	родов
Asteraceae Dumort. Астровые	45	30	42	31
Brassicaceae Burnett Капустные	20	15	14	13
Рoaceae Barnhart Мятликовые	18	14	22	15
Fabaceae Lindl. Бобовые	18	8	16	6
Caryophyllaceae Juss. Гвоздичные	17	15	12	8
Lamiaceae Lindl. Яснотковые	15	9	12	6
Polygonaceae Juss. Гречишные	11	6	11	5
Apiaceae Lindl. Сельдерейные	8	7	8	7
Boraginaceae Juss. Бурачниковые	9	7	6	5
Amaranthaceae Juss. Амарантовые	2	1	2	1
Rosaceae Juss. Розоцветные	8	4	7	3
Scrophulariaceae Juss. Норичниковые	7	5	8	3
Chenopodiaceae Vent. Маревые	4	2	9	2
Ranunculaceae Juss. Лютиковые	4	3	5	4
Rubiaceae Juss. Мареновые	3	1	4	1
Plantaginaceae Juss. Подорожниковые	3	1	3	1
Equisetaceae Rich. ex DC Хвощевые	3	1	3	1
Juncaceae Juss. Ситниковые	1	1	3	2
Campanulaceae Juss. Колокольчиковые	1	1	4	1
Solanaceae Juss. Пасленовые	2	2	2	1
Geraniaceae Juss. Гераниевые	2	2	2	2
Convolvulaceae Juss. Вьюнковые	1	1	1	1
Cuscutaceae Dumort. Повиликовые	2	1	-	-
Dipsacaceae Juss. Ворсянковые	1	1	1	1
Euphorbiaceae Juss. Молочайные	1	1	2	1
Fumariaceae DC Дымянковые	1	1	1	1
Hypericaceae Juss. Зверобойные	1	1	1	1
Malvaceae Juss. Мальвовые	1	1	1	1
Onagraceae Juss. Ослинные	-	-	2	2
Orobanchaceae Vent. Заразиховые	1	1	-	-
Primulaceae Vent. Проломниковые	1	1	1	1
Urticaceae Juss. Крапивные	-	-	2	1
Violaceae Batsch Фиалковые	2	1	2	1
Alliaceae J. Agardh Луковые	1	1	-	-
Cannabaceae Endlicher Коноплевые	1	1	-	-
Количество видов	215		206	
Количество семейств	33		31	
Среднее количество видов в семействе	6.55		6.65	
Количество родов		146		129
Среднее количество родов в семействе		4.42		4.16
Среднее количество видов в роде		1.48		1.6
29 общих семейств				
107 общих родов				
139 общих видов				

Количественные показатели, характеризующие комплекс сорных растений агроценозов Республики Мордовия, практически по всем позициям незначительно превышают таковые, характеризующие аналогичный комплекс видов Ленинградской области: только показатели среднего количества видов в одном семействе и роде несколько выше для сеgetальной флоры Ленинградской области.

Построение систематической структуры флоры (распределение видов между семействами) является одним из видов флористического анализа [Толмачев, 1974]. Чаще используется понятие флористического спектра: состав и последовательность расположения 10–15 ведущих семейств по числу входящих в них видов [Шмидт, 1980]. Сравнение флористических спектров используется в изучении флор самого разного типа, как естественных, так и антропогенных [Хохряков, 2000] (табл. 2).

Таблица 2. Флористические спектры сеgetальных флор Республики Мордовия и Ленинградской области

Республика Мордовия		Ленинградская область	
Количество видов в семействе			
Астровые	45	Астровые	42
Капустные	20	Мятликовые	22
Мятликовые	18	Бобовые	16
Бобовые	18	Капустные	14
Гвоздичные	17	Гвоздичные	12
Яснотковые	15	Яснотковые	12
Гречишные	11	Гречишные	11
Бурачниковые	9	Сельдерейные	8
Розоцветные	8	Норичниковые	8
Сельдерейные	8	Розоцветные	7
Норичниковые	7	Бурачниковые	6
Лютиковые	4	Маревые	9
Маревые	4	Лютиковые	5
Мареновые	3	Мареновые	4
Подорожниковые	3	Ситниковые	3

Сравнение спектров заключается, главным образом, в сравнении первых двух «триад» ведущих семейств [Шмидт, 1980]. Для флоры территории Палеарктики, куда входит территория РФ, фундаментальными ботаническими исследованиями [Толмачев, 1974; Шмидт, 1980] выявлено, что обязательными составляющими первой триады являются семейства Астровые и Мятликовые. Третьим компонентом «триады» может быть только одно из следующих семейств: Бобовые, Осоковые, Розоцветные, Маревые, Капустные, Гвоздичные, Лютиковые, Яснотковые, Норичниковые, чему и соответствуют спектры сравниваемых сеgetальных флор.

Состав семейств во флористических спектрах (за исключением заключительных семейств Подорожниковых и Ситниковых) одинаков, но последовательность расположения семейств в структуре спектра различна, что свидетельствует о разной значимости того или иного семейства в сеgetальной флоре региона. Для более объективного отражения роли семейств были вычислены индексы (отношения) видовой численности отдельных пар семейств (табл. 3).

Таблица 3. Индексы видовой численности пар семейств из двух первых «триад» флористических спектров сеgetальных флор республики Мордовия и Ленинградской области

Названия семейств	Республика Мордовия	Ленинградская область
Астровые/Капустные	2.25	2.93
Астровые/ Мятликовые	2.5	1.86
Астровые/Бобовые	2.5	2.56
Астровые/Гвоздичные	2.65	3.42
Астровые/Яснотковые	3.00	3.42
Капустные/ Астровые	0.44	0.34
Капустные/Мятликовые	1.11	0.64
Капустные/Бобовые	1.11	0.88
Капустные/Гвоздичные	1.18	1.17
Капустные/Яснотковые	1.33	1.17
Мятликовые/Астровые	0.40	0.54
Мятликовые/Капустные	0.90	1.57
Мятликовые/Бобовые	1.00	1.38
Мятликовые/Гвоздичные	1.06	1.83
Мятликовые/Яснотковые	1.20	1.83
Бобовые/Астровые	0.40	0.39
Бобовые/Мятликовые	1.00	0.73
Бобовые/Капустные	0.90	1.14
Бобовые/Гвоздичные	1.06	1.33
Бобовые/Яснотковые	1.20	1.33
Гвоздичные/Астровые	0.38	0.29
Гвоздичные/Капустные	0.85	0.86
Гвоздичные/Мятликовые	0.94	0.55
Гвоздичные/Бобовые	0.94	0.75
Гвоздичные/Яснотковые	1.13	1.00
Яснотковые/Астровые	0.33	0.29
Яснотковые/Капустные	0.75	0.86
Яснотковые/Мятликовые	0.83	0.55
Яснотковые/Гвоздичные	0.88	1.00
Яснотковые/Бобовые	0.83	0.75

Ведущее значение семейства Астровые в структуре сеgetальных флор сравниваемых регионов подтверждается высокими показателями индексов по отношению ко всем семействам двух первых «триад» флористических спектров, причем его значимость по отношению к этим семействам (кроме семейства Мятликовых) выше в Ленинградской области. В сеgetальной флоре Республики Мордовия значение индекса семейства Капустных по отношению к семействам Мятликовых и Бобовых довольно высокое (1.11), а в Ленинградской области оно снижается по отношению к семействам Мятликовых (0.64) и Бобовых (0.88). В Республике Мордовия значение семейства Бобовых по отношению к семейству Мятликовые выше, чем в Ленинградской области (соответственно 1.00 и 0.73). Семейство Гвоздичные имеет одинаковую очередность (ранг) в сравниваемых спектрах, но значение семейства Астровых по отношению к семейству Гвоздичных в Республике Мордовия ниже, чем в Ленинградской области (соответственно 2.65 и 3.42).

Высокие показатели сходства таксономического состава на уровне семейств ($KJ = 0.83$) свидетельствуют о том, что сеgetальные флоры обоих регионов сформированы

видами практически из одних и тех же семейств, но одинаковых видов в агроценозах сравниваемых регионов менее половины ($KJ = 0.49$) (табл. 4).

Таблица 4. Показатели коэффициентов сходства (K_j) таксономического состава сеgetальных флор Республики Мордовия и Ленинградской области

По семействам $K_j = 0.83$			
По родам $K_j = 0.64$			
По видам $K_j = 0.49$			
По видам внутри семейств:			
Подорожниковые	1.00	Бурчниковые	0.50
Лютиковые	0.80	Астровые	0.46
Розоцветные	0.67	Гвоздичные	0.45
Бобовые	0.62	Маревые	0.44
Сельдерейные	0.60	Мятликовые	0.43
Яснотковые	0.59	Норичниковые	0.36
Гречишные	0.57	Мареновые	0.67
Капустные	0.55	Ситниковые	0.33

При этом уровень видовой сходства в семействах, богатых видами, сравнительно невысок, что свидетельствует о том, что в каждом регионе к одинаковому комплексу видов семейства добавляются виды, произрастающие только в этом регионе.

Показатели видовой разнообразия родов (среднее число видов в роде) в подавляющем большинстве ведущих семейств сеgetальной флоры Ленинградской области выше, чем в сеgetальной флоре Республики Мордовия (табл. 5).

Таблица 5. Показатели среднего количества видов в роде в ведущих семействах сеgetальных флор Республики Мордовия и Ленинградской области

Названия регионов	Республика Мордовия		Ленинградская область
	Количество родов (и видов в роде)		Количество родов (и видов в роде)
Астровые	30 (1.50)	Астровые	31 (1.36)
Капустные	15 (1.33)	Мятликовые	15 (1.47)
Гвоздичные	15 (1.13)	Капустные	13 (1.08)
Мятликовые	14 (1.29)	Гвоздичные	8 (1.5)
Яснотковые	9 (1.67)	Сельдерейные	7 (1.14)
Бобовые	8 (2.25)	Бобовые	6 (2.67)
Сельдерейные	7 (1.14)	Яснотковые	6 (2.00)
Бурчниковые	7 (1.29)	Бурчниковые	5 (1.20)
Гречишные	6 (1.83)	Гречишные	5 (2.2)
Норичниковые	5 (1.40)	Лютиковые	4 (1.25)
Розоцветные	4 (2.00)	Норичниковые	3 (2.67)
Лютиковые	3 (1.33)	Розоцветные	3 (2.33)
Маревые	2 (2.00)	Маревые	2 (4.5)
Мареновые	1 (3.00)	Ситниковые	2 (1.50)
Подорожниковые	1 (3.00)	Мареновые	1 (4.00)

Анализ сеgetальных флор сравниваемых регионов по требовательности видов к условиям увлажнения территорий показал, что большую часть в перечнях видов обоих регионов составляют мезофиты: растения, приспособленные к обитанию в среде с более или менее достаточным, но не избыточным увлажнением почвы (табл. 6).

Таблица 6. Группировки видов по отношению к условиям увлажнения в сеgetальных флорах Республики Мордовия и Ленинградской области

Названия семейств	Республика Мордовия	Ленинградская область
Ксерофиты		
Астровые	1	-
Бурачниковые	1	-
Норичниковые	1	-
ВСЕГО	3	0
Ксеромезофиты		
Луковые	1	-
Амарантовые	1	1
Астровые	11	5
Бурачниковые	5	1
Капустные	5	2
Гвоздичные	4	3
Повиликовые	1	-
Молочайные	1	1
Бобовые	4	1
Яснотковые	2	-
Заразиховые	1	-
Мятликовые	3	1
Розоцветные	2	1
Мареновые	1	-
Норичниковые	1	1
Пасленовые	1	-
ВСЕГО	44	17
Мезоксерофиты		
Сельдерейные	2	-
Астровые	1	-
Бурачниковые	-	1
Лютиковые	1	1
ВСЕГО	4	2
Мезофиты		
Амарантовые	1	1
Сельдерейные	6	8
Астровые	31	31
Бурачниковые	2	3
Капустные	14	11
Колокольчиковые	1	4
Коноплевые	1	-
Гвоздичные	11	8
Маревые	4	8
Вьюнковые	1	1
Повиликовые	1	-
Ворсянковые	1	1
Хвоцевые	2	2
Молочайные	-	1
Бобовые	14	15
Дымянковые	1	1
Гераниевые	2	2
Зверобойные	1	1
Ситниковые	1	1
Яснотковые	11	11
Мальвовые	1	1
Ослинниковые	-	1
Подорожниковые	3	3
Мятликовые	14	17
Гречишные	6	7

Названия семейств	Республика Мордовия	Ленинградская область
Проломниковые	1	1
Лютиковые	1	1
Розоцветные	6	6
Мареновые	2	4
Норичниковые	3	7
Пасленовые	1	1
Фмалковые	2	2
ВСЕГО	147	161
Мезогигрофиты		
Бурачниковые	1	1
Гвоздичные	-	1
Яснотковые	1	1
Мятликовые	-	1
Гречишные	1	1
Проломниковые	-	1
Лютиковые	1	1
Пасленовые	-	1
ВСЕГО	4	7
Гигромезофиты		
Астровые	-	1
Гвоздичные	2	-
Маревые	-	1
Осоковые	-	1
Ситниковые	-	1
Яснотковые	1	1
Ослинниковые	-	1
Мятликовые	-	1
Гречишные	3	2
Лютиковые	1	1
Норичниковые	1	-
ВСЕГО	8	10
Гигрофиты		
Астровые	2	3
Капустные	1	1
Хвоцевые	1	1
Ситниковые	-	1
Мятликовые	1	1
Гречишные	1	1
Лютиковые	-	1
ВСЕГО	6	9
ВСЕГО	215	206

При этом мезофитов в сеgetальной флоре Ленинградской области больше, чем в таковой Республики Мордовия. Кроме того, на более обеспеченной влагой территории Ленинградской области больше видов, приспособленных к произрастанию в местах с высокой влажностью воздуха и почвы: мезогигрофитов, гигромезофитов и гигрофитов. Напротив, в списке видов сеgetальных местообитаний региона, менее обеспеченного влагой (Республика Мордовия), много видов растений, способных переносить ее недостаток: ксерофиты, ксеромезофиты и мезоксерофиты. Подавляющее количество видов этих групп относится к семействам Астровых, Капустных, Гвоздичных, Бобовых и Бурачниковых, которые, как указывалось выше, играют важную роль в сеgetальной флоре Республики Мордовия.

Заключение

За многолетний период исследований на сеgetальных местообитаниях каждого из сравниваемых регионов зарегистрировано более 200 видов сорных растений. Засоренность сельскохозяйственных культур формируется видами сорных растений практически из одних и тех же семейств, но видовое разнообразие на уровне семейств и родов в агроценозах Ленинградской области выше, чем в Республике Мордовия.

Семейство Астровых играет ведущую роль в сеgetальной флоре сравниваемых регионов, при этом его значимость по отношению к другим ведущим семействам, кроме семейства Мятликовых, выше в Ленинградской области. В структуре сеgetальной флоры республики Мордовия высока значимость семейств Капустных и Бобовых.

В сравниваемых регионах каждое ведущее семейство представлено не только комплексом одинаковых видов, но также рядом видов, произрастающих только в конкретном регионе. Видовое различие подтверждается также тем, что на территории Ленинградской области, более обеспеченной влагой, шире представлены виды, приспособленные к произрастанию в местообитаниях с достаточной и высокой увлажненностью, а на территории Республика Мордо-

вия с жарким и засушливым климатом – виды, приспособленные к произрастанию в сухих местообитаниях.

Полученные результаты подтверждают показанную нами ранее (Лунева, Мыслик, 2013, 2014, 2015, 2016) значительную степень обусловленности формирования видовых комплексов сорных растений в регионах уровнем тепло- и влагообеспеченности территорий этих регионов. Дано флористическое подтверждение формирования в каждом регионе своего стабильного комплекса видов сорных растений, приспособленных нормально расти и развиваться в пределах территориальных ресурсов тепла и влаги. Безусловно, распространенность видов этого комплекса по территории региона обусловлена также действием ряда других факторов, в первую очередь составом и структурой почвы, а численность в агроценозах регулируется мерами и средствами борьбы с сорными растениями. Однако, именно эти видовые комплексы, формируя засоренность посевов (посадок) сельскохозяйственных культур, определяют потенциал фитосанитарного риска, связанного с распространением особо опасных видов, входящих в эти комплексы, и необходимостью нести затраты на снижение их численности для защиты урожая.

Библиографический список (References)

- Алехин В.В. География растений (Основы фитогеографии, экологии и фитоценологии). Второе переработанное и дополненное издание /В.В. Алехин/ Москва: Наука. 1944.
- Агаханиянц О.Е. Ботаническая география СССР: Учебное пособие для педагогических институтов по специальности 2106 «Биология» и «География» /О.Е. Агаханиянц/ Мн.: Выш.шк., 1986. 175 с.
- Бочкарев Д. В. Теоретическое обоснование и эффективность защиты сельскохозяйственных культур от сорных растений в земледелии юга нечернозёмной зоны: дис. ... д-ра с.-х. н.: 06.01.01 / Бочкарев Дмитрий Владимирович – Саратов, 2015 – 496 с.
- Бочкарев Д. В. Динамика сорного компонента агрофитоценозов Мордовии / Д. В. Бочкарев, Н. В. Смолин, А. Н. Никольский // Вестник защиты растений. 2013. N 3. С. 51–60.
- Лулева Н. Н. Особенности распространенности сорных растений в агроценозах агроклиматических районов Ленинградской области // Вестник защиты растений. 2016. N4. С. 76–81.
- Лулева Н.Н., Надточий И.Н., Соколова Т.Д., Доронина А.Ю. Видовой состав сеgetальных сорных растений Ленинградской области // Второй Всероссийский съезд по защите растений. Санкт-Петербург, 5–10 декабря 2005. Фитосанитарное оздоровление экосистем. Материалы съезда. Том 1. Санкт-Петербург, 2005. С. 337–340.
- Лулева Н.Н. Эколого-географическое обоснование видового состава сорных растений в посевах кукурузы в разных зонах возделывания // Н.Н. Лулева, Е.Н. Мыслик // Защита растений в современных технологиях возделывания сельскохозяйственных культур. Материалы международной научно-практической конференции (п. Краснообск, 24–26 июля 2013 г.). Новосибирск, 2013. С. 213–216
- Лулева Н.Н. Эколого-географический подход в прогнозировании видового состава сорных растений /Н.Н. Лулева, Е.Н. Мыслик/ Защита и карантин растений, 2014. N8. С. 20–23.
- Лулева Н.Н. Модель видового состава сорняков Северо-Запада РФ/ Н.Н. Лулева, Е.Н. Мыслик/Картофель и овощи 2016. N 9. С. 32–35.
- Лулева Н.Н., Е.Н. Мыслик. Эколого-географическое моделирование и анализ структуры видового состава сорных растений посевов зерновых культур европейской части России и Сибири / Н.Н. Лулева, Е.Н. Мыслик / Продовольственный рынок: проблемы импортозамещения: сборник материалов Международной научно-практической конференции (26–27 февраля 2015 г.). Екатеринбург: УрГАУ, 2015. С. 360–363.
- Смолин Н. В. Эволюция сорной флоры агрофитоценозов в Республике Мордовия / Н. В. Смолин, Д. В. Бочкарев, А. Н. Никольский, Р. Ф. Баторшин // Земледелие. 2013. N 8. С. 38–40
- Толмачев А.И. Введение в географию растений. /А.И. Толмачев/ Л.: ЛГУ, 1974. 244 с.
- Хохряков А.П. Таксономические спектры и их роль в сравнительной флористике./ А.П. Хохряков / Ботанический журнал, Т. 85, вып. 5. 2000. С. 1–11.
- Шмидт В.М. Статистические методы в сравнительной флористике. / В.М. Шмидт/ Л: Наука, 1980. 176 с.
- Jaccard P. Distribution de la flore alpine dans le Basin de Dranseset dans quelques regions voisines // Bull. Soc. Vaud. Sci. natur. 1901.Vol. 37. N 140. P. 241–272.

Translation of Russian References

- Alekhin V.V. Plant Geography (Fundamentals of phytogeography, ecology and phytocenology). Second revised and enlarged edition. Moscow: Nauka. 1944. 454 p. (In Russian).
- Agakhanyants O.E. Botanical geography of the USSR: textbook for pedagogical institutes, specialty 2106 «Biology» and «Geography». Minsk: Vysheysya shkola, 1986. 175 p. (In Russian).
- Bochkarev D.V. Theoretical rationale and effectiveness of crop protection from weeds in farming areas of southern Non-Chernozem zone: DSc Thesis. Saratov. 2015. 496 p. (In Russian).
- Bochkarev D.V., Smolin N.V., Nikolskiy A.N. Weed dynamics in agrophytocenoses of the Republic of Mordovia. Vestnik zashchity rastenii, St.Petersburg, 2013. N 3. P. 51–60. (In Russian).
- Khokhryakov A.P. Taxonomic spectra and their role in comparative floristics. Botanical journal. V. 85, N 5. 2000. P. 1–11. (In Russian).
- Luneva N.N. Features of prevalence of weeds in agroclimatic districts of the Leningrad region. Vestnik zashchity rastenii, St.Petersburg. 2016. N. 4. P. 76–81. (In Russian).
- Luneva N.N., Nadtochiy I.N., Sokolova T.D., Doronina A.Yu. Species composition of segetal weed plants of Leningrad region. In: Second All-Russian Congress on Plant Protection. St. Petersburg, December 5–10, 2005. Phytosanitary health of ecosystems. Proceedings of the Congress. Volume 1. Saint Petersburg, 2005. P. 337–340. (In Russian).
- Luneva N.N., Mysnik E.N. Ecological-geographical substantiation of species composition of weed plants in maize crops in different zones of cultivation. In: Protection of plants in modern technologies of cultivation of agricultural crops. Materials of international scientific-practical conference (Krasnoobsk, 24–26 July 2013). Novosibirsk, 2013. P. 213–216. (In Russian).
- Luneva N.N., Mysnik E.N. Ecological-geographical approach in predicting the species composition of weed. Zashita i karantin rastenii, 2014. N 8. P. 20–23. (In Russian).
- Luneva N.N., Mysnik E.N. Model of species composition of weeds in North-West of Russia. Kartofel i ovoschi, 2016. N 9, P. 32–35. (In Russian).

Luneva N.N., Mysnik E.N. Ecological and geographical modeling and analysis of structure of species composition of weed plants in grain crops in the European part of Russia and Siberia. In: Food Market: Problems of import substitution: Collection of materials of International scientific-practical conference (26–27 February 2015). Ekaterinburg: Uralskii gosudarstvennyi universitet, 2015. P. 360–363. (In Russian).

Schmidt V.M. Statistical methods in comparative floristics. Leningrad: Nauka, 1980. 176 p. (In Russian).

Smolin N.V., Bochkarev D.V., Nikolskiy A.N., Batorschin R.F. Evolution of weed flora of agrophitocenosis in Republic of Mordovia. Zemledelie, Moscow, 2013. N 8. P. 38–40. (In Russian).

Tolmachev A.I. Introduction to geography of plants. Leningrad: Leningradskii gosudarstvennyi universitet, 1974. 244 p. (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 1(91), p. 33–38

DISTRIBUTION OF WEED PLANTS IN REGIONS (IN REPUBLIC OF MORDOVIA AND LENINGRAD REGION AS EXAMPLES)

N.N. Luneva¹, D.V. Bochkarev², A.N. Nikolskiy²

¹All-Russian Institute of Plant Protection, Saint-Petersburg, Russia

²Mordovian State University, Saransk, Russia

Contamination of agricultural crops formed in each of the compared regions includes more than 200 species of weeds from almost the same families, but species diversity at the level of families and genera in the segetal flora of the Leningrad region is higher than that in the Republic of Mordovia. Each major family is represented in both regions by the complex of same species, but having also some species which grow in only one region. The Leningrad region is more humid, with a number of whereas the Republic of Mordovia has much less moisture supply, with many.

Keywords: segetal flora; floristic analysis; moisture supply; habitat; weed; hygrophilous; xerophilous.

Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608

Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация

*Лунева Наталья Николаевна. Ведущий научный сотрудник, зав.

сектором, канд. биол. наук, e-mail: natalja.luneva2010@yandex.ru

ФГБОУ ВО «МГУ им. Н. П. Огарёва», ул. Российская, 31, 430904

Саранск, Республика Мордовия, Российская Федерация.

Бочкарев Дмитрий Владимирович. Профессор, доктор

сельскохозяйственных наук, e-mail: bochkarev@ya.ru

Никольский Александр Николаевич. Доцент, кандидат

сельскохозяйственных наук, e-mail: alnik1986@gmail.com

Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608,

St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation

*Luneva Nataliya Nikolaevna. Leading Researcher, Head of Sector, PhD in

Biology e-mail: natalja.luneva2010@yandex.ru

Mordovian State University, Rossiyskay street, 31, 430904 Saransk, Republic

of Mordovia, Russian Federation

Bochkarev Dmitriy Vladimirovich. Professor, DSc in Agriculture, e-mail:

bochkarev@ya.ru

Nikolskiy Alexander Nikolaevich. Assoc. Professor, PhD in Agriculture,

e-mail: alnik1986@gmail.com

* Ответственный за переписку

* Responsible for correspondence

УДК 632.954

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕРБИЦИДА ИМАЗАМОКС

Е.В. Болтухина, В.П. Чернышев, А.Е. Шешенев, С.Д. Каракотов

АО «Щелково Агрохим», Щелково, Россия

В настоящем обзоре обобщены данные об эффективном и безопасном современном гербициде – имазамоксе. Имазамокс принадлежит к группе имидазолиновых гербицидов, контролирующими широкий спектр сорных растений путем ингибирования фермента синтетазы ацетогидроксикислот (AHAS). Он эффективен при низких нормах внесения, имеет низкую токсичность для млекопитающих, обладает благоприятным экологическим профилем и является основным гербицидом для системы Clearfield^(R).

Ключевые слова: имазамокс, имидазолиновые гербициды, синтетаза ацетогидроксикислот, устойчивые к действию имидазолиновых культуры.

Введение

Имидазолиновые гербициды, включающие имазапир (I), имазетапир (II), имазапик (III), имазакин (IV), имазаметабенз метил (V) и имазамокс (VI) (рис. 1), были разработаны компанией American Cyanamide Company (куплена компанией BASF в 2000 г. [Reisch, 2000]) в 1980–1990 гг. [The imidazolinone herbicides, 1991; Los, 1985; Wepplo, 1990; Brady et al., 1998]. В мире они применяются с 1984 г., являясь высокоактивными и высокоизбиратель-

ными гербицидами. Имазамокс был зарегистрирован в США в 1997 г. [The pesticide manual, 2003; United States Environmental...]. В России на сегодняшний день зарегистрированы и рекомендованы к применению имазамокс, имазапир и имазетапир [Государственный каталог..., 2015; Куликова, 2010]. Имидазолиновые гербициды контролируют широкий спектр злаковых и двудольных сорных растений, включая сорные растения водоемов, путем ингибирования фермента синтетазы ацетогидрок-

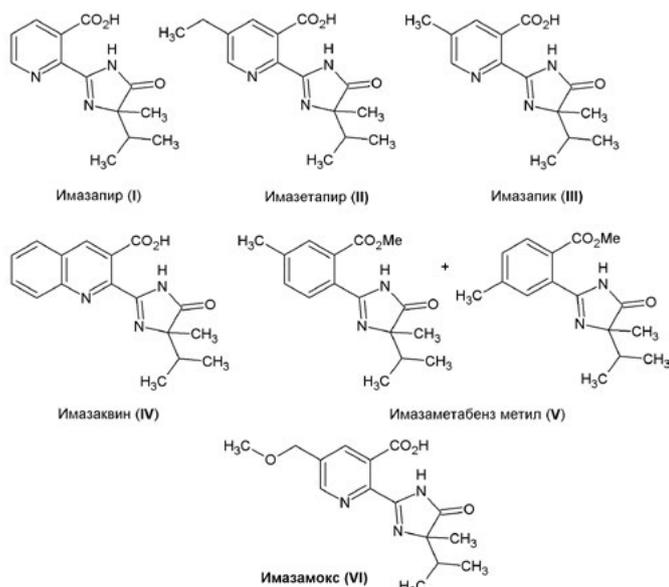


Рисунок 1. Имидазолиноновые гербициды

сикислот (AHAS), также называемого ацетолактатсинтаза (ALS) [Shaner et al., 1997; Herbicides inhibiting..., 1994]. AHAS является ключевым ферментом биосинтеза аминокислот в растениях. С помощью мутагенеза и селекции в растениях было обнаружено несколько вариантов генов AHAS, отвечающих за их устойчивость к имидазолиноновым гербицидам, которые были использованы для создания устойчивых к имидазолиноновым гербицидам маиса (*Zea mays* L.), пшеницы (*Triticum aestivum* L.), риса (*Oryza sativa* L.), масличного рапса (*Brassica napus* L.) и подсолнечника (*Helianthus annuus* L.). Эти культуры были получены с использованием традиционных методов селекции и зарегистрированы под торговой маркой Clearfield^(R) с 1992 г. и по настоящее время [Tan et al., 2005; Pfenning et al., 2008].

Имазамокс – самый новый член семейства имидазолиноновых гербицидов (табл.). Он эффективен при низких нормах внесения, слаботоксичен для млекопитающих и обладает благоприятным экологическим профилем [Brady et al., 1998; Гербицид имазамокс..., 2015; TOXNET...; Fragiorgie et al., 2008; Cedergreen et al., 2005]. Имазамокс существенно отличается от других имидазолиноновых гербицидов благодаря своему остаточному поведению в почве, что позволяет чередовать посев устойчивых и чувствительных к имидазолиноновым гербицидам культур [Brady et al., 1998]. Он зарегистрирован по всему миру для использования на бобовых культурах, включая соевые бобы, люцерну и кормовые бобы, а также на устойчивых к действию имидазолиноновых гербицидов культурах. Имазамокс стал основным из имидазолиноновых гербицидов для системы Clearfield^(R) в Европе благодаря своим благоприятным характеристикам и входит в состав гербицидных композиций как в индивидуальном виде (например, Beyond, Clearcast, Clearmax, Raptor (BASF)), так и в сочетании с другими химическими средствами защиты растений (например, Гермес, Концепт (АО “Щелково Агрохим”)).

История разработки имазамокса

После синтеза и полевых испытаний ряда имидазолиноновых гербицидов дальнейшая разработка препаратов

Таблица. Основные данные о гербициде

Химическое наименование:	(±)-2-[4,5-дигидро-4-метил-4-(1-метил-2-этил)-5-оксо-1 <i>H</i> -имидазол-2-ил]-5-метоксиметил-3-пиридинкарбоновая кислота
CAS номер:	114311-32-9
Семейство гербицидов:	имидазолиноны
Являющиеся объектами виды:	двудольные, злаковые и широколиственные сорные растения
Формы:	кислота и соль
Готовые формы:	водный раствор, водорастворимый концентрат, концентрат суспензии, водорастворимые гранулы
Механизм действия:	ингибитор синтеза аминокислот
Температура плавления:	166.0–166.7 °C
pKa:	2.3, 3.3, 10.8
Растворимость в воде:	4160.0 мг/л (25 °C)
Сорбционная способность:	средняя
Механизм первичной деградации:	микробный метаболизм и фотолиз
LC ₅₀ (синежаберный солнечник):	>119 мг/л
LC ₅₀ (крысы):	>6300 мг/м ³
LD ₅₀ (крысы):	>5000 мг/кг м. т.

этого класса была нацелена на поиск активных веществ со сниженной гидролитической и метаболической стабильностью. Стратегия разработки заключалась в поиске активного гербицида, превращающегося в почве в неактивный метаболит. С использованием модели QSAR предполагалась высокая активность 5-замещенных претендентов. В то же время, поскольку требовалась краткосрочная остаточная активность, рассматривалось два класса соединений: 1 – имеющие тенденцию к гидролизу с образованием менее активных соединений (скрытые карбонильные группы и защищенные альдегиды) и 2 – соединения, чьи заместители предположительно могли обеспечить некоторую метаболическую активацию в отношении ферментативного окисления (метоксиметил- и метокситиометил-замещенные соединения). Синтезированные с учетом этих характеристик производные были испытаны, и для них были определены активность при довсходовом и после всходовом применении, а также периоды полураспада в почве с помощью лабораторного анализа. Соединения с наиболее перспективными профилями были подвергнуты полевым испытаниям, в ходе которых имазамокс выбран как удовлетворяющий требованиям для дальнейшей коммерциализации [Brady et al., 1998].

Синтез имазамокса

Существует несколько подходов к синтезу имазамокса VI (рис. 2). Согласно одному из них ангидрид 5-метил-2,3-пиридиндикарбоновой кислоты (1) хлорируют *N*-хлорсукцинимидом или сульфурилхлоридом и полученное хлорпроизводное (2) вводят в реакцию с аминоксидом (3) [Brady et al., 1998; Los, 1989; Doehner et al., 1994] или аминитрилом (5) [Menges et al., 2010]. Образующиеся продукты ацилирования (4) или (6) далее подвергают либо последовательной обработке метилатом натрия и кислотой [Brady et al., 1998; Los, 1989; Doehner et al., 1994], либо

кислоту гидролизу, взаимодействию с пероксидом водорода в щелочной среде и последующей обработке метилатом натрия [Menges et al., 2010], соответственно, получая имазамок **VI**. Другой подход заключается в бромировании диэтилового эфира 5-метил-2,3-пиридиндикарбоновой кислоты (**7**) *N*-бромсукцинимидом с получением монобромпроизводного (**8**) и его последующей обработкой метилатом натрия с образованием метоксиметилзамещенного диэфира (**9**). Нагревание **9** с аминоксидом **3** и *трет*-бутилатом калия в толуоле позволяет непосредственно получать имазамок **VI** [Brady et al., 1998; Drabb et al., 1999]. В недавней работе [Yang et al., 2014] было также предложено проводить хлорирование диметилового эфира 5-метилпиридиндикарбоновой кислоты перхлоратом натрия в присутствии соляной кислоты в фотолитических условиях с получением его монохлорпроизводного (которое можно далее использовать в последовательности превращений аналогично монобромпроизводному **8**).

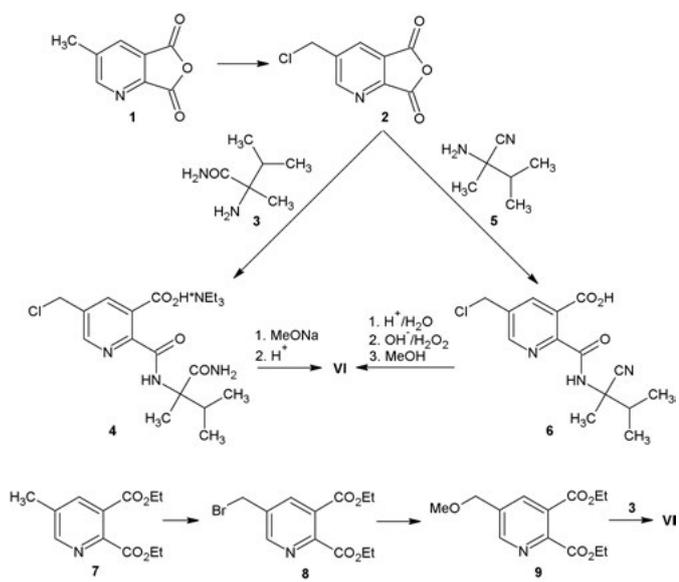


Рисунок 2. Методы синтеза имазамокса

Механизм действия

Имазамок поглощается листьями и частично корневой системой сорных растений и передвигается по флоэме и ксилеме, накапливаясь в меристематических участках. Физиологические изменения, происходящие в растениях после внесения имазамокса, обусловлены ингибированием ацетолактатсинтазы (АНАС), первого фермента в биосинтезе разветвленных аминокислот – валина, лейцина и изолейцина, приводящим к нарушению синтеза белков и нуклеиновых кислот, в результате чего растения прекращают свой рост и развитие. Первые визуальные признаки гербицидного действия на сорняки появляются через 5–7 дней в виде хлороза молодых листьев, карликовости и отставания в росте. Рост чувствительных сорняков останавливается уже через несколько часов после обработки. Полная гибель сорных растений наступает в течение одной-двух недель в зависимости от погодных условий и фазы их развития на момент обработки [Куликова, 2010; Shaner, 1997; Modern crop..., 2012]. Селективность имазамокса в отношении различных культур в первую очередь обусловлена различным метаболизмом гербицида у культур и являющихся объектами сорных растений. Деток-

сикация гербицида происходит посредством оксидазы со смешанной функцией, гидроксимилирующей заместитель в положении 5 с последующей конъюгацией метаболита с глюкозой через гидроксильную группу [Shaner et al., 2003].

Токсикологический профиль

Птицы и млекопитающие

Имазамок имеет благоприятный токсикологический профиль и достаточно низкую токсичность для птиц и млекопитающих. Ему свойственна низкая токсичность после перорального, дермального и ингаляционного воздействия. Пероральная и дермальная LD_{50} у крыс превышает 5000 мг/кг м.т., а ингаляционная LC_{50} у крыс превышает 6300 мг/м³. Пероральная LD_{50} у утки кряквы и виргинской перепелки превышает 2000 мг/кг м.т. Имазамок не оказывает раздражающего действия на глаза или кожу у крыс. В максимизированной пробе у морских свинок не вызывает сенсибилизацию кожи. На основании серии исследований считается, что имазамок не является канцерогенным для мышей или крыс и его канцерогенная опасность для людей маловероятна, [Brady et al., 1998; Pesticides residues..., 2014; Modern crop..., 2012; Hess et al., 2001]. Имазамок экскретируется в основном в моче и фекалиях, не имеет склонности к накоплению [Modern crop..., 2012] и препараты на его основе относятся к 3 классу опасности для человека и 3 классу опасности для пчел [Ракитский, 2011].

Водные организмы

Имазамок относительно малотоксичен для рыб. LC_{50} для изменчивого карпозубика, радужной форели, синезаберного солнечника, американского сома и водяной блохи составляют >119 мг/л [Imazamox. Human..., 2010].

Применение

Имазамок используется как послевсходовый гербицид на бобовых культурах, включая соевые бобы, люцерну и кормовые бобы, а также на устойчивых к действию имидазолиновых культурах пшеницы, подсолнечника, риса и рапса для борьбы с двудольными, злаковыми и широколиственными сорными растениями. Имазамок также зарегистрирован для использования против водных сорных растений и использования в приграничных с водоемами территориях [Clearcast[®] herbicide...].

Метаболиты

У исследованных культур (бобовые, масличные и злаковые растения) наблюдается аналогичный метаболический путь, начинающийся с 5-метоксиметильного заместителя с образованием гидроксиметильного метаболита (**10**) (рис. 3). Далее этот метаболит окисляется с образованием дикислотного метаболита (**11**) или конъюгируется с образованием глюкозидного метаболита (**12**). Также могут образовываться небольшие количества гидроксикислотного метаболита (**13**). Метаболиты не обладают гербицидной активностью [Reasoned opinion..., 2013].

Устойчивые к действию имидазолиновых гербицидов культуры

Устойчивость культур к гербицидам обычно достигается по одному из трех механизмов: устойчивость в месте действия, метаболическая детоксикация и предотвращение достижения гербицидом места действия [Sherman et

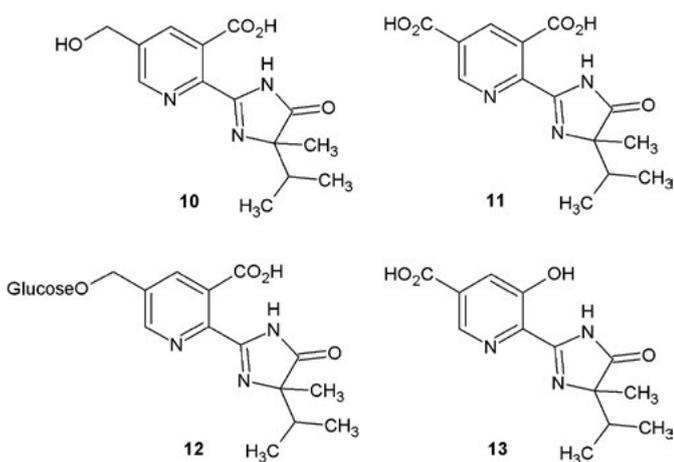


Рисунок 3. Метаболиты имазамокса

al., 1996]. Разработка одного или более механизмов посредством генетической модификации может обеспечить устойчивость культуры к действию гербицидов.

Во многих культурах были обнаружены устойчивые к действию имидазолиновых гербицидов растения с измененными генами AHAS и ферментами. Это позволяет отбирать из этих растений устойчивые к действию имидазолиновых гербицидов культуры на основании механизма резистентности в месте действия.

Андерсон и Джорджсон [Anderson et al., 1989] впервые получили устойчивые к действию имидазолиновых гербицидов растения маиса посредством селекции и регенерации их в клеточной культуре. Последующие исследова-

ния показали, что устойчивость всего растения является полудоминантным признаком и обусловлена изменением генетического кода AHAS. Эта первоначальная работа не только доказала, что устойчивые к действию имидазолиновых гербицидов культуры могут быть селекционированы, но также привела к открытию места действия этого класса гербицидов, к разработке других устойчивых к действию имидазолиновых гербицидов культур.

Устойчивые к действию имидазолиновых гербицидов растения получают как трансгенным, так и нетрансгенным путем. Однако все продаваемые в настоящее время устойчивые к действию имидазолиновых гербицидов культуры разработаны с использованием нетрансгенных методов. Первая устойчивая к действию имидазолиновых гербицидов культура (маис) была введена в 1992 г. Впоследствии были коммерциализированы еще четыре устойчивых к действию имидазолиновых гербицидов культуры (рапс, рис, пшеница и подсолнечник). Все устойчивые к действию имидазолиновых гербицидов культуры продаются под торговой маркой Clearfield[®] [Tan et al., 2005; Pfenning et al., 2008; The imidazolinone herbicides, 1991].

Факторы устойчивости к действию имидазолиновых гербицидов у различных культур были введены с использованием различных методов, включавших селекцию культур тканей (маис), мутагенез пыльцы (маис), селекцию микроспор (рапс), мутагенез семян (пшеница и рис) и внедрение признака устойчивости от сорного родственника (подсолнечник) [Tan et al., 2005].

Библиографический список (References)

- Гербицид имазамокс признан не представляющим опасности / АгроXXI. 2015 // URL: <http://www.agroxxi.ru/gazeta-zaschita-rastanii/novosti/gerbicide-imazamoks-priznan-ne-predstavljayuschim-opasnosti.html> (дата обращения: 15.03.2016).
- Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации / Москва: Министерство сельского хозяйства Российской Федерации. 2015. Ч. 1. 1109 с. // URL: <http://rosselhoscenter.com/2014-02-28-11-39-42/2014-06-20-04-43-08> (дата обращения: 15.03.2016).
- Куликова Н.Ф. Гербициды и экологические аспекты их применения / Н.Ф. Куликова // Москва: Книжный дом «ЛИБРОКОМ». 2010. 152 с.
- Ракитский В.Н. Справочник по пестицидам (токсиколого-гигиеническая характеристика), вып. 1 / В.Н. Ракитский; ред.: В.Н. Ракитский // М.: Издательство «Агрорус». 2011. 960 с.
- Anderson P.C. Herbicide-tolerant mutants of corn / P.C. Anderson, M. Georgeron // Genome. 1989. V. 31. N 12. P. 994–999.
- Brady T.M. The discovery of imazamox, a new broad-spectrum imidazolinone herbicide. In: Synthesis and chemistry of agrochemicals V / T.M. Brady, B. Cross, R.F. Doehner, J. Finn, D.L. Ladner; eds.: D.R. Baker, J.G. Fenyess, G.S. Basarab, D.A. Hunt // Washington, DC, USA: ACS Symposium Series, American Chemical Society. 1998. Ch. 5, P. 30–37.
- Cedergreen N. Does the effect of herbicide pulse exposure on aquatic plants depend on K_{ow} or mode of action? / N. Cedergreen, L. Andersen, C.F. Olesen, H.H. Spliid, J.C. Streibig // Aquat. Toxicol. 2005. V. 71. N 3. P. 261–271.
- Clearcast[®] herbicide product evaluation and recommendation / Executive Office of Energy and Environmental Affairs // URL: <http://www.mass.gov/eea/docs/agr/pesticides/aquatic/clearcast.pdf> (дата обращения: 15.03.2016).
- Doehner J.R.R.F. 5 (and/or 6) substituted 2-(2-imidazolin-2-yl)nicotinic acids, esters and salts, useful as herbicidal agents and novel intermediates for the preparation of said nicotinic acids, esters and salts / J.R.R.F. Doehner, D.W. Ladner, J.M. Finn // Патент США N US5334576 от 02.08.1994.
- Drabb T.W. Process for the preparation of chiral imidazolinone herbicides / T.W. Drabb, P.J. Wepplo // Патент США N US5973154 от 26.10.1999.
- Fragiorge E.J. Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster* / E.J. Fragiorgie, A.A. Rezende, U. Graf, M.A. Spano // Food Chem. Toxicol. 2008. V. 46. N 1. P. 393–401.
- Herbicides inhibiting branched-chain amino acid biosynthesis – recent developments. In: Chemistry of plant protection / Ed.: J. Stetter // Berlin: Springer. 1994. V. 10. 219 p.
- Hess F.G. Imidazolinones. In: Handbook of pesticide toxicology, 2nd ed. / F.G. Hess, J.E. Harris, K. Pendino, K. Ponnock; ed.: R.I. Krieger // San-Diego, San-Francisco, New York, USA: Acad. Press. 2001. V. 2. Ch. 74. P. 1641–1651.
- Imazamox. Human health and ecological risk assessment. Final report. SERA TR-052-24-02a / Syracuse Environmental Research Associates, Inc. (SERA). 2010. 169 p. // URL: www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/pdfs/052-24-02a_Imazamox.pdf (дата обращения: 15.03.2016).
- Los M. 2-(2-Imidazolin-2-yl)-pyridines and quinolines and use of said compounds as herbicidal agents / M. Los // Патент США N US4798619 от 17.01.1989.
- Los M. Preparation of imidazolinyl benzoic acids, esters and salts / M. Los // Патент США N 4544754 от 01.10.1985.
- Menges F. 2-[(1-Цианопропил) карбамойл]-5-хлорометил никотиновой кислоты и ее применение в производстве гербицидных композиций / F. Menges, J. Gebhardt, M. Rack, M. Keil, R.F. Klima, C. David, R. Leicht, H. Zech, J. Schroeder // Международный патент N WO2010054952 от 20.05.2010.
- Modern crop protection compounds, 2nd ed. / Eds.: W. Kraemer, U. Schirmer, P. Jeschke, M. Witschel // Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2012.
- Pesticides residues in food 2014. Report 2014. Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. Rome, Italy, 16–25 September 2014. / FAO Plant Prod. Prot. Paper. 221. 2014. 731 p. // URL: <http://apps.who.int/pesticide-residues-jmpr-database/pesticide?name=Imazamox> (дата обращения: 15.03.2016).
- Pfenning M. The CLEARFIELD[®] technology – A new broad-spectrum post-emergence weed control system for european sunflower growers / M. Pfenning, G. Palfay, T. Guillet // J. Plant Dis. Prot. 2008. Special Issue XXI. P. 649–654.
- Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for imazamox according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. European Food Safety Authority (EFSA). Parma, Italy // EFSA Journal. 2013. V. 11. N 6. 3282. 34 p. // URL: <http://www.efsa.europa.eu/>

- sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3282.pdf (дата обращения: 15.03.2016).
- Reisch M. BASF buys american cyanamid crop unit / M. Reisch // Chem. Eng. News. 2000. V. 78. N 13. P. 7.
- Shaner D.L. Imidazolinone herbicides. In: Encyclopedia of agrochemicals / D.L. Shaner; ed.: J. Plimmer // New York, USA: John Wiley and Sons, 2003, V. 2, P. 769–784.
- Shaner D.L. Acetohydroxyacid synthase inhibitors. In: Herbicide activity: toxicology, biochemistry and molecular biology / D.L. Shaner, B.K. Singh.; eds.: R.M. Roe, J.D. Burton, R.J. Kuhr // Washington, DC, USA: IOS Press. 1997. P. 69–110.
- Mechanisms of action and resistance to herbicides. In: Herbicide resistant crops / T.D. Sherman, K.C. Vaughn, S.O. Duke; ed.: S.O. Duke // Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Inc. 1996. P. 13–35.
- Tan S. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future / S. Tan, R.R. Evans, M.L. Dahmer, B.K. Singh, D.L. Shaner // Pest. Manag. Sci. 2005. V. 61. N 3. P. 246–257.
- The pesticide manual, 13th ed. / Ed.: C.D.S. Tomlin // Alton, UK: British Crop Protection Council Publications. 2003. P. 552–553.
- The imidazolinone herbicides / Eds.: D.L. Shaner, S.L. O'Connor // Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Inc. 1991. 290 p.
- TOXNET Toxicology Data Network / National Institute of Health. U.S. National Library of Medicine // URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 15.03.2016).
- United States Environmental Protection Agency. Office of Pesticide Programs // URL: http://ofmpub.epa.gov/apex/pesticides/f?p=CHEMICALSEARCH:31:::NO:1,3,31,7,12,25:P3_XCHEMICAL_ID:2565 (дата обращения: 15.03.2016).
- Wepplo P. Imidazolinone herbicides: synthesis and novel chemistry / P. Wepplo // Pestic. Sci. 1990. V. 29. N 3. P. 293–315.
- Yang L. Synthesis method of 5-(methoxymethyl)-2,3-pyridine dimethyl dicarboxylate / L. Yang, K. Li, Y. Zou, X. Wang // Патент Китая CN103613535 от 05.03.2014.

Translation of Russian References

- Imazamox herbicide recognized as non-hazardous. AgroXXI. 2015. <http://agro-max.ru/novosti/gerbicide-imazamoks-priznan-ne-predstavlyayushhim-opasnostii/> (date of access 15.03.2016). (In Russian).
- Kulikova N.F. Herbicides and environmental aspects of their use. Moscow. Knizhnyi dom "LIBROKOM". 2010. 152 p. (In Russian).
- Rakitskii V.N. Handbook on pesticides (toxicological and hygienic characteristic), 1st ed. Moscow: "Agrorus". 2011. 960 p. (In Russian).
- State compendium of pesticides and agrochemicals allowed for use within the territory of the Russian Federation. Moscow. Ministry of Agriculture of the Russian Federation. 2015. Part 1. 1109 p. <http://rosselhocenter.com/2014-02-28-11-39-42/2014-06-20-04-43-08> (date of access 15.03.2016). (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 1(91), p. 38–42

PROSPECTS FOR APPLICATION OF IMAZAMOX HERBICIDE

E.V. Boltukhina, V.P. Chernyshev, A.E. Sheshenev, S.D. Karakotov

Shchelkovo Agrokhim, Shchelkovo, Russia

This review summarizes data on Imazamox, an efficient and safe modern herbicide. Imazamox belongs to a group of imidazolinone herbicides, controlling a wide range of weeds by inhibiting acetohydroxy acid synthase (AHAS). It is efficient at low application rates, has low mammalian toxicity, possesses a favorable ecological profile, being the key herbicide for the Clearfield[®] system.

Keywords: Imazamox; imidazolinone herbicide; acetohydroxy acid synthase; resistant crop.

Сведения об авторах

АО "Щелково Агрохим", ул. Заводская, 2, 141101, Московская область, Щелково, Россия

*Болтухина Екатерина Викторовна. Ведущий научный сотрудник, кандидат химических наук, e-mail: chemist307@betaren.ru

Чернышев Валерий Петрович. Начальник технологического отдела, кандидат химических наук, e-mail: cvp@betaren.ru

Шешенев Андрей Евгеньевич. Начальник лаборатории синтеза, кандидат химических наук, e-mail: sheshenev.a@betaren.ru

Каракотов Салис Добаевич. Генеральный директор компании АО "Щелково Агрохим", доктор химических наук, академик РАН, e-mail: karakotov@betaren.ru

Information about the authors

Shchelkovo Agrokhim, Zavodskaya St., 2, 141101, Moscow region, Shchelkovo, Russia

*Boltukhina Ekaterina Viktorovna. Leading Researcher, PhD in Chemistry, e-mail: chemist307@betaren.ru

Chernyshev Valerii Petrovich, Head of Process Department, PhD in Chemistry, e-mail: cvp@betaren.ru

Sheshenev Andrey Evgen'evich. Head of Synthesis Laboratory, PhD in Chemistry, e-mail: sheshenev.a@betaren.ru

Karakotov Salis Dobaevich. General Director, DSc in Chemistry, Academician, e-mail: karakotov@betaren.ru

* Ответственный за переписку

* Responsible for correspondence

УДК 632.237.12:633/635(470.2)

ХИЩНЫЕ МУХИ В ПОЛЕВЫХ АГРОЦЕНОЗАХ НА СЕВЕРО-ЗАПАДЕ НЕЧЕРНОЗЕМНОЙ ЗОНЫ РОССИИ

А.М. Шпанев^{1,2}, С.В. Голубев², И.В. Шамшев^{2,3}, И.Я. Гричанов²

¹ Агрофизический научно-исследовательский институт, Санкт-Петербург, Россия,

² Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург, Россия,

³ Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург, Россия

Среди двукрылых насекомых, встречающихся в агроценозах, традиционно основное внимание уделяется группам, представленным в личиночной стадии афиодофагами и паразитоидами. Хищничество широко распространено в отряде Diptera как во взрослой, так и в личиночной стадиях. Значение мух, хищничающих в имагинальной стадии, часто

игнорируется, хотя, их видовое разнообразие и численность могут достигать значительных показателей на различных сельскохозяйственных культурах. Изученность хищных двукрылых насекомых в сельскохозяйственных станциях обитания по-прежнему остается слабой, что подтверждается редкостью соответствующих публикаций в отечественной литературе. Согласно результатам регулярных кошений в посевах озимой и яровой пшеницы, озимой ржи и посадках картофеля (Ленинградская область, 2012–2015 гг.), обилие хищных мух варьирует от 0 до 5.65 экз./10 взм. сачком в зависимости от фазы развития. Их состав представлен не менее, чем 50 видами. Установлено стациональное распределение, сезонная динамика численности и структура доминирования хищных мух (Therevidae, Asilidae, Empididae, Hybotidae и Dolichopodidae) в полевых агроценозах на северо-западе Нечерноземной зоны России. Максимальное присутствие хищных мух в агробиоценозах регистрируется со второй декады июня по первую декаду июля включительно. Основу комплекса хищных мух составляют представители семейства Hybotidae. Общая численность хищных мух по годам изменяется незначительно, тогда как долевое участие отдельных семейств в общем количестве особей изменчиво. В посевах зерновых, за исключением озимой ржи, обилие хищных мух значительно больше, чем в ценозах других культур.

Ключевые слова: хищные мухи, агроценоз, северо-запад Нечерноземной зоны, структура доминирования, динамика численности.

Среди двукрылых насекомых, встречающихся в агроценозах, традиционно основное внимание уделяется группам, представленным в личиночной стадии афидофагами и паразитоидами (в основном представители семейств Syrphidae и Tachinidae). Значение мух, хищничающих в имагинальной стадии, часто игнорируется хотя, их видовое разнообразие и численность могут достигать значительных показателей на различных сельскохозяйственных культурах. Имаго хищных мух (в первую очередь представители семейств Asilidae, Empididae, Hybotidae и Dolichopodidae), являясь энтомофагами с широкой пищевой специализацией, обладают высокой потенциальной способностью к снижению численности вредных насекомых в агроценозах [Нарчук, 2003; Гричанов, Вольфов, 2008]. Об их большом хозяйственном значении можно предполагать исходя из высоких показателей обилия, отмеченных в литературе. Например, результаты многолетних исследований агроценозов зерновых на территории Воронежской области (Каменная степь) показали, что в травостое озимой пшеницы и озимого тритикале хищные мухи семейств Asilidae, Empididae, Hybotidae и Dolichopodidae по обилию преобладают среди всех хищных и паразитических членистоногих и составляют около 40% (Шпанев, Голубев, 2008). Dolichopodidae присутствуют в значительных

количествах в плодовых садах, на виноградниках, озимой и яровой пшенице, являясь устойчивым компонентом этих агроэкосистем [Negrobov, Kamolov, 1992; Гричанов, 1997]. Представители семейства Hybotidae так же отмечались на многих сельскохозяйственных культурах [Stark, Wetzel, 1987; Longley, 1997].

В Центральном Черноземье России более насыщенны хищными мухами посевы озимых зерновых культур, которые значительно превосходят ранние и поздние яровые культуры, что обусловлено их сезонной динамикой численности в данном регионе. При этом наибольшего обилия хищные мухи достигают в фазы колошения и цветения озимых зерновых, стеблевания – яровых зерновых и проса, цветения – гороха, бутонизации – гречихи, ветвления – сои [Шпанев, Голубев, 2008, 2009, 2010; Шпанев, 2012].

Тем не менее, изученность хищных двукрылых насекомых в сельскохозяйственных станциях обитания по-прежнему остается слабой, что подтверждается редкостью соответствующих публикаций в отечественной литературе. В значительной мере это относится к Северо-Западному региону, менее интересному для исследователей, занимающихся изучением фауны агробиоценозов.

Материалы и методы исследований

Видовой состав хищных мух, их обилие и сезонная динамика численности в ценозах разных культур изучались на полях Меньковского филиала Агрофизического научно-исследовательского института (Ленинградская обл., Гатчинский район) в период 2012–2015 гг. С этой целью проводились регулярные кошения энтомологическим сачком, приуроченные к фенологическим фазам развития культурных растений. Один учет состоял из 6–12 проб по 10 взмахов сачком каждая. Ежегодное количество учетов

за период вегетации озимой и яровой пшеницы, озимой ржи составляло 9, ярового рапса – 10, ячменя и картофеля – 8. Всего проведено 1172 кошений. Общие сборы хищных мух насчитывали 1570 особей. Видовая принадлежность выловленных мух уточнялась соответствующими специалистами-систематиками: Asilidae – Голубевым С.В. (ВИЗР), Dolichopodidae – Гричановым И.Я. (ВИЗР), Empididae и Hybotidae – Шамшевым И.В. (ЗИН, ВИЗР).

Результаты исследований

В результате проведенных исследований в полевых агроценозах северо-запада Нечерноземной зоны было выявлено не менее 50 видов хищных мух, принадлежащих 6 семействам Brachycera (Orthorrhapha). Наиболее представительные семейства – Dolichopodidae, Empididae и Hybotidae. Самое малочисленное по составу видов, встречаемых мух в стеблестое культурных растений – семейство Therevidae (табл. 1). При этом больше всего видов хищных мух было зафиксировано в посевах яровой пшеницы (40), меньше всего – в посевах озимой ржи (12) и посадках картофеля (10). Промежуточное положение по видовому разнообразию хищных мух занимают ценозы озимой

пшеницы, ярового ячменя и рапса.

К широко распространенным видам, которые встречались во всех или большинстве агроценозов, могут быть отнесены *Leptogaster cylindrica*, *Dolichophorus kerteszi*, *Dolichopus longicornis*, *Dolichopus plumipes*, *Sciapus longulus*. Среди выловленных особей оказалось большое количество редких видов, встречаемых в посевах какой-то одной из культур. К таким видам относятся Dolichopodidae – *Chrysotus suavis* (рапс), *Dolichopus trivialis* (яровая пшеница); Empididae – *Empis nigripes* (ячмень), *Empis picipes* (рапс), *Hilara albipennis* (яровая пшеница), *Hilara clupeata* (озимая пшеница), *Rhamphomyia albipennis* (озимая

рожь), *Rhaphomyia obscura* (яровая пшеница); Hybotidae – *Drapetis exilis* (яровая пшеница), *Platypalpus pseudorapidus* (озимая пшеница); Therevidae – *Thereva circumscripta* (яровая пшеница), *Thereva plebeja* (озимая пшеница).

Потенциально список видов, представленный в табл. 1, может быть увеличен за счет *Bicellaria vana* Collin, *Hybos grossipes* Linnaeus, *Platypalpus articulatus* Macquart, наличие которых было выявлено на этих же полях, занятых зерновыми культурами, более ранними исследованиями [Соколов, 2006].

Обилие хищных мух в изучаемых агроценозах варьировало от 0.50 до 1.75 экз./10 взм. сачком в среднем за период вегетации культур. Меньше всего хищных мух вылавливалось в травостое картофеля (0.50 экз./10 взм.) и озимой ржи (0.62 экз./10 взм.), значительно больше – в посевах ярового рапса (1.37 экз./10 взм.). Наиболее высокие показатели обилия хищных мух были присущи ценозам яровой пшеницы (1.75 экз./10 взм.), озимой пшеницы (1.66 экз./10 взм.) и ячменя (1.60 экз./10 взм.).

Численное преимущество в полевых агроценозах имеет семейство Hybotidae (75.4%), далее в порядке убывания их долевого участия в общем обилии хищных мух Dolichopodidae (16.8%), Empididae (5.2%) и Asilidae (2.6%). При этом относительное обилие мух Hybotidae колебалось в пределах 69.4–91.9%, Dolichopodidae – 1.6–28.6%, Empididae – 0.2–12.7%, Asilidae – 1.0–4.4% (табл. 2). Нами были выявлены некоторые особенности в заселении агроценозов хищными мухами. Так, в посевах озимой ржи, в сравнении с другими агроценозами, велика доля мух Hybotidae и значительно меньше мух Dolichopodidae. В посадках картофеля редко встречаются мухи Empididae и значительно чаще, чем в ценозах других культур, мухи Dolichopodidae. Для озимой пшеницы можно отметить значительное присутствие в посевах мух Empididae. Виды *Thereva circumscripta* и *Th. plebeja*, а также *Microphor holosericeus* были обнаружены в единичных экземплярах и как хищники имеют второстепенное значение. Первый вид попал в кошени в посевах яровой пшеницы в фазу выхода в трубку (06.06.2013), второй – на озимой пшенице в фазу налива зерна (24.06.2013), третий – в посевах ячменя в фазу стеблевания (15.06.2012) и ярового рапса – в фазу формирования стручков (11.07.2014).

Анализ структуры доминирования хищных мух в преобладающих по численности семействах показал следующее. В семействе Hybotidae значительное преимущество в обилии имел вид *Bicellaria sulcata*, другие виды с заметным обилием – это *Platypalpus infectus*, *Hybos culiciformis* и *Platypalpus minutus*. В семействе Empididae массовый вид *Empis livida*, второй по значимости – *Hilara clypeata*. На них в совокупности приходится 89.1% от всех мух этого семейства. В семействе Dolichopodidae по числу выловленных особей в агроценозах преобладает *Dolichopus longicornis*, затем в порядке убывания значимости располагаются *Dolichophorus kerteszi*, *Chrysotus gramineus*, *Dolichopus plumipes*, *Sciapus longulus*. На неупомянутые виды этого семейства приходится еще 23.5% особей (рис. 1). Среди ктырей (Asilidae) можно выделить лишь один массовый вид – *Leptogaster cylindrica*, на который приходилось 62% особей.

Таблица 1. Видовой состав и распределение хищных мух в полевых агроценозах Ленинградской области, 2012–2015 гг.

Таксоны	Озимые		Яровые		Картофель	Рапс
	пшеница	рожь	пшеница	ячмень		
Asilidae						
<i>Dioctria cothurnata</i> Meigen	+	-	-	+	-	+
<i>Dioctria hyalipennis</i> Fabricius	-	-	+	+	-	-
<i>Leptogaster cylindrica</i> Degeer	+	+	+	+	-	+
<i>Machimus atricapillus</i> Fallén	+	-	+	-	+	+
<i>Machimus pyragra</i> Zeller	-	-	-	+	-	-
Прочие Asilidae	-	-	+	-	-	-
Dolichopodidae						
<i>Chrysotus femoratus</i> Zetterstedt	+	-	+	-	-	-
<i>Chrysotus gramineus</i> Fallén	+	-	+	+	-	+
<i>Chrysotus neglectus</i> Wiedemann	-	-	+	+	-	+
<i>Chrysotus suavis</i> Loew	-	-	-	-	-	+
<i>Chrysotus</i> spp.	+	+	+	+	+	+
<i>Dolichophorus kerteszi</i> Lichtwardt	+	-	+	+	+	+
<i>Dolichopus linearis</i> Meigen	-	-	-	+	-	+
<i>Dolichopus longicornis</i> Stannius	+	+	+	+	-	+
<i>Dolichopus plumipes</i> Scopoli	+	-	+	+	+	+
<i>Dolichopus simplex</i> Meigen	+	-	+	+	-	+
<i>Dolichopus trivialis</i> Haliday	-	-	+	-	-	-
<i>Dolichopus unguilatus</i> Linnaeus	+	-	+	+	-	-
<i>Dolichopus</i> spp.	+	-	-	+	-	-
<i>Medetera</i> sp.	-	-	+	-	-	-
<i>Microphor holosericeus</i> Meigen	-	-	-	+	-	+
<i>Sciapus longulus</i> Fallén	+	-	+	+	+	+
<i>Sciapus</i> spp.	+	-	+	-	-	-
Empididae						
<i>Empis caudatula</i> Loew	-	-	+	+	-	+
<i>Empis livida</i> Linnaeus	+	-	+	+	-	+
<i>Empis nigripes</i> Fabricius	-	-	-	+	-	-
<i>Empis picipes</i> Meigen	-	-	-	-	-	+
<i>Empis</i> spp.	+	+	+	+	-	+
<i>Hilara albipennis</i> von Roser	-	-	+	-	-	-
<i>Hilara clypeata</i> Meigen	+	-	-	-	-	-
<i>Hilara</i> spp.	+	+	+	+	-	+
<i>Rhaphomyia albipennis</i> von Roser	-	+	-	-	-	-
<i>Rhaphomyia obscura</i> Zetterstedt	-	-	+	-	-	-
<i>Rhaphomyia</i> sp.	-	+	-	-	-	-
Hybotidae						
<i>Bicellaria sulcata</i> Zetterstedt	+	-	+	+	-	+
<i>Bicellaria</i> sp.	+	-	+	+	-	+
<i>Drapetis exilis</i> Meigen	-	-	+	-	-	-
<i>Hybos culiciformis</i> Fabricius	+	-	+	-	+	+
<i>Platypalpus agilis</i> Meigen	+	-	+	-	-	-
<i>Platypalpus infectus</i> Collin	-	-	+	-	-	+
<i>Platypalpus minutus</i> Meigen	-	-	+	-	-	+
<i>Platypalpus pallidicornis</i> Collin	+	-	+	-	-	-
<i>Platypalpus pallidiventris</i> Meigen	+	-	+	-	+	-
<i>Platypalpus pseudorapidus</i> V. Kovalev	+	-	-	-	-	-
<i>Platypalpus</i> spp.	+	+	+	+	+	+
Therevidae						
<i>Thereva circumscripta</i> Loew	-	-	+	-	-	-
<i>Thereva plebeja</i> Linnaeus	+	-	-	-	-	-
Всего видов:	33	12	40	29	10	29

Таблица 2. Обилие хищных мух в полевых агроценозах Ленинградской области, 2012–2015 гг.

Культура	Asilidae		Dolichopodidae		Empididae		Hybotidae	
	экз./10 взм.	%	экз./10 взм.	%	экз./10 взм.	%	экз./10 взм.	%
Озимая пшеница	0.04	2.4	0.32	19.3	0.21	12.7	1.09	65.7
Озимая рожь	0.006	1.0	0.01	1.6	0.03	4.8	0.57	91.9
Яровая пшеница	0.07	4.0	0.39	22.3	0.06	3.4	1.23	70.3
Ячмень	0.07	4.4	0.27	17.0	0.05	3.1	1.20	75.5
Яровой рапс	0.02	1.5	0.16	11.7	0.10	7.3	1.09	79.6
Картофель	0.01	2.0	0.14	28.6	0.003	0.2	0.34	69.4

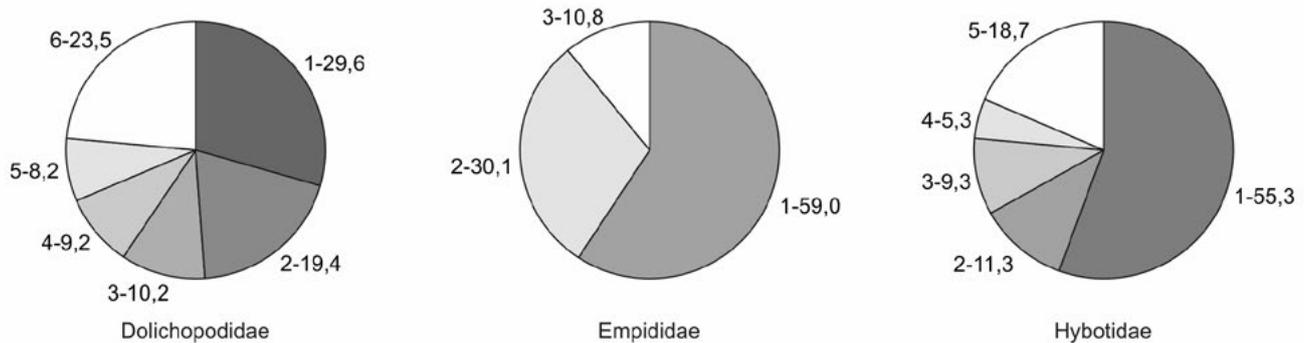


Рисунок 1. Соотношение обилия видов хищных мух в полевых агроценозах на северо-западе Нечерноземной зоны, Ленинградская обл., 2012–2015 гг.

Dolichopodidae: 1- *Dolichopus longicornis*, 2- *Dolichophorus kerteszi*, 3- *Chrysotus gramineus*, 4- *Dolichopus plumipes*, 5- *Sciapus longulus*, 6- остальные виды;

Empididae: 1- *Empis livida*, 2- *Hilara clypeata*, 3- остальные виды;

Hybotidae: 1- *Bicellaria sulcata*, 2- *Platypalpus infectus*, 3- *Hybos culiciformis*, 4- *Platypalpus minutus*, 5- остальные виды.

Обилие хищных мух по годам варьировало в слабой степени и составило 0.91, 1.97, 1.33 и 1.19 экз./10 взм. сачком, соответственно, в 2012, 2013, 2014 и 2015 гг. Наименьшее их количество отмечалось в 2012 г., когда из-за обильных осадков ГТК в июне составил 3.1. Тогда же фиксировалось наименьшее относительное обилие мух Hybotidae и наибольшее Dolichopodidae. В наиболее теплом и засушливом 2015 г. с ГТК в июне, равным 0.8, численное преимущество мух Hybotidae над осталь-

ными семействами оказалось еще более выраженным, тогда как доля мух Empididae оказалась наименьшей за 4 года наблюдений (табл. 3). В целом удельное обилие хищных мух из семейства Asilidae колебалось по годам в пределах 0.006–0.10 экз./10 взм. (0.5–4.8%), семейства Dolichopodidae – 0.11–0.31 экз./10 взм. (8.5–34.1%), Empididae – 0.008–0.16 экз./10 взм. (0.6–12.0%), Hybotidae – 0.47–1.52 экз./10 взм. (51.6–81.5%).

Таблица 3. Варьирование обилия хищных мух по годам в полевых агроценозах Ленинградской области, 2012–2015 гг.

Семейства	Обилие, экз./10 взм.				Относительное обилие, %			
	2012	2013	2014	2015	2012	2013	2014	2015
Asilidae	0.04	0.10	0.006	0.01	4.4	4.8	0.5	0.8
Dolichopodidae	0.31	0.29	0.19	0.11	34.1	14.0	14.3	8.5
Empididae	0.09	0.06	0.16	0.008	9.9	2.9	12.0	0.6
Hybotidae	0.47	1.52	0.97	1.06	51.6	73.4	72.9	81.5

Сезонная динамика численности хищных мух в полевых агроценозах во многом определяется развитием наиболее массовых их представителей из семейства Hybotidae. Максимальной численности эти мухи достигают в фазу налива зерна озимых зерновых культур, стеблевание – колошение – яровых зерновых, формирование стручков и налив семян – ярового рапса, формирование клубней – у картофеля (рис. 2–7). В посевах зерновых высокая плотность мух Hybotidae (около 2 экз./10 взм.) сохраняется на протяжении месяца. Для озимой ржи это период от фазы цветения до фазы молочно-восковой спелости, для яровой пшеницы – от фазы выхода в трубку до налива зерна, для ячменя – от фазы колошения до молочно-восковой спелости. В посадках картофеля более высокие показатели обилия мух Hybotidae отмечаются начиная с бутонизации и заканчивая ростом клубней, на полях ярового рапса – с

ветвления до зеленой спелости.

Мухи-зеленушки (Dolichopodidae) имеют во многом схожую сезонную динамику численности с мухами семейства Hybotidae. Особенно наглядно это обнаруживается в ценозах зерновых культур. В картофельном агробиоценозе можно отметить два пика численности, приходящиеся на период смыкания рядков и фазы формирования и рост клубней (рис. 6). В агроценозе ярового рапса максимум численности мух-зеленушек приходится на более ранние фазы развития культуры – ветвление и бутонизация (рис. 7).

Толкунчики (Empididae) заметного обилия достигают во второй половине вегетации озимых зерновых культур, первой половине вегетации яровых зерновых, в середине вегетации – на яровом рапсе. Схожие черты имеет сезонная динамика численности ктырей (Asilidae). В стеблестое

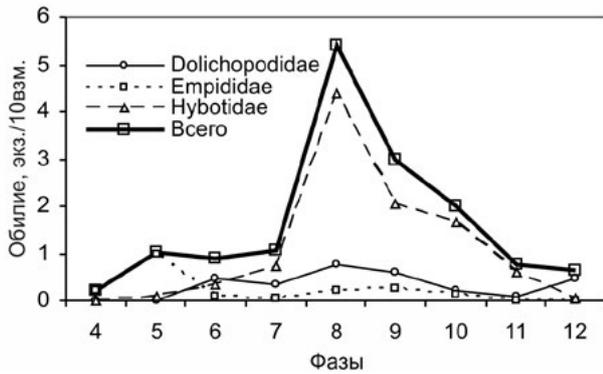


Рисунок 2. Сезонная динамика численности хищных мух в ценозе озимой пшеницы

Фенофазы: 4 – выход в трубку, 5 – стеблевание, 6 – колошение, 7 – цветение, 8 – наливание зерна, 9 – молочная, 10 – молочно-восковая, 11 – восковая, 12 – полная зрелость

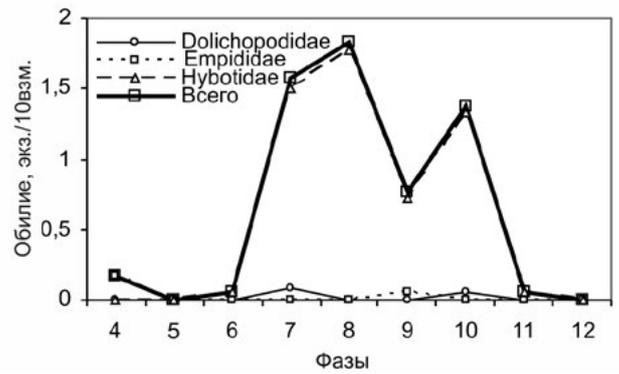


Рисунок 3. Сезонная динамика численности хищных мух в ценозе озимой ржи

Фенофазы: тоже, что на рис. 2

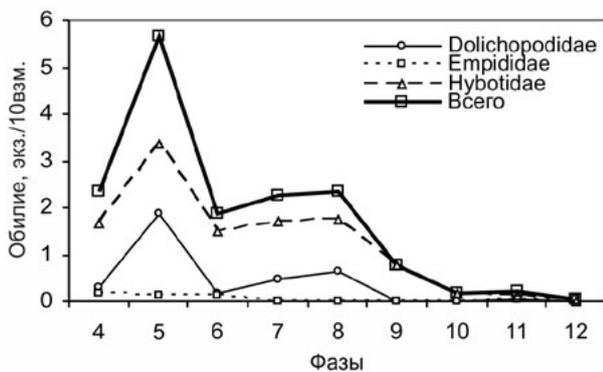


Рисунок 4. Сезонная динамика численности хищных мух в ценозе яровой пшеницы

Фенофазы: тоже, что на рис. 2

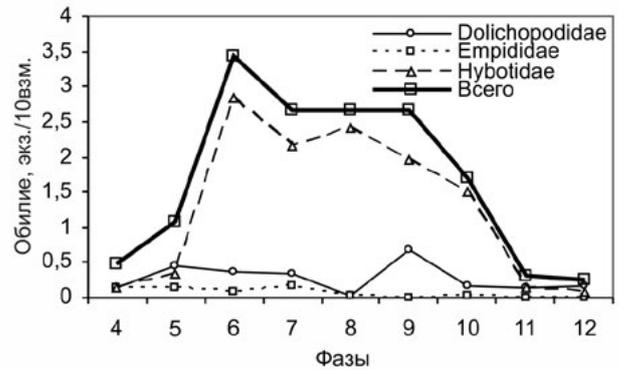


Рисунок 5. Сезонная динамика численности хищных мух в ценозе ярового ячменя

Фенофазы: тоже, что на рис. 2

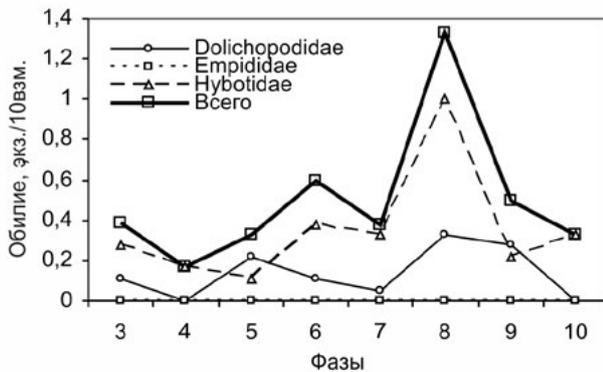


Рисунок 6. Сезонная динамика численности хищных мух в ценозе картофеля

Фенофазы: 3 – высота 15–20 см, 4 – 25–30 см,

5 – смыкание рядков, 6 – бутонизация, 7 – цветение,

8 – формирование клубней, 9 – рост клубней, 10 – созревание

озимых зерновых чаще всего они встречались в фазу налива зерна и в период созревания, яровых зерновых – выхода в трубку - налива зерна, ярового рапса – формирование стручков - налива семян, картофеля – в фазу бутонизации.

Если рассмотреть сезонную динамику численности хищных мух по календарным датам учетов, окажется, что начиная со второй декады мая их обилие в полевых агроценозах постепенно возрастает и максимальных значений достигает в период со второй декады июня по первую декаду июля. Этот период связан с максимальными численностью и видовым разнообразием этих насекомых в окружающих естественных биотопах, откуда они, очевидно,

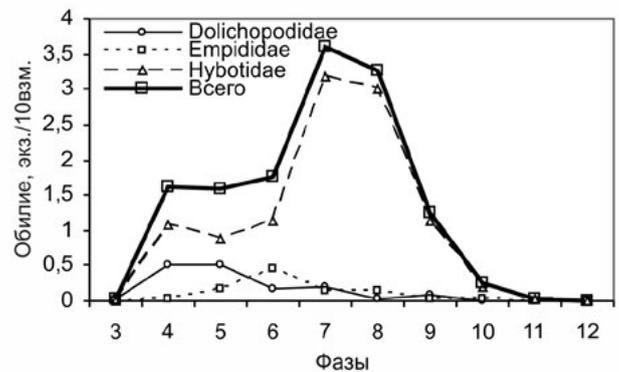


Рисунок 7. Сезонная динамика численности хищных мух в ценозе ярового рапса

Фенофазы: 3 – розетка листьев, 4 – ветвление, 5 – бутонизация,

6 – цветение, 7 – формирование стручков, 8 – наливание семян,

9 – зеленая зрелость, 10 – желто-зеленая зрелость,

11 – желтая зрелость, 12 – полная зрелость

мигрируют в агроценозы. Затем происходит резкое снижение их численности, совпадающее с созреванием озимых зерновых культур и ярового ячменя. Еще большее снижение обилия хищных мух отмечается во второй декаде августа, когда начинается созревание ярового рапса и картофеля (рис. 8). При этом сезонная динамика численности мух Dolichopodidae, Empididae и Hybotidae синхронизирована во времени, что, по всей видимости, обусловлено динамикой численности их основных жертв. Необходимо также отметить более раннее появление в агроценозах мух Empididae, которые уже в мае месяце в массе сосредотачиваются на полях озимых зерновых культур с более разви-

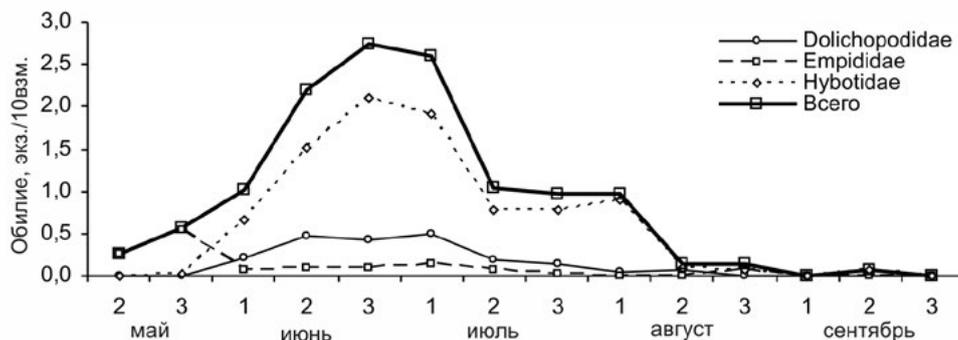


Рисунок 8. Динамика численности хищных мух по календарным датам учетов в полевых агроценозах на северо-западе Нечерноземной зоны

той растительностью. В естественных биотопах представители этого семейства так же появляются раньше видов Dolichopodidae и Hybotidae.

Таким образом, в полевых агроценозах на северо-западе Нечерноземной зоны формируется разнообразный видовой и довольно насыщенный численный состав хищных мух, основу которого составляют представители семейства Hybotidae. Общая численность хищных мух по годам изменяется незначительно, тогда как долевое участие от-

дельных семейств в общем количестве особей изменчиво. Оно определяется особенностями стеблестоя, сроками и погодными условиями периода вегетации культурных растений. В посевах зерновых, за исключением озимой ржи, обилие хищных мух значительно больше, чем в ценозах других культур. Максимальное присутствие хищных мух в агроценозах наблюдается со второй декады июня – по первую декаду июля включительно.

Работа И.В. Шамшева выполнена в рамках гостемы №01201351189 и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант №15-04-03457).

Библиографический список (References)

- Гричанов И.Я. Хищные мухи семейства Dolichopodidae (Diptera) в агроэко системах Северного Кавказа. Место и роль двукрылых насекомых в экосистемах. СПб.: 1997. С. 42–43.
- Гричанов И.Я., Вольфов Б.И. Хищные мухи-зеленушки – перспективные энтомофаги. Защита и карантин растений 2008. N 2. С. 60–61.
- Нарчук Э.П. Определитель семейств двукрылых насекомых (INSECTA: DIPTERA) фауны России и сопредельных стран (с кратким обзором семейств мировой фауны). Труды Зоологического института РАН. Т. 294. СПб.: 2003. С. 1–250.
- Соколов И.М. Сообщества членистоногих, формирующиеся на посевах зерновых культур в фазе их спелости (Меньковский стационар Ленинградской области). Меньковский агроэкологический стационар. СПб.: 2006. С. 43–57.
- Шпанев А.М., Голубев С.В. Биоценоз озимых зерновых культур (Юго-Восток ЦЧЗ). СПб.: 2008. 284 с.

- Шпанев А.М., Голубев С.В. Биоценоз горохового поля в Каменной степи (Юго-Восток ЦЧЗ). СПб., 2009. 144 с.
- Шпанев А.М., Голубев С.В. Агробиоценоз яровых зерновых культур (Юго-Восток ЦЧЗ). СПб., 2010. 124 с.
- Шпанев А.М. Полевые экосистемы агроландшафта Каменной степи и их фитосанитарное оздоровление. СПб., 2012. 304 с.
- Negrobov O.P., Kamolov V.I. Dipterofauna in agrobiocenosis of winter wheat in forest-steppe of Voronezh Region. 4 Съезд Украинского энтомологического общества. Харьков, 1992. С. 115–116.
- Longley M. 1997. Densities and spatial distributions of predatory flies (Diptera: Empididae) in winter wheat. The Entomologist, 1997. 116 (3). P. 207–221.
- Stark A., Wetzel Th. Fliegen der Gattung Platypalpus (Diptera, Empididae) – bisher wenig beachtete Prädatoren im Getreidebestand. Journal of Applied Entomology. 1987. 103. P. 1–14.

Translation of Russian References

- Grichanov I.Ya. Predatory flies of the family Dolichopodidae (Diptera) in agroecosystems of the Northern Caucasus. In: Diptera (Insecta) in Ecosystems, St. Petersburg, 1997. P. 42–43.
- Grichanov I.Ya., Volfov B.I. Predatory Dolichopodidae – promising entomophages. Zashchita i Karantin Rastenii. 2008. N 2. P. 60–61.
- Narchuk E.P. Keys to families of Diptera (Insecta) in the fauna of Russia and adjacent countries (with a brief overview of families of the world fauna). In: Trudy Zoologicheskogo instituta RAN. V. 294. St. Petersburg, 2003. 250 p.
- Negrobov O.P., Kamolov V.I. Dipterofauna in agrobiocenosis of winter wheat in forest-steppe of Voronezh Region. In: 4th S'ezd Ukrainского entomologicheskogo obshchestva. Kharkov, 1992. P. 115–116.

- Shpanev A.M. Field agricultural landscape ecosystem of the Kamennaya steppe and phytosanitary improvement. St. Petersburg, 2012. 304 p.
- Shpanev A.M., Golubev S.V. Agrobiocenosis of spring grain crops (South-Eastern Central Chernozem Zone). St. Petersburg, 2010. 124 p.
- Shpanev A.M., Golubev S.V. Biocenosis of field pea in Kamennaya steppe (South-Eastern Central Chernozem Zone). St. Petersburg, 2009. 144 p.
- Shpanev A.M., Golubev S.V. Biocenosis of winter grain crops (South-Eastern Central Chernozem Zone). St. Petersburg, 2008. 284 p.
- Sokolov I.M. Community of arthropods formed on grain crops in phase of maturity (Menkovskii station of Leningrad region). In: Menkovskii agroekologicheskii stacionar. St. Petersburg, 2006. P. 43–57.

Plant Protection News, 2017, 1(91), p. 42–48

PREDATORY FLIES IN FIELD AGROCENOSSES OF NORTHWEST OF NON-CHERNOZEM ZONE OF RUSSIA

A.M. Shpanev^{1,2}, S.V. Golubev², I.V. Shamshev^{2,3}, I.Ya. Grichanov²

¹Agrophysical Research Institute, Saint-Petersburg, Russia,

²All-Russian Institute of Plant Protection, Saint-Petersburg, Russia,

³Zoological Institute, Saint-Petersburg, Russia

Species composition, abundance, station distribution, seasonal population dynamics and dominance structure of predatory flies (Therevidae, Asilidae, Empididae, Hybotidae and Dolichopodidae) in agrocenoses of Northwest of Non-Chernozem zone of Russia is described. The species composition contains not less than 50 species, abundance is 0 to 5.65 specimens/10 net-

sweeps depending on a culture development phase. The complex of predatory flies is based on representatives of the family Hybotidae. Total number of predatory flies changes slightly by years, whereas the share of separate families in total individuals is changeable. Abundance of predatory flies is the highest on grain crops, except for winter rye. They are the most abundant in agrocenoses from the second third of June till the first third of July.

Keywords: predatory fly; agrocenosis; abundance; distribution; dominance; population dynamics.

Сведения об авторах

Агрофизический научно-исследовательский институт, Гражданский пр., 14, 195220, Санкт-Петербург, Российская Федерация
 Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация
 *Шпанев Александр Михайлович. Зав. лаб. (АФИ), зав. сектором (ВИЗР), доктор биологических наук, e-mail: ashpanev@mail.ru
 Голубев Сергей Валериевич. Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: su-va-sti@yandex.ru
 Шамшев Игорь Васильевич. Зав. сектором (ВИЗР), ст. научн. сотр. (ЗИН), кандидат биологических наук, e-mail: shamshev@mail.ru
 Гричанов Игорь Яковлевич. Зав. лабораторией, доктор биологических наук, e-mail: grichanov@mail.ru

* Ответственный за переписку

Information about the authors

Agrophysical Research Institute, Grahdanskiy pr., 14, 195220, St. Petersburg, Russian Federation
 All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation
 *Shpanev Aleksandr Mikhailovich. Head of Laboratory (AFI), Head of Sector (VIZR), DSc in Biology, e-mail: ashpanev@mail.ru
 Golubev Sergey Valeriyevich. Senior Researcher, PhD in Biology, e-mail: su-va-sti@yandex.ru
 Shamshev Igor Vasiliyevich. Head of Sector (VIZR), Senior Researcher (ZIN), PhD in Biology, e-mail: shamshev@mail.ru
 Grichanov Igor Yakovlevich. Head of Laboratory, DSc in Biology, e-mail: grichanov@mail.ru

* Responsible for correspondence

УДК: 579.64: 632.7

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА БАЦИКОЛ ПРОТИВ 28-ТОЧЕЧНОЙ КАРТОФЕЛЬНОЙ КОРОВКИ *HENOSEPILOACHNA VIGINTIOCTOMACULATA* MOTSCH. (COLEOPTERA, COCCINELLIDAE) НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ

С.Д. Гришечкина¹, Т.К. Коваленко²

¹ФГБНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, Санкт-Петербург;

²ФГБНУ Дальневосточный НИИ защиты растений, Приморский край, с. Камень-Рыболов

Рассмотрены результаты исследований по эффективности микробиологического препарата Бацикол на картофеле против 28-точечной картофельной коровки (*Henosepilachna vigintioctomaculata* Motsch.), являющейся одним из первостепенных вредителей этой культуры. Полевые испытания проводились в 2013, 2014 и 2016 годах в Уссурийском районе Приморского края на картофеле сорта Янтарь. В исследованиях использовали жидкий препарат Бацикол (на основе штамма *Bacillus thuringiensis* var. *darmsstadensis* (BtH₁₀) № 25) с титром спор 3.2–3.5×10⁹/мл. Посадки картофеля опрыскивали в период вегетации препаратом из расчета 20 л/га и 15 л/га при норме расхода рабочей жидкости 400 л/га. В качестве химического эталона использовали препарат Децис Экстра, КЭ. Биологическая эффективность Бацикола против картофельной коровки была достаточно высокой от 53.3 до 82.5%, но уступала химическому эталону. Обработка картофеля Бациколом позволила снизить численность картофельной коровки и увеличить урожай на 17.0–26.6%. В связи с высокими потерями урожая от вредителей и болезней и возрастающей потребностью в экологически чистой продукции это направление исследований является актуальным.

Ключевые слова: *Bacillus thuringiensis*, бацикол, *Henosepilachna vigintioctomaculata*, биологическая эффективность.

На Дальнем Востоке, где производится более 48% картофеля, выращиваемого в России, 28-точечная картофельная коровка (*Henosepilachna vigintioctomaculata* Motsch.) (= *Epilachna*) является одним из первостепенных вредителей этой культуры и не уступает по значимости колорадскому жуку [Коваленко, Мацшина, 2015].

Картофельная коровка распространена на юге Дальнего Востока (Приморский, Хабаровский край, Амурской

область, Южный Сахалин, остров Кунашир), а также на сопредельных территориях: в Китае, Японии, Корее, Вьетнаме [Кузнецов, 1997]. Большую роль в распространении картофельной коровки сыграли антропогенные факторы, которые в сочетании с высокой экологической пластичностью вида позволили ей повсеместно распространиться в зоне выращивания картофеля на юге Дальнего Востока. За счет высокой прожорливости и плодовитости она наносит

существенный вред. Вредят как жуки, так и личинки вредителя. Вредоносность *Henosepilachna vigintioctomaculata* проявляется по-разному, в зависимости от фазы развития растения, сортов и абиотических факторов.

Повреждения имеют вид «дорожек», идущих в различных направлениях от жилок, места повреждений приобретают сетчатый вид. В дальнейшем листья желтеют и засыхают, что приводит к снижению урожая. В отдельные годы повреждение листовой поверхности может достигать 20–100% [Волков и др., 2012].

Наибольшая вредоносность проявляется при повреждении в фазу бутонизации–цветения растений, когда закладывается урожай клубней. Сильно повреждается картофель ранних сроков посадки, слабее средних и в незначительной степени картофель летних посадок. Потеря 25% листового аппарата в фазах бутонизации и начала цветения приводит к снижению урожая картофеля от 2.4 до 5.7 т/га. Кроме того, вредитель является переносчиком вирусов – возбудителей опасных заболеваний [Волков, Казарека, 2010].

В связи с тем, что большую долю картофеля получают в фермерских и частных хозяйствах, где крайне нежелательно применение химических средств, использование безопасных микробиологических препаратов является актуальным.

В борьбе с вредителями и болезнями существенная роль отводится микробиологическому методу, основанному на использовании микроорганизмов и продуктов их жизнедеятельности. Среди современного ассортимента микробных биопрепаратов доминирующая роль принадлежит биопрепаратам на основе *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner. Бактерии Bt способны длительное время сохранять жизнеспособность после обработки растений. Они обладают высокой селективностью, эффективны в отношении целевых объектов, безопасны для человека, теплокровных животных и полезных организмов. Антифидантное, тератогенное и дерепродуктивное свойства обеспечивают их высокую биологическую эффективность. Биопрепараты, созданные на основе Bt, технологичны при производстве и применении.

Методика

В исследованиях использовали инсектицидный биопрепарат Бацикол (ВНИИСХМ) в жидкой форме (титр спор $3.2-3.5 \times 10^9$ /мл).

Полевые испытания проводились в 2013, 2014 и 2016 годах в Уссурийском районе Приморского края в соответствии с методическими указаниями по регистрационным испытаниям инсектицидов [Методические указания ..., 2004].

Опыты проводились в 3-х кратной повторности на районированном сорте картофеля Янтарь. Картофель высаживали в конце первой декады мая по схеме 90×30 см на делянках площадью

16.2 м². Агротехника выращивания – общепринятая для края. Уборку урожая проводили вручную в конце августа.

Посадки картофеля опрыскивали ручным опрыскивателем из расчета 20 л/га при норме расхода рабочей жидкости 400 л/га.

Учеты проводили на учетных растениях перед обработкой и на 5, 10, 15 сутки.

Биологическую эффективность препарата определяли по величине снижения численности вредителя с поправкой на контроль по формуле Аббота [Abbott, 1925].

Статистическая обработка данных проводилась по Васильеву [Шапиро и др., 1989].

Результаты

Учеты, проведенные перед обработкой, показали, что заселенность растений картофеля картофельной коровкой в 2013 г. составила 70%, с преобладанием личинок первого и второго возрастов. Было отмечено от 1 до 3 яйцекладок на одно растение, со средней численностью 14.5 яиц. На 5-е сутки после обработки численность картофельной коровки снизилась в 2.3 раза и биологическая эффектив-

В ФГБНУ ВНИИСХМ разработан энтомопатогенный биопрепарат Бацикол, предназначенный для борьбы с массовыми вредителями важнейших сельскохозяйственных культур, который обладает специфическим действием на жесткокрылых [Кандыбин и др., 1994]. Препарат, созданный на основе штамма *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis* (BtH₁₀) № 25 имеет широкий спектр действия на вредителей-фитофагов и применяется путем обработки вегетирующих растений [Гришечкина, Ермолова, 2015]. Он проявил эффективность в отношении ряда опасных массовых вредителей: колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say.), крестоцветных блошек (комплекса видов из рода *Phyllotreta*), восточного горчичного листоеда (*Colaphellus hofii* Men.), хлебной полосатой блошки (*P. vittula* Redt.), рапсового цветоеда (*Meligethes aeneus* F.), капустного листоеда (*Phaedon cochleariae* F.), ильмового листоеда (*Xanthogaleruca luteola* Midler), злаковой пьявицы (*Oulema melanopus* L.), крестоцветных клопов (*Eurydema*), щитовки (*Diashididae*), землянично-малинного долгоносика (*Anthonomus rubi* Hbst.), гречишного долгоносика (*Rhinoncus sibiricus* Faust.), морковной листоблошки (*Triozia apicalis* Frst.), малинного клеща (*Eriophyes gracillis* Nal.), трипсов (*Thysanoptera*) [Гришечкина, 2015].

В борьбе с картофельной коровкой обычно применяют многократные химические обработки растений картофеля, что приводит к загрязнению агроценозов, окружающей среды и снижению эффективности проводимых мероприятий. Экологически безопасные мероприятия основаны на применении микробиологических препаратов. Так, при применении Битоксибациллина против картофельной коровки биологическая эффективность составляла 78–85% [Яркулов, Кузнецов, 1989]. Установлено [Коваленко, 2006], что высокую эффективность – 66.8–88.0% проявил также Фитоверм. Препараты Колорадо и Бикол показали эффективность от 27.1 до 55.0% [Яркулов, Кузнецов, 1989].

Целью наших исследований было испытание эффективности жидкого Бацикола против картофельной коровки на Дальнем Востоке.

ность биопрепарата составила 58.3%. Пик яйцекладки в год исследования приходился на конец июня–начало июля. Поскольку Бацикол не оказывает овицидного действия, было отмечено увеличение численности вредителя, связанное с отрождением личинок. В связи с этим возникла необходимость проведения второй обработки биопрепаратом на 10-е сутки. Через неделю после повторного

Таблица 1. Эффективность биопрепарата Бацикол в борьбе с картофельной коровкой *Henosepilachna vigintioctomaculata* на картофеле (сорт Янтарь)

Вариант опыта, норма применения	Средняя численность вредителя, экз.				Биологическая эффективность (%) через...сут.		
	до обработки	после обработки через...сут.			5	10	15
		5	10	15			
2013 г.							
Бацикол, Ж 20 л/га	8.8	3.8	5.9	1.1	58.3	53.3	73.9
Децис Экстра, КЭ 0.03 л/га	8.5	0.2	0.3	0.05	97.7	97.5	99.5
Контроль (без обработки)	8.0	8.3	11.5	10.1			
НСР ₍₀₅₎		0.9	1.6	2.0			
2014 г.							
Бацикол, Ж 20 л/га	6.1	3.6	4.2	2.7	57.2	63.3	60.6
Децис Экстра, КЭ 0.03 л/га	8.6	0.7	0.03	0	92.1	99.8	100.0
Контроль (без обработки)	9.7	13.4	18.2	10.9			
НСР ₍₀₅₎		2.8	11.2	6.5			

опрыскивания численность личинок картофельной коровки снизилась в 5.3 раза (так как на растениях присутствовали личинки I-II возрастов) и биологическая эффективность при этом составила 73.9% (табл. 1).

В 2014 г. на момент обработки на растениях присутствовали личинки первого – третьего возрастов. После обработки численность вредителя постепенно уменьшалась. Наиболее высокую биологическую эффективность отмечали на 10-е сутки после опрыскивания. В дальнейшем эффективность препарата снижалась и на 15-е сутки составила 60.6%, но численность вредителя не достигала порогового значения, что не вызвало необходимости повторной обработки. На контрольных делянках численность личинок *H. vigintioctomaculata* нарастала и на 10 сутки учета составила в годы исследований от 11.5 до 18.2 личинок/растение, со степенью повреждения растений 4–5 баллов.

В 2016 году испытывали эффективность жидкого Бацикола при сниженных нормах применения – 15 л/га. Для сравнения был взят жидкий биопрепарат Битоксибациллин (БТБ). Результаты испытаний приводятся в таблице 2.

Проведенные исследования показали, что даже при снижении нормы применения препарата эффективность остается на высоком уровне. Обработка растений картофеля Бациколом положительно отразилась на урожайности культуры. Прибавка урожая составила от 2.6 до 5.5 т/га (таблица 3).

Таблица 2. Биологическая эффективность биопрепаратов в борьбе с картофельной коровкой *Henosepilachna vigintioctomaculata* на картофеле, 2016 г.

Вариант опыта, норма расхода	Средняя численность вредителя, экз.				Биологическая эффективность (%) через...сут.		
	До обработки	после обработки по дням учета			5	10	15
		5	10	15			
Бацикол, Ж 15 л/га	16.9	6.3	5.0	3.2	82.5± 14.1	71.7± 5.4	74.3± 4.1
Битоксибациллин, Ж 15 л/га	19.2	11.8	7.6	5.4	56.5± 11.8	62.3± 9.1	67.1± 10.6
Децис Экстра, КЭ 0.03 л/га	15.6	0.4	0	0	98.7± 2.2	100.0	100.0
Контроль (без обработки)	13.0	19.0	14.3	11.4			
НСР ₍₀₅₎		2.8	4.6	4.2			

Таблица 3. Влияние обработок картофеля биопрепаратами на урожайность (сорт Янтарь, Приморский край)

Вариант	Средний урожай			Прибавка урожая					
	2013 г.	2014 г.	2016 г.	2013 г.		2014 г.		2016 г.	
				т/га	%	т/га	%	т/га	%
Бацикол, Ж	15.2	15.6	37.5	3.2	26.6	2.6	20.0	5.5	17.0
Битоксибациллин, Ж			35.2					3.2	10.0
Децис Экстра, КЭ	15.7	20.8	38.6	3.7	30.8	7.8	60.0	6.6	20.6
Контроль	12.0	13.0	32.0						

Заключение

Полевыми испытаниями, проведенными в условиях Приморского края, было установлено, что биологическая эффективность биопрепаратов Бацикол и Битоксибациллин против картофельной коровки составляла для Бацикола 53.3–82.5%, Битоксибациллина 56.5–67.1%, но уступала химическому эталону (Децис Экстра КЭ). Обработка картофеля Бациколом позволила снизить численность картофельной коровки и увеличить урожай на 17.0–26.6%.

Полученные данные позволяют расширить сферу применения препарата, что особенно важно в связи с возрастающей потребностью в экологически чистой продукции.

В связи с тем, что большую долю картофеля получают в фермерских и частных хозяйствах, где крайне нежелательно применение химических средств, использование экологически малоопасных микробиологических препаратов является актуальным.

Библиографический список (References)

- Волков Ю.Г., Какарека Н.М. Уничтожайте насекомых-переносчиков вириоидов веретеновидности клубней картофеля. // Картофель и овощи. 2010. N 7. С. 28–29.
- Волков О.Г., Смирнов Ю.В., Коваленко Т.К. Картофельная коровка: ее вредоносность и биологический контроль. Карантин растений. Наука и практика. 2012. N 2. С. 54–56.
- Гришечкина С.Д., Ермолова В.П. Эффективность бацикола на основе нового штамма *Bacillus thuringiensis* var. *darmsadiensis* № 25 против вредителей фитофагов и фитопатогенов. Сельскохозяйственная биология. 2015, 50 (3): 361–368. doi:10.15389/agrobiology.2015.3.361rus
- Гришечкина С.Д. Механизмы действия бацикола микробиологического препарата с фитозащитным действием и спектр его активности. // Сельскохозяйственная биология. 2015, 50 (5): 685–693. doi:10.15389/agrobiology.2015.5.685rus
- Кандыбин Н.В., Смирнов О.В., Барбашова Н.М. Новый энтомоцидный препарат со специфическим действием на жесткокрылых. // Мат. Всерос. науч.-произв. совещания (Краснодар, 1994). Пушино, 1994. ч. 2: С. 179–181.
- Коваленко Т.К. Биология картофельной коровки *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera) и ее паразита *Nothoserphus affissae* (Hymenoptera) в Приморском крае: Автореф. канд. дис. Владивосток, 2006. 19 с.
- Коваленко Т.К., Машина Н.В. Колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata* и картофельная коровка *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera): особенности биологии и вредоносность. // Чтения памяти А.И. Куренцова. Владивосток, 2015, вып. XXVI. С. 128–136.
- Кузнецов В.Н. Кокцинеллиды (Coleoptera, Coccinellidae) Дальнего Востока России: Автореф. ... докт. дис. Владивосток, 1997. 48 с.
- Методические указания по регистрационным испытаниям инсектицидов, акарицидов, моллюскоцидов и родентицидов в сельском хозяйстве». СПб., 2004.
- Шапиро И.Д., Вилкова Н.А., Нефедова Л.И., Ивашенко Л.С., Васильев С.В. Практикум по иммунитету растений к вредителям. Л., 1989. С. 139–180.
- Яркулов Ф.Я., Кузнецов В.Н. Биологический метод защиты растений в Приморском крае. // Защита растений на Дальнем Востоке. Владивосток ДВО АН СССР, 1989. С. 56–61.
- Abbott W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. // J. Econ. Entomol. 1925, N18. С. 265–267.

Translation of Russian References

- Grishechkina S.D. Mechanisms of action of microbiological preparation Batsikol with phytoprotective action and spectrum of its activity. Selskhozaystvennaya biologiya. 2015, V. 50(5). P. 685–693. Doi: 10.15389/agrobiology.2015.5.685rus.
- Grishechkina S.D., Yermolov V.P. Efficacy of Batsikol based on *Bacillus thuringiensis* var. *darmsadiensis* new strain N 25 against phytophagous pests and plant pathogens. Selskhozaystvennaya biologiya. 2015. V. 50(3). P. 361–368. Doi: 10.15389/agrobiology.2015.3.361rus.
- Kandybin N.V., Smirnov O.V., Barbashova N.M. New insecticidal preparation with specific effect on Coleoptera. In: Mat. Vseros. nauch.-proizv. soveshchaniya (Krasnodar, 1994). Pushchino. V. 2. P. 179–181.
- Kovalenko T.K. Biology of potato ladybugs *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera) and its parasite *Nothoserphus affissae* (Hymenoptera) in the Primorskii Territory. PhD Thesis. Vladivostok. 2006. 19 p.
- Kovalenko T.K., Matsishina N.V. Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* and potato ladybird *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera): peculiarities of biology and harmfulness. In: Chteniya pamyati A.I. Kurentsova. Vladivostok, 2015, V. 26. P. 128–136.
- Kuznetsov V.N. Coccinellidae (Coleoptera) of Far East of Russia. DSc Thesis. Vladivostok, 1997. 48 p.
- Methodical guide on registration tests of insecticides, acaricides, molluscicides and rodenticides in agriculture. St. Petersburg. 2004. 321 p.
- Shapiro I.D., Vilкова N.A., Nefedova L.I., Ivashchenko L.S., Vasiliev S.V. Workshop on immunity of plants to pests. Leningrad, 1989. P. 139–180.
- Volkov O.G., Smirnov Y.V., Kovalenko T.K. Potato Ladybird: its harmfulness and biological control. Karantin rastenii. Nauka i praktika. 2012. N 2. P. 54–56.
- Volkov Y.G., Kakareka N.M. Destroy insect vectors of potato spindle tuber viroid. Kartoffel i ovoshchi. 2010. N 7. P. 28–29.
- Yarkulov F.Y., Kuznetsov V.N. Biological method of plant protection in Primorskii Territory. In: Zashchita rastenii na Dal'nem Vostoke. Vladivostok: DVO AN SSSR, 1989. P. 56–61.

Plant Protection News, 2017, 1(91), p. 48-51

EFFICACY OF MICROBIOLOGICAL PREPARATION BATSIKOL AGAINST *HENOSEPILOCHNA VIGINTIOCTOMACULATA* (COLEOPTERA, COCCINELLIDAE) IN THE FAR EAST OF RUSSIA

S.D. Grishechkina¹, T.K. Kovalenko²

¹Institute of Agricultural Microbiology, St. Petersburg, Russia,

²Far-Eastern Institute of Plant Protection, Primorskii Krai, Kamen-Rybolov, Russia

The results of research on the effectiveness of the microbial product Batsikol on the potatoes against the 28-spotted Potato Ladybird (*Henosepilachna vigintioctomaculata* Motsch.) are provided, one of the primary pests of this crop. Field trials were conducted in 2013, 2014 and 2016 in the Ussuri district of Primorskii Territory on the potato variety Amber. The tests used the liquid preparation Batsikol (on the basis of the strain *Bacillus thuringiensis* var. *darmsadiensis* (BtH10) No. 25) with a spore titre 3.2–3.5x10⁹/ml. Potato plants were sprayed during the vegetation season by the preparation at 20 l/ha and 15 l/ha at the norm of working fluid flow 400 l/ha. Preparation Decis Extra, KE was used as a chemical standard. Biological efficacy of Batsikol against potato ladybugs was high, from 53.3 to 82.5 %, but lower than the chemical standard. Processing potatoes with Batsikol is possible to reduce the number of ladybugs on potato and to increase the yield by 17.0–26.6 percent. In connection with high crop losses due to pests and diseases and increasing demand for environmentally friendly products, this area of research is important.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Batsikol; *Henosepilachna vigintioctomaculata*; biological efficiency.

Сведения об авторах

ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии, шоссе Подбельского 3, 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, РФ
*Гришечкина Светлана Денисовна. Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: svetagrishechkina@mail.ru
ФГБНУ Дальневосточный НИИ защиты растений, ул. Мира 42-а, Приморский край, с. Камень-Рыболов, РФ
Коваленко Татьяна Куприяновна. Зав. отделом биометода, кандидат биологических наук

Information about the authors

Institute of Agricultural Microbiology, Podbelskogo 3, 196608, St. Petersburg-Pushkin, Russian Federation
*Grishechkina Svetlana Denisovna. Leading Researcher, PhD in Biology, e-mail: svetagrishechkina@mail.ru
Far-Eastern Institute of Plant Protection, Mira 42-a, Primorskii Krai, Kamen-Rybolov, Russian Federation
Kovalenko Tatyana Kuprianovna. Head of Laboratory of Biometod, PhD in Biology

УДК 632.3:635.34

АРЕАЛ И ЗОНА ВРЕДНОСНОСТИ СОСУДИСТОГО БАКТЕРИОЗА КАПУСТЫ**А.М. Лазарев¹, Е.Н. Мысник¹, А.Н. Игнатов²**¹Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург;
²ИЦ «ФитоИнженерия» ООО, с. Рогачево, Московская область,
Российский Университет дружбы народов, Москва

Приведены сведения по симптоматике сосудистого бактериоза капусты и биологическим признакам его возбудителя. Описаны ареал и зона вредоносности этого заболевания на территории бывшего Советского Союза. Даны меры борьбы с сосудистым бактериозом капусты.

Ключевые слова: сосудистый бактериоз капусты, симптоматика, ареал, вредоносность, меры борьбы.

Сосудистый бактериоз капусты (возб. – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel 1895) Dowson 1939) – широко распространенное и вредоносное заболевание капустных культур, наносящее ущерб во время вегетации растений и резко (до 10 раз) усиливающее развитие бактериальной мокрой гнили в период хранения [Игнатов, 1992; Ахатов, 2002; Лазарев, 2006, 2008; Афонин и др., 2008; Гвоздяк и др., 2011].

Основной источник инфекции – зараженные семена. В почве патоген сохраняется только в неперегнивших остатках пораженных растений. Может переноситься листогрызущими насекомыми, поливной водой, инструментами. При выращивании в грунте, рассада поражается сравнительно редко, поэтому в парниках встречаются единичные больные растения. Также развитие болезни незначительно при прямом посеве в поле (безрассадная технология). Но при использовании кассетной технологии при выращивании рассады в защищенном грунте с дождеванием единичное зараженное растение в кассете может в течение 3 недель привести к инфицированию до 60% рассады. При семенной инфекции, первыми заражаются семядоли.

В открытом грунте начало массового проявления сосудистого бактериоза обычно отмечают по истечении 15–20 дней после высадки молодых зараженных растений. При температуре ниже 20 °С, развитие симптомов задерживается. При заражении настоящих листьев, патоген проникает в сосуды растения через гидатоды во время гуттации. На одном листе может быть одно или несколько таких пятен, со временем зона поражения увеличивается в размерах, доходит до центральной жилки. При поражении одной стороны лист обычно искривляется в эту сторону, приобретая уродливую форму. У больных растений зона поражения от места первичной инфекции распространяется от края листовой пластинки под острым углом, направленным своей вершиной в сторону центра листовой пластинки и проявляется в виде пожелтения, принимая характерные для этого бактериоза V-образные очертания. Пораженные участки подсыхают, буреют и приобретают вид пергаментных. Замечено, что в первую очередь поражаются нижние листья, затем – по ходу сосудистой системы растения – верхние. Больные листья постепенно увядают и отваливаются.

При сильном поражении у кочана капусты остается лишь нескольких листьев на верхней части кочерыжки. Поперечный или продольный разрез через черешок или центральную жилку листа, либо кочерыжки позволяет обнаружить черные пораженные сосуды ксилемы. У больных растений рост в значительной степени замедляется:

в этом случае наблюдают гибель растений или недоразвитость кочанов, характеризующихся низким качеством. В хранилище больные кочаны в первую очередь поражаются пектолитическими фитопатогенными бактериями (*Pectobacterium carotovorum*) и сапрофитной микрофлорой (*Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Leliottia* spp.). При благоприятных условиях бактерии быстро распространяются по сосудам, проникают в кочерыжку и кочан. В результате процесса мацерации тканей в черешках и кочерыжках капусты возникают продольные полости. Оптимальными условиями для развития сосудистого бактериоза считают температуру 20–24 °С и влажность воздуха 80–100% – условия типичные для жаркого лета с обильными дождями [Игнатов, 1992; Ахатов и др., 2002].

Патоген поражает как культурные капустные (все виды капусты, редис, рапс, горчицу), так и многие сорные крестоцветные растения (например *Lepidium virginicum*, *R. raphanistrum*, *Sinapis nigra*, *Coronopus didymus*, *Barbarea vulgaris*, *Capsella bursa-pastoris*).

Сосудистый бактериоз капусты обнаружен практически во всех странах и на всех континентах, где выращивают эту культуру [CABI Datasheet. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (black rot)]. Наибольшую опасность представляет его широкое распространение в регионах массового выращивания семян овощных культур международными селекционными компаниями (Италия, Латинская Америка, Новая Зеландия, Китай, Южная Африка).

Меры борьбы включают соблюдение комплекса агротехнических и защитных приемов [Игнатов, 1992; Джалилов, 1996; Асякин, Лазарев, 2002; Ахатов и др., 2002; Лазарев, Рогачев, 2004; Гвоздяк и др., 2011]. Диагностика заражения семян основана на применении традиционных микробиологических методов (высев экстракта из семян на питательные среды и анализ выросших бактерий), ПЦР или серологической диагностики (ИФА). Во многих странах действует так называемый «нулевой уровень толерантности» по отношению к заражению возбудителем этого заболевания. Порог чувствительности при этом чрезвычайно высок – ни одного зараженного семени на 10 тыс. семян, при этом анализу подвергают пробу в 40 тыс. семян – 4 повторения по 10 тыс.

Известно много методов оздоровления семян, но большинство из них приводят к снижению всхожести и энергии прорастания. Физические методы включают гидротермическую обработку (горячей водой) при 50 °С в течение 20–30 минут, которая используется уже более 100 лет. Подсушивание семян при 40 °С в течение 24 ч и обработка жаром при 75 °С в течение 5–7 часов были доста-

точными для обеззараживания семян капусты без потери всхожести. Проблема термической обработки заключается в сложности точного соблюдения температурных параметров для крупных партий семян. Среди химических препаратов, применяют кислый ацетат меди или кислый сульфат цинка (рН 2,8), обработка которыми в течение 20 мин при 38–40 °С дает высокую техническую эффективность. Обработка 0,5% гипохлоридом натрия или перекисью водорода течение 30 мин также обеспечивала обеззараживание семян. Однако, ни один из приемов химической обработки семян против сосудистого бактериоза не разрешен на территории РФ.

Селекцию устойчивых сортов считают наиболее эффективным способом снижения экономического ущерба от болезни. Во многих регионах мира с субтропическим климатом используют только сорта, устойчивые к сосудистому бактериозу. Известны 9 рас патогена, из них расы 1, 3 и 4 были наиболее распространены в России до 2012 г.; и против каждой – нужен свой ген устойчивости. Изменение доминирующей расы возбудителя этого заболевания на территории РФ наблюдали ориентировочно в 2012 году, при этом возросла доля более вирулентных для белокачанной капусты и рапса рас 5 и 6 [На, Vo Thi Ngoc et al., 2014, 2015].

Для защиты капусты против сосудистого бактериоза рекомендованы Бактофит (СП), Витаплан (СП), Споробактерин (СП), Гамаир (ТАБ), Триходерма Вериде 471 (СП), Альбит (ТПС) и Ризоплан (Ж). Алирин-Б (Ж) и Фитоспорин-М (П) предложены для снижения распространения слизистого бактериоза капусты, который следует в поле за сосудистым бактериозом (Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов..., 2016). Основной акцент

защиты от сосудистого бактериоза делается на профилактику заболевания и снижение скорости распространения патогена с пораженных растений на здоровые.

Многочисленные исследования свидетельствуют о высокой распространенности указанного заболевания капусты на всей территории стран СНГ, где выращивают эту культуру – в Российской Федерации [Сальникова, 1957; Попов, 1959; Джалилов, 1996; Куниченко, 1985; Лазарев, Рогачев, 2004; На, Vo Thi Ngoc et al., 2014, 2015], в Азербайджане, Беларуси, Грузии, Казахстане, Молдове и на Украине [Ишпайкина, 1954; Попов, 1959; Халилова, 1969; Натиевская, 1973; Гиоргобиани и др., 1976; Сухорукова, 1985; Пуйпене, Григальюнайте, 1988; Марченко, 2005; Гвоздык и др., 2011; Попов и др., 2011]. Зона высокой вредоносности в РФ включает Центральный, Черноземный, Западно-Сибирский регионы, Краснодарский край, Поволжье, Приморский край [Игнатов, Лазарев, 2013]. В Центральной зоне Российской Федерации (Московская область) поражение растений достигает в эпифитотийные годы 90–100% (при развитии болезни 40–47%). В Черноземной зоне (Воронежская область) отмечают 15–53% больных растений у сортов раннего созревания и 6–8% – у сортов среднего и позднего созревания. В Западной Сибири (Алтайский край, Омская область и др.) поражение растений нередко превышает 10–25%, в зависимости от выращиваемых сортов. В Беларуси в отдельные годы отмечают 50–80% больных растений. В Казахстане количество больных растений в середине лета составляет 17–24%, а к концу вегетации – 27–48%. На Украине в отдельные годы распространенность сосудистого бактериоза составляет 10–25% и более.

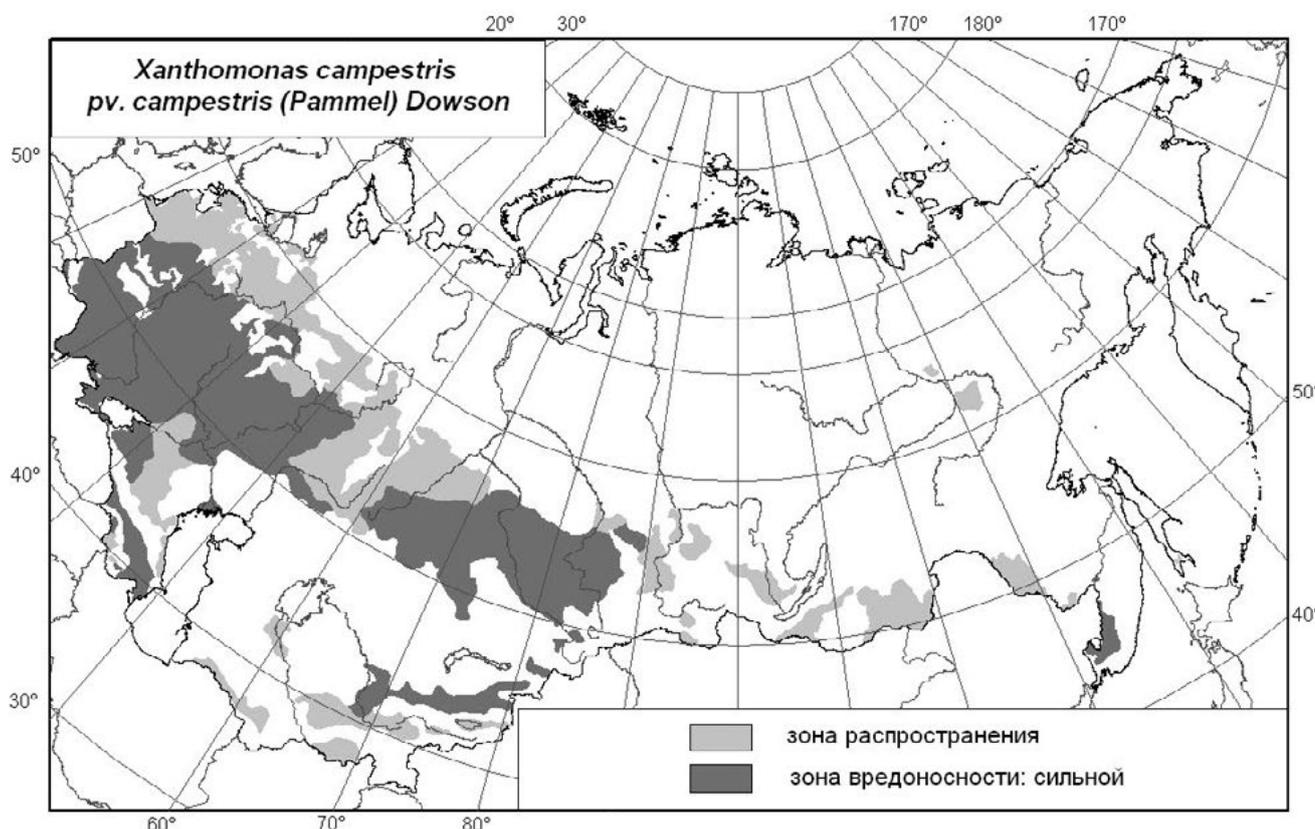


Рисунок 1. Векторная карта ареала и зоны вредоносности сосудистого бактериоза капусты – *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson.

Уточнение конфигурации границ ареала и зоны вредоносности болезни выполнено по карте распространения капусты, предложенной Н.В.Терехиной (2004) (цит. по А.Н.Афонин и др., 2008). При составлении ареала сосудистого бактериоза капусты на территории Российской Федерации и сопредельных государств за основу была взята карта распространения капусты, предложенная Н.В.Терехиной Н.В. (2004), а также использованы опубликованные в открытой печати литературные источники. Карта

Основная часть работы выполнена в рамках проекта МНТЦ N 2625.

Библиографический список (References)

- Асякин Б.П. Защита белокочанной капусты от бактериозов / Б.П.Асякин, А.М.Лазарев // Информационный листок. СПб, 2002. 2 с.
- Афонин А.Н. Агрэкологический атлас России и сопредельных государств: экономически значимые растения, их вредители, болезни и сорные растения (Интернет-версия 2.0) / А.Н.Афонин, С.Л.Грин, Н.И.Дзюбенко, А.Н.Фролов и др. // <http://www.agroatlas.ru> 2008.
- Ахатов А.К. Защита овощных культур в закрытом грунте (справочник) / А.К.Ахатов, Ф.С.Джалилов, О.О.Белошাপкина, Ю.М.Стройков, В.Н.Чижов // М.: 2002. 464 с.
- Ха Во Тхи Нгок. Распространение нового генотипа *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* в России в 2012 г. / Во Тхи Нгок Ха, Ф.С.Джалилов, Е.С.Мазурин, Е.И.Кырова, С.В.Виноградова, Н.В.Шаад, Д.Ластер, А.Н.Игнатов // Защита картофеля. 2014. N 2. С. 28–30.
- Гвоздяк Р.І. Фітопатогенні бактерії. Бактеріальні хвороби рослин. Монографія (ред. В.П.Патыки) / Р.І.Гвоздяк, Л.А.Пасичник, Л.М.Яковлева, С.М.Мороз, О.О.Литвинчук, Н.В.Житкевич, С.Ф.Ходос, Л.М.Буценко, Л.А.Данкевич, І.В.Гриник, В.П.Патика // Киев: ТОВ «НВП «Інтерсервіс», 2011. 444 с.
- Гиоргобиани Н.Ш. Бактериальные болезни белокочанной капусты в Грузии // Тез. докл. III Всес. конф. по бактериальным болезням растений. Тбилиси: Мецниереба, 1976. С. 123–125.
- Государственный каталог пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. М.: Минсельхоз России, 2016. 952 с.
- Джалилов Ф.С. Бактериальные болезни капусты (диагностика, патогенез, иммунитет, защитные мероприятия) / Автореф. докт. дисс. // М.: ТСХА, 1996. 32 с.
- Игнатов А.Н. Распространение возбудителей опасных бактериозов растений в Российской Федерации: реальность опережает прогноз / А.Н.Игнатов, А.М.Лазарев // В сб.: Фитосанитарная оптимизация агроэкосистем. Материалы III Всероссийского съезда по защите растений (16–20 декабря 2013 г.), т. 1. СПб-Пушкин, 2013. С. 240–242.
- Игнатов А. Н. Селекционное и генетическое изучение устойчивости белокочанной капусты к сосудистому бактериозу: Автореф. кан. дис. М.: 1992. 25 с.
- Ишпайкина Е.И. Болезни капусты в Алма-Атинской области и борьба с ними. Автореф. ... кан. дис. // Алма-Ата, 1954. 11 с.
- Куниченко Н.А. Бактериозы овощных культур в Молдавии / Материалы конференции. Фитонциды. Бактериальные болезни растений // Киев: Наукова думка, 1985, т. 2. С. 67–68.
- Лазарев А.М. Бактериальные болезни капусты и меры борьбы с ними / А.М.Лазарев, Ю.Б.Рогачев // Методические рекомендации. СПб.: ВИЗР, 2004. 56 с.
- Лазарев А.М. Сосудистый бактериоз – вредоноснейшая болезнь капусты // Картофель и овощи, 2006. N 5. С. 28–29.
- Марченко А.Б. Бактеріози капусти ранньої та їх першоджерела в умовах правобережного лісостепу України / Сб. статей учасників Междунар. научн. конф. Фітопатогенні бактерії. Фітонцидологія. Аллелопатія //Киев: Державний агроекологічний ун-т, 2005. С. 43–47.
- Нитиевская В.И. Основные болезни капусты и биологический способ борьбы с ними в условиях БССР: Автореф. канд. дис. Минск. БелНИИКПО. 1973. 24 с.
- Попов Ф.А. К вопросу о бактериозах капусты белокочанной в условиях Беларуси. / Ф.А.Попов, В.Е.Мямин, И.А.Прищепа, А.М.Лазарев // Материалы международной науч.-практ. конф. «Интегрированная защита растений: стратегия и тактика», посвященной 40-летию со дня организации РУП Института защиты растений (Минск 5–8 июля, 2011 г.). Минск, 2011. С. 745–750.
- Попов В.И. Сосудистый бактериоз и устойчивость к нему сортов белокочанной капусты в условиях Воронежской области: Автореф. канд. дисс. Л.: ВИЗР, 1959. 24 с.
- Пуйпене И. Грибные и бактериальные болезни капусты в открытом грунте / И.Пуйпене, Б.Григалоняйте // Защита плодово-овощных культур от болезней, вредителей и сорняков при интенсивной технологии возделывания (ред. А.Григалюне). Вильнюс: Гос. агропромкомитет Литовской ССР, 1988. С. 47–48.
- Сальникова А.Ф. Болезни капусты и меры борьбы с ними в условиях Дальнего Востока (ред. Л.Н.Васильева). Хабаровск: Хабаровское книжное изд-во, 1957. 94 с.
- Сухорукова Н.С. Сосудистый бактериоз белокочанной капусты в Западной Сибири / Фитонциды. Бактериальные болезни растений // Киев: Наукова думка, 1985, т. 2. С. 72.
- Халилова З.Г. Слизистый бактериоз капусты в условиях Азербайджанской ССР и меры борьбы с ним / Материалы сессии Закавказского Совета по координации научн.-иссл. работ по защите растений (ред. Г.Х.Азарян и др.) // Баку: Элм, 1969. Т. 4. С. 99–100.
- CABI Datasheet. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (black rot) <http://www.cabi.org/isc/datasheet/56919>.
- Ha, Vo Thi Ngoc, Dzhililov F.S.U., Ignatov A.N. Biological properties of bacteriophages specific to blackrot pathogen of brassicas *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Известия ТСХА, 2015. Т. 6. С. 28–36.

Translation of Russian References

- Afonin A.N., Grin S.L., Dzyubenko N.I., Frolov A.N. et al. Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries: Economic Plants and their Diseases, Pests and Weeds (Internet version 2.0). <http://www.agroatlas.ru> 2008. (In Russian).
- Akhatov A.K., Dzhililov F.S., Beloshapkina O.O., Stroikov Yu.M., Chizhov V.N. Protection of vegetable crops in greenhouses (reference). Moscow, 2002. 464 p. (In Russian).
- Asyakin B.P., Lazarev A.M. Protection of cabbage from bacterial diseases. Informatsionnyi listok. St. Petersburg, 2002. 2 p. (In Russian).
- Dzhililov F.S. Bacterial diseases of cabbage (diagnosis, pathogenesis, immunity, protective measures). DSc Thesis. Moscow: TSKHA, 1996. 32 p. (In Russian).
- Giorgobiani N.S., Tsilosani G.A., Palavandishvili I.V., Chubinishvili L.N., Eliashvili P.K. Bacterial diseases of cabbage in Georgia. In: Tez. dokl. III Konf. Po bacterial'nyum boleznyam rastenii. Tbilisi, Metsnieriaba, 1976. P. 123–125. (In Russian).
- Gvozdyak R.I., Pasichnik L.A., Yakovleva L.M., Moroz S.M., Litvinchuk O.O., Zhitkevich N.V., Khodos S.F., Butsenko L.M., Dankevich L.A., Grinik I.V., Patika V.P. Phytopathogenic bacteria. Bacterial diseases of plants. Monograph. Kiev: TOV «NVP» Interservis, 2011. 444 p. (In Ukrainian).
- Ha Vo Thi Ngoc, Dzhililov F.S., Mazurin E.S., Kyrova E.I., Vinogradova S.V., Schaad N.In., Laster D., Ignatov A.N. 2014. Spreading of a new genotype of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Russia in 2012. Potato Protection. Vol. 2. P. 28–30. (In Russian).
- Ignatov A.N. Breeding and genetic study of resistance of cabbage to vascular bacteriosis. DSc Thesis. Moscow, 1992. 25 p. (In Russian).
- Ignatov A.N., Lazarev A.M. Distribution of dangerous pathogens of bacterial diseases of plants in the Russian Federation: the reality is ahead of forecast. In: Fyosanitarnaya optimizatsiya agroekosistem. Materialy III Vserossiiskogo s'ezda po zashchite rastenii (16–20 Dec., 2013), St. Petersburg-Pushkin, 2013. Vol. 1. P. 240–242. (In Russian).
- Ishpaikina E.I. Diseases of cabbage in Alma-Ata region and their control. Ph.D Thesis. Alma-Ata, 1954. 11 p. (In Russian).
- Khalilova Z.G. Slime bacteriosis of cabbage in conditions of Azerbaijan SSR and measures of its control. In: Materialy sessii Zakavkazskogo Soveta po

- koordinatsii nauch-issled. rabot po zashchite rastenii (G.H. Azaryan et al., eds.). Baku, Elm, 1969. Vol. 4. P. 99–100. (In Russian).
- Kunichenko N.A. Bacterioses of vegetable crops in Moldova. In: Materialy konferentsii. Fitontsidy. Bakterial'nye bolezni racenii. Kiev: Naukova dumka, 1985. Vol. 2. P. 67–68. (In Russian).
- Lazarev A.M. Vascular bacteriosis – malicious disease of cabbage. Kartofel i ovoshchi, 2006. N 5. P. 28–29. (In Russian).
- Lazarev A.M., Rogachev Yu.B. Bacterial diseases of cabbage and their control. Methodical recommendations. St. Petersburg: VIZR, 2004. 56 p. (In Russian).
- Marchenko A.B. 2005. Bacterial disease of early cabbage and infection source in Forest-Steppe region on the Right-Bank Ukraine. In: Sb. statei uchastnikov Mezhdunarodn. nauch. konf. Fitopatogenne bakterii. Fitontsidologiya. Allelopatiya. Kiev: Derzhavnyi un-t. P. 43–47. (In Ukrainian).
- Nitievskaya V.I. 1973. The main diseases of cabbage and biological way of its control in Byelorussian SSR. PhD Thesis. Minsk: BelNIKPO. 24 p. (In Russian).
- Popov F.A., Myamin V.E., Prishchepa I.A., Lazarev A.M. The issue of bacterial diseases of cabbage in conditions of Belarus. In: Materialy Plant Protection News, 2017, 1(91), p. 52–55
- mezhdunarodnoi nauch.-prakt. konf. «Integrirovannaya zashchita rastenii: strategiya i taktika», posvyashchennoi 40-letiyu so dnya organizatsii RUP Institut Zashchity rastenii» (Minsk, 5–8 July, 2011). Minsk, 2011. P. 745–750. (In Russian).
- Popov V.I. Black rot and resistance of varieties of cabbage under conditions of Voronezh Region. PhD Thesis. Leningrad, VIZR, 1959. 24 p. (In Russian).
- Puipene I., Grigalyunaite B. Fungal and bacterial diseases of cabbage in field. In: Zashchita plodovo-ovoshchnyh kultur ot boleznei, vrediteli i sornyakov pri intensivnoi tehnologii vozdeleyvaniya. Vilnius: Gos. Agropromkomitet litovskoi SSR, 1988. P. 47–48.
- Salnikova A.F. Diseases of cabbage and their control in conditions of the Far East (ed. L.N.Vasilieva). Khabarovsk: Khabarovskoe knizhnoe izd-vo, 1957. 94 p. (In Russian).
- State catalog of pesticides and agrochemicals permitted for use in the Russian Federation. Moscow: Minselkhoz Rossii, 2016. 952 p. (In Russian).
- Sukhorukova N.S. Black rot of cabbage in Western Siberia. In: Fitontsidy. Bakterial'nye bolezni raztenii. Kiev: Naukova dumka, 1985. Vol. 2. P. 72. (In Russian).

AREA AND HARMFULNESS ZONES OF BLACK ROT OF CABBAGE

A.M. Lazarev¹, E.N. Mysnik¹, A.N. Ignatov²

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

²Research Center «PhytoEngineering», Rogachevo, Moscow Region, Russia,
Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Symptoms of Black Rot of cabbage and biological properties of the pathogen are described. The area of the highest harm caused by this disease on the territory of the Russian Federation and neighboring countries is discussed. Control measures against the Black Rot of cabbage are proposed.

Keywords: black rot of cabbage; symptom; range; harmfulness; control measure.

Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация
*Лазарев Александр Михайлович. Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: allazar54@mail.ru
Мысник Евгения Николаевна. Научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: vajra-sattva@yandex.ru
Центр «ФитоИнженерия», ул. Московская, 58, 143880 Рогачево, Московская область, Российская Федерация
Игнатов Александр Николаевич. Зам. ген. директора по научной работе, доктор биологических наук, e-mail: an.ignatov@gmail.com

* Ответственный за переписку

Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation
*Lazarev Alexander Mikhailovich. Senior Researcher, PhD in Biology, e-mail: allazar54@mail.ru
Mysnik Evgenia Nikolaevna. Researcher, PhD in Biology, e-mail: vajra-sattva@yandex.ru
Center “PhytoEngineering”, Moskovskaya Str. 58, 143880 Rogachevo, Moscow reg., Russian Federation
Ignatov Alexander Nikolaevich. Research Director, DSc in Biology, e-mail: an.ignatov@gmail.com

* Responsible for correspondence

УДК 595.782

ФЕРОМОНИТОРИНГ КУКУРУЗНОГО МОТЫЛЬКА *OSTRINIA NUBILALIS* HBN. (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ: ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ САМЦОВ И ГУСЕНИЦ НА ПОСЕВАХ КУКУРУЗЫ

А.Н. Фролов, И.В. Грушевая

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Полученные данные свидетельствуют о тесной связи между плотностью питающихся на растениях кукурузы гусениц кукурузного мотылька и числом пойманных в феромонные ловушки самцов родительского поколения. Делается вывод о целесообразности использования синтетических половых феромонов для целей мониторинга сезонной динамики численности кукурузного мотылька и возможности их применения в качестве средства сигнализации достижения насекомым ЭПВ на посевах кукурузы.

Ключевые слова: кукурузный мотылек, *Ostrinia nubilalis*, половые феромоны, ловушки, учёты численности.

Синтетические аналоги половых феромонов насекомых широко используются в практике защиты растений в

первую очередь для мониторинга вредных членистоногих [Рябчинская, Фролов, 2016]. Феромониторинг особенно

актуален для таких вредителей как стеблевой кукурузный мотылек, вредная деятельность которых протекает скрытно от наблюдателя. Феромонные ловушки широко применяются во многих странах мира для мониторинга численности насекомого и сигнализации начала лёта [Durant et al., 1986; Kalinova et al., 1994; Bartels et al., 1997; Keszthelyi, Lengyel, 2003; Войняк, Ковалев, 2010, Bereš, 2014], а накопленный на протяжении десятилетий архив данных [Sorenson et al., 2005] имеет важное практическое значение, поскольку на основе корреляционных зависимостей числа пойманных в ловушки имаго и плотностей отложенных яиц и питающихся гусениц на растениях, а также поврежденности растений, могут разрабатываться региональные системы принятия решений о проведении защитных мероприятий [Maini, Burgio, 1999; Keszthelyi, Lengyel, 2003; Войняк, Ковалев, 2010]. В то же время, связь между численностью взрослых самцов текущего и гусениц следующего поколения прослеживается далеко не

всегда [Stockel et al., 1984; Maini, Burgio, 1999 и др.], при этом привлекательность феромонных композиций существенно варьирует в разных регионах, вплоть до полного или почти полного отсутствия аттрактивности [Грушевая и др., 2015].

Цель настоящей работы — статистически оценить зависимость между числом отловленных в феромонные ловушки самцов кукурузного мотылька текущего поколения и плотностью питающихся на растениях гусениц следующего поколения. В случае, если связь окажется достаточно тесной, феромонные ловушки могут быть применены не только для сигнализации начала лёта имаго вредителя, но и в качестве средства, помогающего принимать решения о целесообразности проведения защитных мероприятий против вредителя в зависимости от ожидаемой плотности гусениц на посевах кукурузы и, соответственно, предполагаемых потерях урожая.

Материал и методы исследований

Исследования проводили в 2014–2016 гг. на посевах кукурузы Кубанской опытной станции ВИР и НПО «КОС-МАИС» (пос. Ботаника, Гулькевический р-н), расположенного в равнинной восточной степной зоне Краснодарского края между городами Армавир и Крототкин вблизи границы со Ставропольским краем. Стандартные клеевые ловушки с диспенсерами трех типов, предназначенных для отлова особей Z (97% Z11- : 3% E11-14:OAc), E (1% Z11- : 99% E11-14:OAc) рас и гибридов между ними ZE (35% Z11- : 65% E11-14:OAc) производства АО «Целково Агротех» устанавливали в трехкратной повторности (по 3 ловушки с диспенсером каждого типа) на 3–6 полях кукурузы ежегодно по стандартной схеме [Шапиро и др., 1979] в сроки,

предшествующие ожидаемому началу лёта имаго перезимовавшего и первого поколений. Осмотр ловушек и подсчет отловленных имаго проводили каждые 3–4 дня, начиная с попадания в ловушку первой бабочки (до этого момента ловушки осматривали ежедневно) [Шапиро и др., 1979]. Перед началом лёта имаго следующего поколения производили смену клеевых вкладышей и диспенсеров. Спустя 7–10 дней после завершения лёта имаго родительского поколения на каждом из опытных полей проводили учёт плотности гусениц дочернего поколения путём вскрытия растений кукурузы на случайным образом отобранных 15–30 учётных площадках из пяти растений каждая [Фролов, Малыш, 2004].

Результаты и обсуждение

Данные по количеству отловленных самцов кукурузного мотылька родительских и плотностью питающихся на растениях гусениц дочерних поколений за учетные периоды 2014–2016 гг. представлены в таблице 1. Результаты испытаний феромонов подтверждают ранее полученные данные о том, что на территории проведения работ подавляющее большинство особей кукурузного мотылька при-

надлежит к феромонной расе Z [Фролов, 1984].

На протяжении 2014–2016 гг. численность кукурузного мотылька, как в первом, так и втором поколениях росла. Если в 2014 г. показатели плотностей гусениц на посевах кукурузы оценивались значениями 3.79 и 3.97 особей на 1 м² в первом и втором поколениях, то в 2015 г. они поднялись до 5.36 и 36.85, а в 2016 г. – до 12.07 и 40.91 особей

Таблица 1. Количество имаго и плотность гусениц кукурузного мотылька на учетных посевах кукурузы (Кубанская опытная станция ВИР, НПО «КОС-МАИС», 2014–2016 гг.

Год	Сорт, гибрид	Текущее поколение имаго в сезоне	Кол-во самцов текущего поколения в расчете на 1 ловушку с феромоном расы			Плотность гусениц следующего поколения на 1 кв. м. посева кукурузы *)
			Z	E	ZE	
2014	Кубанский 101	перезимовавшее	1.7	0	0	2.9±0.31
	Кубанский 280		1.7	0	0	0.9±0.25
	Кубанский 280		3.0	0	0	2.6±0.60
2015	Обский 140	перезимовавшее	2.7	0	0.3	3.4±0.54
	Кубанский 330		1.3	0.3	0	1.9±0.38
	Кубанский 141		1.7	0	0	1.8±0.33
	Кубанский 330		15.3	3.3	3.7	37.5±2.56
	ДК 3511		2.3	0.7	0	9.7±2.14
	Аполлон		7.3	2.0	0.7	24.3±2.37
2016	Леденец	перезимовавшее	2.7	0.3	0	2.4±0.21
	Кубанский 101		3.0	1.3	0.3	5.2±0.34
	Кубанский 250		9.7	0	0.3	3.1±0.60
	Командос		14.3	1.0	0.7	12.9±1.16
	Кубанский 250		10.3	0.3	0	14.7±1.03

*) $\bar{x} \pm SE$

на 1 м², в первом и втором поколениях. Соответственно, если в 2014 и первой половине 2015 г. практически 100% самцов обнаруживалось в ловушках с феромоном расы Z, то во второй половине 2015 г. и, особенно, в 2016 г. значительная их часть привлекалась в ловушки с феромонами E и ZE.

Между средним числом пойманных в ловушки самцов текущего поколения и плотностью питающихся на растениях кукурузы гусениц следующего поколения выявляется тесная связь (рис. 1, 2), высоко достоверная как в случае использования в расчетах насекомых, пойманных в ловушки с феромонами всех типов (Z, E, ZE) суммарно ($r = 0.86$, $F = 32.68$, $df = 1,12$, $p = 0.000097$), так и с феромонами только для Z-расы ($r = 0.75$, $F = 15.79$, $df = 1,12$, $p = 0.001847$).

Регрессия средних значений плотностей гусениц на посевах кукурузы за дочернее поколение на средние оцен-

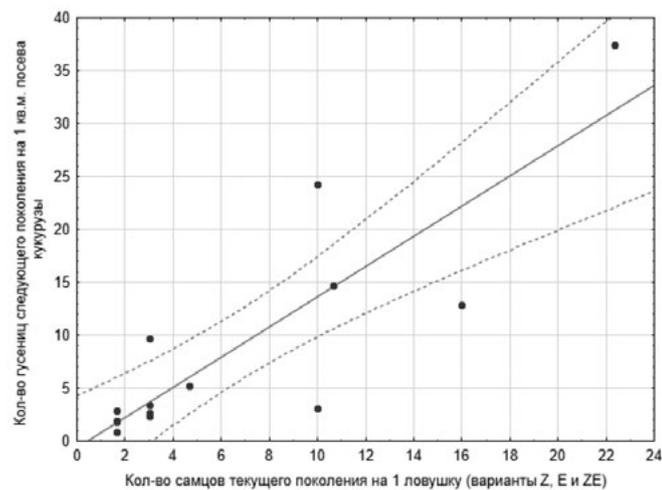


Рисунок 1. Зависимость плотности питающихся на растениях кукурузы гусениц кукурузного мотылька дочернего поколения и числа самцов родительского поколения, пойманных в ловушки с феромонами для Z, E-рас и гибридов ZE

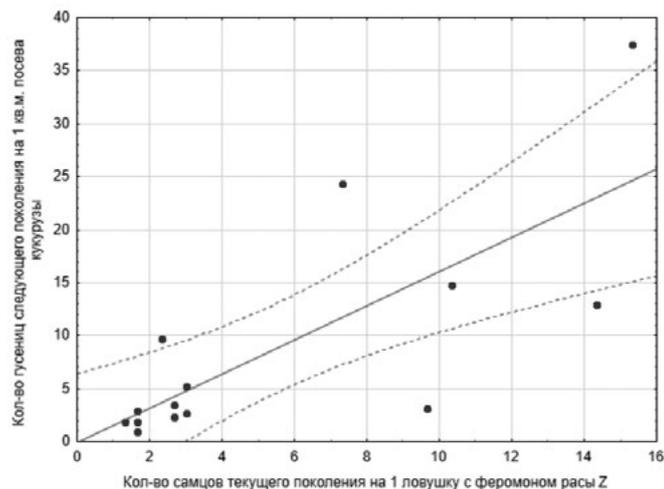


Рисунок 2. Зависимость плотности питающихся на растениях кукурузы гусениц кукурузного мотылька дочернего поколения и числа самцов родительского поколения, пойманных в ловушки с феромонами Z-расы

ки числа пойманных в феромонные ловушки самцов родительского поколения доказана с высоким уровнем значимости ($r = 0.90$, $p = 0.013$): линейная модель описывала 81.9% вариации зависимой переменной (рис. 3). Таким образом, феромонные ловушки могут служить удобным средством для наблюдения за сезонной динамикой численности вредителя.

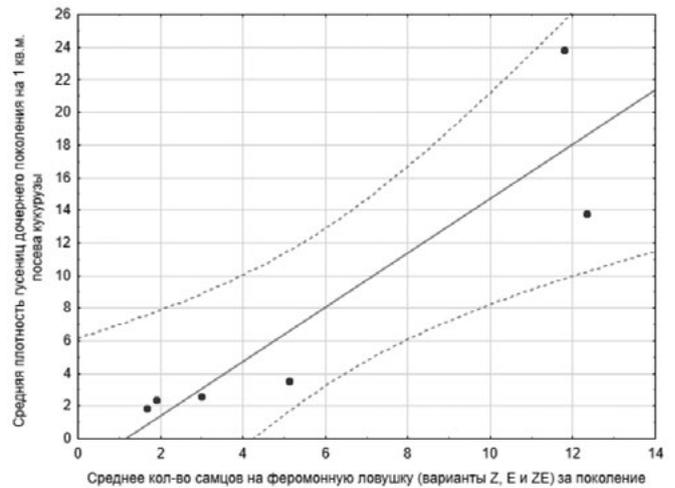


Рисунок 3. Зависимость средней за дочернее поколение оценки плотности питающихся на растениях кукурузы гусениц кукурузного мотылька от среднего за родительское поколение числа самцов, пойманных в ловушки с феромонами для Z, E-рас и гибридов ZE

Ранее было показано, что заселенность посевов кукурузы яйцами и гусеницами кукурузного мотылька в Краснодарском крае тесно коррелирует с числом отловленных вблизи этих посевов самок вредителя, что могло быть использовано для целей мониторинга развития вредителя и сигнализации проведения защитных мероприятий [Фролов и др., 1996]. Выявленная в 2014–2016 гг. тесная связь плотности питающихся на растениях гусениц дочернего поколения с численностью отловленных в феромонные ловушки имаго самцов родительского поколения свидетельствует о возможности организации более эффективного мониторинга и системы сигнализации защитных мероприятий на кукурузе против вредителя. Дальнейшие наблюдения должны быть направлены на уточнение сигнальных значений количества отловленных особей для прогнозирования ущерба, который может быть нанесен посевам кукурузы гусеницами вредителя в зависимости от хозяйственного назначения посева.

Работа осуществлялась в соответствии с Договором между ФГБНУ ВИЗР и ЗАО «Щелково Агрохим» при частичном финансировании грантом РФФИ № 15-04-01226. Авторы благодарят ведущего научного сотрудника АО «Щелково Агрохим» Ю.Б.Пятнову за предоставленный материал, администрацию и сотрудников Кубанской опытной станции ВИР и НПО «КОС-МАИС» за предоставленную возможность проведения учетов численности кукурузного мотылька на производственных посевах кукурузы.

Библиографический список

Войняк В.И., Ковалев Б.Г. Эффективность половых феромонов вредителей кукурузы. // Защита и карантин растений. 2010. N 7. С. 25–26.

Грушевая И.В., Фролов А.Н., Рябчинская Т.А., Трепашко Л.И., Быковская А.В. Новые очаги массовых размножений кукурузного мотылька *Ostrinia nubilalis* в Беларуси и России: тревожный вызов устоявшимся

- знаниям о вредителе. // В сб. «Современные проблемы энтомологии Восточной Европы». Материалы I Международной научно-практической конференции. Минск: Экоперспектива, 2015. С. 93–97.
- Рябчинская Т.А., Фролов А.Н. Состояние исследований и перспективы использования феромонов на полевых культурах // Защита и карантин растений. 2016. N 8. С. 11–14.
- Фролов А.Н., Тришкин Д.С., Дятлова К.Д., Чумаков М.А. Пространственное распределение кукурузного мотылька (*Ostrinia nubilalis*) в зоне развития двух поколений // Зоол. журн. 1996. Т. 75. Вып. 11. С. 1644–1652.
- Фролов А.Н. Биотаксономический анализ вредных видов рода *Ostrinia* Hbn. В кн.: Этология насекомых (Тр. ВЭО, Т. 66). Л.: Наука, 1984. С. 4–100.
- Фролов А.Н., Малыш Ю.М. Плотность размещения и смертность яиц и гусениц младших возрастов кукурузного мотылька на растениях кукурузы // Вестник защиты растений. 2004. N 1. С. 42–55.
- Шапиро И.Д., Вилкова Н.А., Фролов А.Н. Методические указания по использованию синтетических половых феромонов стеблевого мотылька. ВНИИ защиты растений. Ленинград: ВИЗР, 1979. 14 с.
- Bartels D.W., Hutchison W.D., Udayagiri S. Pheromone trap monitoring of Z-strain European corn borer (*Lepidoptera: Pyralidae*): optimum pheromone blend, comparison with blacklight traps, and trap number requirements // J. Econ. Entomol. 1997. V. 90, N 2. P. 449–457.
- Beres P. K. Monitoring of occurrence and notifying dates for European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) control measures in Poland—current situation and perspective // Progress in Plant Protection. 2014. V. 54, N 3. P. 276–282.
- Durant J.A., Manley D.G., Cardé R.T. Monitoring of the European corn borer (*Lepidoptera: Pyralidae*) in South Carolina using pheromone traps // J. Econ. Entomol. 1986. V. 79, N 6. P. 1539–1543.
- Kalinova B., Kotera L., Minaif A. Sex pheromone characterisation and field trapping of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (*Lepidoptera: Pyralidae*), in South Moravia and Slovakia // European J. Entomol. 1994. V. 91. P. 197–203.
- Keszthelyi S., Lengyel Z. Flight of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) as followed by light-and pheromone traps in Várda and Balatonmagyaród 2002 // J. Central European Agric. 2003. V. 4, N 1. P. 55–64.
- Maini S., Burgio G. *Ostrinia nubilalis* (Hb.) (Lep., Pyralidae) on sweet corn: relationship between adults caught in multibaited traps and ear damages // J. Applied Entomol. 1999. V. 123, N 3. P. 179–185.
- Sorenson C. E., Kennedy G. G., Duyn W. van, Bradley J. R., Walgenbach J. F. Geographical variation in pheromone response of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (*Lepidoptera: Crambidae*), in North Carolina: A 20-Y perspective // Environ. Entomol. 2005. V. 34, N 5. P. 1057–1062.
- Stockel J., Sureau F., Carles J.-P. Signification et limites du piégeage sexuel de la pyrale du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hb. (*Lépid. Pyralidae*): recherche d'une relation entre captures de mâles et niveau de population. Agronomie, EDP Sciences, 1984. V. 4, N 7. P. 597–602.

Translation of Russian References

- Frolov A.N. Biotaxonomical analysis of harmful species of the genus *Ostrinia* Hbn. In: Ethologiya Nasekomykh (Trudy VEO, V. 66). Leningrad: Nauka, 1984. P. 4–100. (In Russian).
- Frolov A.N., Malyshev Yu.M. Distributional densities and mortality of eggs and immature larvae of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, on maize. Vestnik zashchity rastenii. 2004. N 1. P. 42–55. (In Russian).
- Frolov A.N., Trishkin D.S., Dyatlova K.D., Chumakov M.A. Spatial distribution of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) in area of developing two generations. Zool. Zhurn. 1996. V. 75, N 11. P. 1644–1652. (In Russian).
- Grushevaya I.V., Frolov A.N., Ryabchinskaya T.A., Trepashko L.I., Bykovskaya A.V. New sources of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* outbreaks in Belarus and Russia: a disturbing call to the established knowledge on insect pest. In: Modern Problems of Entomology of Eastern Europe. Mater. 1st Intern. Sci. and Practical Conf. Minsk: Ekoperspektiva, 2015. P. 93–97. (In Russian).
- Ryabchinskaya T.A., Frolov A.N. State of research and the future of pheromone usage to protect field crops. Zashchita i Karantin Rastenii. 2016. N 8. P. 11–14. (In Russian).
- Shapiro I.D., Vilkoval N.A., Frolov A.N. Methodical instructions on use of synthetic sex pheromones of European corn borer. Leningrad: VIZR, 1979. 14 p. (In Russian).
- Voynyak V.I., Kovalyov B.G. Efficacy of sex pheromones of maize pests. Zashchita i Karantin Rastenii. 2010. N 7. P. 25–26. (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 1(91), p. 55–58

PHEROMONE TRAPS FOR MONITORING THE EUROPEAN CORN BORER *OSTRINIA NUBILALIS* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) IN THE KRASNODAR TERRITORY: DYNAMICS OF MALE NUMBER AND LARVAL DENSITY ON MAIZE FIELDS

A.N. Frolov, I.V. Grushevaya

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

The data obtained confirm close link between density of the European corn borer larva feeding on maize plants and parental generation male number caught in sex pheromone baited traps. The conclusion was drawn that sex pheromones can be appropriate both for monitoring the pest population dynamics and as warning system for treatment of maize fields damaged by the pest.

Keywords: European corn borer; *Ostrinia nubilalis*; sex pheromone; trap; accounting pest numbers.

Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация

*Фролов Андрей Николаевич. Зав. лаб., доктор биологических наук, профессор, e-mail: vizrsppb@email.ru

Грушевая Инна Валентиновна. Младший научный сотрудник

* Ответственный за переписку

Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation

*Frolov Andrei Nikolaevich. Head of Laboratory, Prof., DSc in Biology, e-mail: vizrsppb@email.ru

Grushevaya Inna Valentinovna. Junior Researcher

* Responsible for correspondence

УДК: 595.77 (470.6)

ОБЗОР ФАУНЫ ДВУКРЫЛЫХ ЭНТОМОФАГОВ СЕМЕЙСТВА HYBOTIDAE (DIPTERA) КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ**Ю.К. Кустова***Кубанский государственный университет, Краснодар;**Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур им. В.С. Пустовойта, Краснодар*

В статье приведены сведения об истории изучения Hybotidae на территории Краснодарского края, – одного из наименее исследованных таксонов двукрылых на территории региона, – потенциальных энтомофагов вредителей полевых и плодовых культур. Впервые приведен список видов гиботид края, включающий 62 известных здесь вида семейства, относящиеся к 5 подсемействам (Trichiniinae, Hybotinae, Ocydromiinae, Oedaleinae и Tachydromiinae) и 16 родам. Обобщение известных фаунистических данных представляет собой хорошую основу для дальнейших прикладных исследований.

Ключевые слова: двукрылые, гиботиды, энтомофаги, Краснодарский край.

Мухи семейства Hybotidae – обычно мелкие (1.0–3.0 мм), реже среднего размера (около 5.0) насекомые, окраска черновато-серая или желтая. Они отличаются совокупностью следующих морфологических признаков: костальная жилка оканчивается на вершине крыла, жилка Sc неполная, Rs с 2 ветвями, R_{4+5} простая, dm отсутствует (Tachydromiinae) или имеется (Ocydromiinae, Hybotinae); в последнем случае она дает начало 2 или 3 жилкам. В ряде родов (*Tachypeza*, *Tachydromia*, *Chersodromia*, *Stilpon*) наблюдается укорачивание крыльев, до полной их редукции; иногда крылья с характерным рисунком (пятна, поперечные полосы). Передние голени на внутренней поверхности у основания всегда несут обычно хорошо видимый тиббиальный орган. Средние ноги часто модифицированы, хватательные. Гипопигий асимметричный, иногда очень сложной структуры, повернут вправо примерно на 90° [Шамшев, 2001].

Мухи населяют самые разнообразные биотопы (почва, растительный покров, стволы деревьев и пр.), встречаются с ранней весны до глубокой осени (у некоторых известна зимовка имаго). Имаго – активные хищники, в редких случаях питаются пыльцой и нектаром. Роение, связанное с половым поведением, отсутствует. Личинки развиваются в почве, навозе, гниющих растительных остатках и прочих, хищники. В Палеарктике около 600 видов, относящихся к 26 родам.

Несмотря на длительную историю изучения на территории России (первые сведения по гиботидам в нашей стране были опубликованы в 1834 г. [Шамшев, 2016]) степень исследованности различных регионов неодинакова. К наименее изученным территориям до недавнего времени относился и Северо-Западный Кавказ, большую часть которого административно составляет Краснодарский край. В опубликованном 10 лет назад таксономическом списке гиботид Кавказа [Шамшев, Кустов, 2006] приводятся сведения лишь о трех видах с территории края: *Crossopalpus aeneus* (Walker, 1871), *Platypalpus pallidiseta* Kovalev, 1978, *Tachydromia parva* Chvála, 1970. Впоследствии в связи с активным исследованием группы в регионе, с его территории были указаны и описаны 11 новых для края видов в 2010 г. (учтены только безошибочные указания): *Bicellaria austriaca* Tuomikoski 1955, *Bicellaria nigra* (Meigen, 1824), *Bicellaria spuria* (Fallen, 1816), *Bicellaria sulcata* (Zetterstedt, 1842), *Bicellaria vana* Collin 1926, *Elaphropeza*

ephippiata (Fallen, 1815), *Hybos femoratus* (Müller, 1776), *Leptopeza flavipes* (Meigen, 1820), *Oedalea flavipes* Zetterstedt 1842, *Symbalophthalmus pictipes* (Becker, 1889), *Platypalpus exilis* (Meigen, 1822) [Гладун, Кустов, 2010]; еще 3 – в 2011 г.: *Euthyneura myrtilli* Macquart 1836, *Oedalea holmgreni* Zetterstedt 1852 и *Oedalea montana* Chvála, 1981 [Криштопа, Кустов, 2011]. В этот период описываются два вида гиботид из Краснодарского края как новые для науки: *Chersodromia isabellae* [Grootaert, Shamshev, 2010] и *Chersodromia nikolayi* [Grootaert et al., 2012b], а также впервые с Черноморского побережья края указывается *Ch. pontica* Chvála, 1970 и *Ch. curtipennis* Collin, 1950 [Grootaert et al., 2012b]. В 2012 г. из Апшеронского района были описаны два новых вида гиботид: *Platypalpus negrobovi* [Grootaert et al., 2012a] и *Euthyneura zaitsevi* Shamshev et Kustov, 2012 [Шамшев, Кустов, 2012]; три вида, *Tachypeza yinyang* Pappet and Földvári, 2001, *Trichinomyia fuscipes* (Zetterstedt [1838]) и *Symbalophthalmus dissimilis* (Fallén 1815) были указаны с территории Кавказского биосферного заповедника [Криштопа, 2012] и 1 вид – *Platypalpus vegrandis* Frey, 1943, – с территории заказника «Камышанова Поляна» [Grootaert et al., 2011]. В первой обзорной статье по двукрылым насекомым этого заказника впервые приводятся для Краснодарского края следующие виды: *Symbalophthalmus pictipes* (Becker, 1889), *Ocydromia glabricula* (Fallén, 1816), *Oropezeella sphenoptera* (Loew, 1873), *Platypalpus brachystylus* (Bezzi, 1892), *P. ciliaris* (Fallén, 1816), *P. longicornis* (Meigen, 1822), *P. pectoralis* (Fallén, 1815), *Tachydromia arrogans* (Linnaeus, 1761) [Михайличенко и др., 2013]. В последние годы активизировались исследования крупнейшего рода гиботид – *Platypalpus*. В 2014 году опубликованы описания шести новых видов для науки, пять из которых описаны с территории Краснодарского края: *P. arzanovi*, *P. gazaryani*, *P. kamyschanovensis*, *P. odintsovi* и *P. neberdzaensis* [Kustov et al., 2014]. Еще семь новых видов были описаны в 2015 г. и среди них три вида – из Краснодарского края: *Platypalpus akhunensis*, *P. pseudosilvahumidus*, *P. subcaucasicus* [Kustov et al., 2015]; здесь же впервые для края указаны 9 видов: *P. albicornis* (Zetterstedt, 1842), *P. baldensis* (Strobl, 1899), *P. caroli* Grootaert, 1987, *P. clarandus* (Collin, 1926), *P. collini* (Chvála, 1966), *P. cothurnatus* Macquart, 1827, *P. infectus* (Collin, 1926), *P. luteicornis* (Meigen, 1838), *P. ruficornis* (von Roser, 1840); в статье также приведен ключ для опре-

деления всех 47 известных на данный момент кавказских видов рода [Kustov et al., 2015]. Недавно были опубликована работа по палеарктической фауне рода *Hybos* [Shamshev et al., 2015], которая содержит новые сведения об обитании на Кавказе видов *Hybos femoratus* (Müller, 1776) и *Hybos vagans* Loew, 1874. Новый для Кавказа род *Chvalalea* с видом *Ch. sopiana*e Pappet, Földvári, 2001 был указан для Кавказа и России впервые [Кустов, 2012; Кустов, 2016]. В 2016 г. был опубликован аннотированный список эмпидоидов Кавказа, в котором для Краснодарского края были впервые приведены *Tachydromia caucasica* Chvála, 1970, *Tachypeza nubila* (Meigen, 1804), *Oedalea austroholmgreni* Chvála, 1981, *Platypalpus caucasicus* Kovalev, 1967, *P. longiseta* (Zetterstedt, 1842), *P. luteolus* (Collin, 1926), *P. mikii* (Becker, 1890), *P. pectoralis* (Fallén, 1815) [Кустов, 2016].

Таким образом, в результате анализа данных литературы и коллекционных материалов кафедры зоологии ФГБОУ ВО «КубГУ» установлено, что на сегодняшний день с территории Краснодарского края известны 62 вида

хищных мух семейства Hybotidae, относящиеся к 5 подсемействам (Trichiniinae, Hybotinae, Ocydromiinae, Oedaleinae и Tachydromiinae) и 16 родам.

Некоторые морфологические особенности гиботид, например, наличие специализированных хватательных конечностей, свидетельствуют об активном хищном образе жизни этих двукрылых, для большинства из которых не известны альтернативные способы питания. На территории Краснодарского края гиботиды встречаются во всех типах ландшафтов, от приморских пляжей до альпийских лугов, зачастую являясь массовыми насекомыми, образующими локальные скопления. Нередко эти мухи населяют агроценозы полевых и плодовых культур в разных высотных поясах. Их активность как энтомофагов, динамика численности и биология практически не исследованы. В дальнейшем целесообразно оценить роль массовых видов этих насекомых в свойственных им типах ландшафтов в качестве агентов биологической регуляции вредителей полевых и плодовых культур.

Библиографический список (References)

- Гладун В.В. К познанию фауны семейств Empididae и Hybotidae (Diptera) ландшафтного заказника «Камышанова Поляна» / В.В. Гладун, С.Ю. Кустов // Актуальные вопросы экологии и охраны природы экосистем южных регионов России и сопредельных территорий. Материалы XXIII Межреспубликанской научно-практической конференции с международным участием. Краснодар, 2010. С. 110–112.
- Криштопа А.Н. К познанию фауны мух-гиботид (Diptera, Hybotidae) Кавказского заповедника / А.Н. Криштопа // Материалы XIV Съезда Русского Энтомологического общества, Санкт-Петербург, 2012. С. 224.
- Криштопа А.Н. К познанию фауны Hybotidae (Insecta, Diptera) Кавказа / А.Н. Криштопа, С.Ю. Кустов // Актуальные вопросы экологии и охраны природы экосистем южных регионов России и сопредельных территорий. Материалы XXIV Межреспубликанской научно-практической конференции с международным участием. Краснодар, 2011. С. 71–72.
- Кустов С.Ю. Фаунистический обзор мух-толкунчиков (Diptera, Empididae, Hybotidae, Atelestidae, Brachystomatidae) Кавказа / С.Ю. Кустов // XIV съезд Русского энтомологического общества. Материалы съезда. Санкт-Петербург, 2012. С. 236.
- Кустов, С.Ю. Кавказ – как центр видовой разнообразия эмпидоидных двукрылых (Diptera: Empididae, Hybotidae, Atelestidae, Brachystomatidae) в Палеарктике / С.Ю.Кустов // Чтения памяти Н.А. Холодковского, 2016. Т. 1, вып. 68. 158 с.
- Михайличенко Т.В. Энтомофауна заказника «Камышанова поляна». 2. Двукрылые (Diptera) / Т.В. Михайличенко, В.В. Гладун, С.Ю. Кустов, С.В. Нестеренко, А.С. Замотайлов, И.Б. Попов // Труды Кубанского государственного аграрного университета, 2013. Т. 44, вып. 5. С. 94–111.
- Шамшев И.В. Семейство Hybotidae. Определитель насекомых Дальнего Востока России / под ред. П.А. Лера. – Владивосток: Дальнаука, 2001. Т. 6, ч. 2: Двукрылые и блохи. С. 258–286.
- Шамшев И.В. Двукрылые надсемейства Empidoidea (кроме Dolichopodidae) фауны России / И.В. Шамшев // X Всероссийский Диптерологический симпозиум (с международным участием). Сборник материалов. Краснодар, Кубанский государственный университет, 2016. С. 326–330.
- Шамшев И.В. Список видов семейств Hybotidae и Empididae (Diptera) Кавказа / И.В. Шамшев, С.Ю. Кустов // Кавказский энтомологический бюллетень. 2006. Т. 2, вып. 2. С. 221–230.
- Шамшев И. В. Новый вид рода Euthyneura Macquart, 1836 (Diptera: Hybotidae) с Кавказа / И.В. Шамшев, С.Ю. Кустов // Кавказский энтомологический бюллетень, 2012. Т. 8, вып. 2. С. 353–355.
- Grootaert P. *Platypalpus negrobovi* a new species of the family Hybotidae (Diptera: Empidoidea) from the North-West Caucasus / P. Grootaert, S.Yu. Kustov, I.V. Shamshev // Caucasian Entomological Bulletin, 2012a. N 8 (1). P. 161–163.
- Grootaert P. New records of *Chersodromia* Walker (Diptera: Hybotidae) from the shore of Black Sea and Sea of Azov of Russiawith description of a new species / P. Grootaert, I.V. Shamshev, S.Yu. Kustov // Miscellaneous papers - N156. Web Page of the Cesa: <http://www.cesa-tr.org/> Printed in YüzüncüYil University, 2012b. P. 1–9.
- Grootaert, P. A new *Chersodromia* Walker (Diptera: Hybotidae) from shore of the Sea of Azov (Russia) / P. Grootaert, I.V. Shamshev // Zootaxa, 2010. N 2645. P. 64–68.
- Grootaert P. Flowers as hunting ground for *Platypalpus vegrandis* Frey, 1943 (Diptera, Hybotidae, Tachydromiinae) / P. Grootaert, I. Shamshev, I. Van de Velde // Bulletin van de Koninklijke Belgische Vereniging voor Entomologie, 2012. N 147 (2011). P. 239–240.
- Kustov S.Yu. Six new species of the *Platypalpus pallidiventris-cursitans* group (Diptera: Hybotidae) from the Caucasus / S.Yu. Kustov, I.V. Shamshev, P. Grootaert // Zootaxa, 2014. N 3779 (5). P. 529–539.
- Kustov S.Yu. New data on the genus *Platypalpus* (Diptera: Hybotidae) from the Caucasus with description of seven new species / S.Yu. Kustov, I.V. Shamshev, P. Grootaert // Zootaxa, 2015. N 3973 (3). P. 451–473.
- Shamshev I.V. New data on the genus *Hybos* Meigen (Diptera: Hybotidae) from the Palearctic region / I.V. Shamshev, P. Grootaert, S.Yu. Kustov // Zootaxa, 2015. N 3936 (4). P. 451–484.

Translation of Russian References

- Гладун В.В. К познанию фауны семейств Empididae и Hybotidae (Diptera) Gladun V.V., Kustov S.Yu. To knowledge of fauna of the Empididae and Hybotidae (Diptera) families of the landscape wildlife area “Kamyshanova Polyana”. In: Aktual'nye voprosy ekologii i okhrany prirody ekosistem yuzhnykh regionov Rossii i sopredel'nykh territorii. Materialy XXIII Mezhrespublikanskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem. Krasnodar, 2010. P. 110–112.
- Krishtopa A.N. To knowledge of fauna of Hybotidae (Diptera) of the Caucasus Nature Reserve. In: Materialy XIV S'ezda Russkogo Entomologicheskogo obshchestva, Saint Petersburg, 2012. P. 224.
- Krishtopa A.N., Kustov S.Yu. To knowledge of the fauna of Hybotidae (Diptera) of the Caucasus. In: Aktual'nye voprosy ekologii i okhrany prirody ekosistem yuzhnykh regionov Rossii i sopredel'nykh territorii. Materialy XXIV Mezhrespublikanskoi nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem. Krasnodar, 2011. P. 71–72.
- Kustov S.Yu. Review of the fauna of dance-flies (Diptera, Empididae, Hybotidae, Atelestidae, Brachystomatidae) of the Caucasus. In: XIV s'ezd Russkogo entomologicheskogo obshchestva. Materialy s'ezda. Sankt-Peterburg, 2012. P. 236.
- Kustov, S.Yu. The Caucasus as a center of species diversity of empidooids (Diptera: Empididae, Hybotidae, Atelestidae, Brachystomatidae) in the Palearctic. Chteniya pamyati N.A. Kholodkovskogo, 2016. V. 1, No 68. 158 p.
- Mikhailichenko T.V., Gladun V.V., Kustov S.Yu., Nesterenko S.V., Zamotailov A.S., Popov I.B. Entomofauna of landscape nature reserve “Kamyshanova Poljana”. 2. Dipteran Insects. In: Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2013. V. 44, No 5. P. 94–111.

Shamshev I.V. Family Hybotidae. In: Keys to the insects of Russian Far East. V. 6. Diptera and Siphonaptera (ed. P. Ler). Pt. 2. Vladivostok. Dalnauka, 2001. P. 258–286.

Shamshev I.V. Flies of the superfamily Empidoidea (except Dolichopodidae) of the fauna of Russia. In: 10 Vserossiiskii Dipterologicheskii simpozium (s mezhdunarodnym uchastiem). Sbornik materialov. Krasnodar, Kubanski gosudarstvennyi universitet, 2016. P. 326–330.

Shamshev I.V., Kustov S.Yu. A check-list of fly families Hybotidae and Empididae (Diptera) from the Caucasus. Kavkazskii entomologicheskii byulleten. 2006. V. 2, No 2. P. 221–230.

Shamshev I.V., Kustov S.Yu. A new species of the genus Euthyneura Macquart, 1836 (Diptera: Hybotidae) from the Caucasus. Kavkazskii entomologicheskii byulleten, 2012. V. 8, No 2. P. 353–355.

Plant Protection News, 2017, 1(91), p. 59–61

REVIEW OF DIPTERAN ENTOMOPHAGES OF HYBOTIDAE (DIPTERA) FAMILY IN KRASNODAR TERRITORY

Yu.K. Kustova

Kuban State University, Krasnodar, Russia;

All-russia research institute of oil crops by V.S. Pustovoit, Krasnodar, Russia

The history of knowledge on Hybotidae (Diptera) fauna in the Krasnodar Territory is reviewed. The family contains poorly studied dipteran entomophages on the territory of this region. A list of species is given for the first time.

Keywords: Diptera; Hybotidae; Krasnodar Territory; list of species.

Сведения об авторе

Кубанский государственный университет, ул. Ставропольская 149, 350040 Краснодар, Российская Федерация
Кустова Юлия Константиновна. Аспирантка,
e-mail: yul25178730@yandex.ru

Information about the author

Kuban State University, Stavropolskaya St. 149, 350040 Krasnodar, Russian Federation
Kustova Yulia Konstantinovna. PhD student,
e-mail: yul25178730@yandex.ru

УДК 591.3 (595.792)

ДИНАМИКА ВЫЛЕТА И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ТРИХОГРАММЫ

С.Я. Резник, Н.Д. Войнович

Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург

Исследование самок *Trichogramma telengai*, развивавшихся в одновременно зараженных яйцах зерновой моли при температуре 20 °С и длине светового дня 18 ч, выявило существенную зависимость их качества от дня вылета имаго из хозяйина. Циркадное время вылета (т.е. время, прошедшее после включения света) также влияло на качество трихограмм. Чем позже вылетали самки, тем меньше были их размер и плодовитость. Следовательно, день и циркадное время вылета имаго должны учитываться при составлении методик контроля качества трихограмм при массовом разведении.

Ключевые слова: размер, плодовитость, время развития, ритм вылета, *Trichogramma telengai*.

Низкая эффективность массово разводимых энтомофагов – одна из основных проблем биологической защиты растений. Для оценки размеров тела, потенциальной и реализованной плодовитости, способности к поиску хозяев и других компонентов «качества» паразитоидов-яйцеедов из рода *Trichogramma* Westw. используются различные способы [Щепетильникова и др., 1974; Bigler, 1994; Сорокина, 2001; Lenteren, Bigler, 2010]. Впрочем, точность контроля качества партии трихограмм зависит не только от используемых методик тестирования, но и от метода отбора проб. Известно, что вылет имаго разных видов трихограмм из одновременно зараженных яиц хозяев растянут, в зависимости от температуры, на срок до нескольких дней. Кроме того, трихограммам, как и многим другим насекомым, свойствен суточный ритм вылета имаго, причем продолжительность периода вылета составляет, в зависимости от фотопериода и температуры, до 6–8 ч [Резник и др., 1998; Резник, Карпова, 2006]. Ранее было показано, что время развития коррелирует с некоторыми биологическими параметрами *Trichogramma evanescens* Westw [Doyon, Voivin, 2005]. Однако эта зависимость не учтена в большинстве учебников и руководств по контролю каче-

ства трихограмм. Трихограммы, используемые для биологической борьбы с вредными насекомыми, как правило, поставляются в виде зараженных яиц хозяев. Протоколы контроля качества обычно начинаются с отбора имаго для тестов, причем время, прошедшее с начала вылета имаго исследуемого образца, и, тем более, циркадное время (время с момента включения света) не учитываются или указываются приблизительно, например, «после массового вылета» [Щепетильникова, 1974; Bigler, 1994; Сорокина, 2001; Lenteren, Bigler, 2010]. Целью нашего исследования была оценка размера и плодовитости самок трихограмм, вылетевших в разное время из одной порции одновременно зараженных яиц хозяев.

Опыты были проведены с партеногенетической лабораторной линией *Trichogramma telengai* Sor. Вначале в каждой повторности опыта около 3000 яиц зерновой моли в течение 2 ч подвергались заражению примерно 1000 самками лабораторной линии *T. telengai*. Зараженные яйца инкубировали при температуре 20 °С и длине дня 18 ч. При таких условиях вылет имаго продолжается 4 дня, начинается ежедневно перед самым включением света и завершается практически через 6 ч после включения [Резник и

др., 1998; Заславский и др., 1999]. Через 10–12 дней после заражения несколько сотен потемневших (зараженных) яиц помещали в отдельную пробирку, вылетающих самок использовали согласно схеме конкретного опыта.

Целью первого опыта было выявление корреляции между днем вылета, размером и плодовитостью самки. На протяжении 4 дней из самок, вылетевших в течение каждого дня, выбирали 40–50 особей и помещали их по одной в маленькие пробирки. Каждой из самок предоставили карточку с 50–60 яйцами зерновой моли, для подкормки на стекло пробирки помещали каплю меда. После этого самок содержали 6 дней при температуре 25°C и длине дня 18 ч. Через 2 и 4 дня после начала опыта карточки заменяли на новые со свежими яйцами зерновой моли, а старые карточки инкубировали при тех же условиях. Через 6 дней после индивидуальной рассадки по пробиркам самок фиксировали и под микроскопом измеряли длину средней голени каждой особи. Когда зараженные яйца темнели, их подсчитывали на каждой карточке. В качестве двух оценок плодовитости использовали число хозяев, зараженных за первые два дня и за все время опыта. Всего было проведено 8 повторностей первого опыта, в общей сложности включавших 555 особей.

Целью второго опыта было сравнение самок, вылетевших в течение одного дня. Этот эксперимент был проведен по той же методике, что и первый опыт, но самок отбирали только на второй день вылета через 2, 3, и 6 ч после вклю-

чения света. Таким образом, все самки были разделены на «раннюю, среднюю и позднюю» фракции, вылетевшие в течение 2 часов после включения света, с 2 до 3 часов после включения света, и с 3 до 6 часов после включения света. Всего было проведено пять повторностей второго опыта, в общей сложности включавших 566 особей.

Статистическая обработка данных включала дисперсионный анализ и тест Тьюки. Все подсчеты были проведены с помощью программы SYSTAT 10.2.

Двухфакторный дисперсионный анализ результатов первого и второго опытов показал, что все три исследуемых параметра (размер тела и число хозяев, зараженных за 2 и за 6 дней) достоверно ($p < 0.001$) зависят от дня и от времени вылета. Различия между повторностями опыта, впрочем, тоже были статистически достоверными, поэтому для лучшего выявления различий между особями, вылетевшими в разное время, данные были нормированы: каждая величина была заменена ее процентным отклонением от среднего для повторности по формуле $D = 100 (X - M) / M$, где D – нормированная величина (%), X – исходная величина, а M – среднее для повторности. Обработка нормированных данных ясно показала: чем позднее вылетают самки, тем они мельче и тем ниже их плодовитость, причем этот эффект наблюдается как на протяжении всего вылета (табл. 1), так и в течение одного дня (табл. 2).

Таблица 1. Размер и плодовитость самок *Trichogramma telengai* в зависимости от дня вылета из хозяина

Анализируемые показатели	День вылета (со дня вылета первой особи)			
	1	2	3	4
Длина средней голени *	10.6 ± 0.7 a	3.0 ± 0.9 b	-3.5 ± 0.9 c	-13.6 ± 1.0 d
Число яиц зерновой моли, зараженных за 2 дня *	30.9 ± 3.4 a	8.9 ± 3.6 b	-14.3 ± 3.7 c	-35.5 ± 3.8 d
Число яиц зерновой моли, зараженных за 6 дней *	39.0 ± 4.3 a	2.9 ± 3.8 b	-15.9 ± 4.0 c	-36.5 ± 4.8 d

*) Приведены нормированные данные (среднее процентное отклонение от среднего по повторности и его ошибка); величины в одной строке таблицы, помеченные разными буквами, достоверно различаются ($P < 0.05$ по тесту Тьюки).

Таблица 2. Размер и плодовитость самок *Trichogramma telengai* в зависимости от циркадного времени вылета из хозяина

Анализируемые показатели	Время вылета (с момента включения света)		
	от 0 до 2 ч	от 2 до 3 ч	от 3 до 6 ч
Длина средней голени *	2.1 ± 0.6 a	-0.6 ± 0.6 b	-1.8 ± 0.7 b
Число яиц зерновой моли, зараженных за 2 дня *	14.0 ± 2.2 a	-4.9 ± 2.4 b	-9.4 ± 2.4 b
Число яиц зерновой моли, зараженных за 6 дней *	9.3 ± 2.5 a	-2.5 ± 2.7 b	-7.0 ± 2.6 b

*) См. примечание к табл. 1.

Как видно из приведенных выше данных, различия в размере и плодовитости между особями, вылетевшими в разные дни, составили, соответственно, более 20 и 70% среднего. Различия между ранней, средней и поздней фракциями самок, вылетевших в один и тот же день, также были значительными (около 5% в размерах тела и около 25% в плодовитости). Можно заключить, что размер, плодовитость и, возможно, некоторые другие биологические характеристики трихограмм существенно зависят не толь-

ко от дня, но и от циркадного времени вылета. Поэтому, если протокол контроля качества трихограмм включает отбор имаго для тестов, следует указывать день (считая с момента вылета первой особи) и циркадное время отбора образцов. Если же для каких-либо целей требуются наиболее крупные и плодовитые особи, сбор имаго следует проводить в первый день вылета сразу после включения света.

Исследование было осуществлено при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований ОБН РАН «Рациональное использование биологических ресурсов России: фундаментальные основы управления».

Библиографический список (References)

- Резник С.Я. Метод синхронизации вылета трихограммы / С.Я. Резник, С.Г. Карпова // Защита и карантин растений. 2006. N 2. С. 54–55.
 Резник С.Я. Зависимость ритма вылета имаго от фото- и термопериода у видов рода *Trichogramma* Westw. (Hymenoptera, Trichogrammatidae) / С.Я. Резник, К.Б. Зиновьева, Т.Я. Умарова, В.А. Заславский // Энтомологическое обозрение. 1998. Т. 77. N 1. С. 17–25.
 Сорокина А. П. Оценка перспективных видов рода *Trichogramma* в защите растений / А.П. Сорокина // СПб.: ВИЗР. 2001. 44 с.

Щепетильникова В.А. Методические указания по массовому разведению и применению трихограммы для борьбы с вредителями сельскохозяйственных культур / В.А. Щепетильникова, Г.В. Гусев, Н.М. Тронь, Г.Н. Цыбульская // М.: Колос. 1974. 80 с.

Bigler F. Quality control in *Trichogramma* production / F. Bigler // Biological Control with Egg Parasitoids. Wallingford, UK: CAB International. 1994. P. 93–111.

Doyon J. The effect of development time on the fitness of female *Trichogramma evanescens* / J. Doyon, G. Boivin // Journal of Insect Science. 2005. V. 5. N 1. P. 4.

Lenteren J. C. Quality control of mass reared egg parasitoids / J. C. van Lenteren, F. Bigler // Egg Parasitoids in Agroecosystems with Emphasis on *Trichogramma*. Dordrecht, The Netherlands: Springer. 2010. P. 315–340.

Translation of Russian References

Reznik S.Ya. A method of synchronization of *Trichogramma* emergence. Zashchita i karantin rastenii, 2006, N 2. P. 54–55. (In Russian).

Reznik S.Ya., Zinovieva K.B., Umarova T.Ta., Zaslavskii V.A. Dependence of emergence rhythm on photoperiod and thermoperiod in species of the genus *Trichogramma* Westw. Entomologicheskoe obozrenie, 1998, V. 77, N 1. P. 17–25. (In Russian).

Shchepetilnikova V.A., Gusev G.V., Tron' N.M., Tsybul'skaya G.N. Manual of methods of *Trichogramma* mass rearing and application for biological control of agricultural pests. Moscow: Kolos. 1974. 80 p. (In Russian).

Sorokina A.P. Evaluation of *Trichogramma* species promising for plant protection. St. Petersburg: VIZR, 2001. 44 p. (In Russian).

Plant Protection News, 2017, 1(91), p. 61–63

EMERGENCE DYNAMICS AND QUALITY CONTROL IN *TRICHOGRAMMA*

S.Ya. Reznik, N.D. Voinovich

Zoological Institute RAS, St. Petersburg, Russia

Laboratory experiments with *Trichogramma telengai* Sor. females developed at a temperature of 20°C and day length of 18 h in a batch of simultaneously parasitized eggs of the grain moth *Sitotroga cerealella* Oliv. have showed that their quality was significantly dependent on day and circadian time (i.e. time from light-on) of emergence: the later the females emerged, the smaller was their size and fecundity. Based on these results, we conclude that day and circadian time of emergence should be indicated in the protocols for *Trichogramma* quality tests at mass rearing.

Keywords: female size; fecundity; time of development; rhythm of emergence; *Trichogramma telengai*.

Сведения об авторах

Зоологический институт РАН, Университетская наб., 1, 199034 Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Reznik Sergey Yakovlevich*. Заведующий лабораторией, доктор биологических наук, e-mail: reznik1952@mail.ru

Voinovich Natalia Dmitrievna. Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук.

Information about the authors

Zoological Institute RAS, Universitetskaya nab., 1, 199034, St. Petersburg, Russian Federation.

**Reznik Sergey Yakovlevich*. Head of laboratory, DSc in Biology. e-mail: reznik1952@mail.ru

Voinovich Natalia Dmitrievna. Senior Researcher, PhD in Biology.

* Ответственный за переписку

* Responsible for correspondence

Информация для авторов

В «Вестнике защиты растений» публикуются результаты оригинальных исследований, теоретические обзоры, прикладные работы, дискуссии и рецензии работ по биологическим проблемам, имеющим отношение к защите растений.

Журнал пропагандирует современные методы защиты растений, включая методы создания устойчивых сортов растений и биосредства борьбы с вредными объектами; фитосанитарный мониторинг агроэкосистем, их агробиоценологическую диагностику и моделирование идущих в них процессов; технологию, экономику и экологическую безопасность применения средств защиты растений.

Фиксированные разделы журнала: 1) полные статьи, 2) краткие сообщения, 3) дискуссия, 4) хроника.

Периодичность выхода журнала 4 раза в год.

Полный перечень требований к оформлению рукописей доступен на сайте ВИЗР (<http://vizr.spb.ru/>), во вкладке «Вестник защиты растений». Здесь же мы хотим обратить внимание авторов на основные ошибки в оформлении статей, часто допускаемые при их подготовке.

Так заголовок **не следует** набирать прописными буквами – они должны быть лишь там, где необходимо (в именах собственных, аббревиатурах и т.п.).

Имена авторов под заголовком должны начинаться с инициалов. В информации же об авторах, приводимой в конце рукописи следует приводить фамилию, имя и отчество полностью (именно в таком порядке), затем указывать должность, ученую степень, звание и e-mail.

Следует обратить внимание на то, что дробную часть в десятичных числах в нашем журнале принято отделять **точкой, а не запятой**.

Кроме того, хотелось бы привлечь внимание авторов к требованиям, касающимся иллюстраций.

Иллюстрации, таблицы и подписи к ним размещают в тексте. Оптимальная ширина рисунков и таблиц – 8,7 см (по ширине колонки) либо 18 см (по ширине страницы).

Диаграммы и графики строятся **без использования цветных элементов**, стандартными средствами Microsoft Word, либо (предпочтительно) в программе Microsoft Excel (в этом случае необходимо **предоставить дополнительные файлы (.xls) с оригиналами**). Они должны оставаться доступными для редактирования.

Растровые изображения (**фотографии, рисунки**), помимо размещения в тексте статьи, также **предоставляются в виде отдельных файлов** в формате TIF или JPEG (максимального качества), в черно-белом (Grayscale) исполнении, с разрешением не менее 300 точек на дюйм (dpi).

Хотите подписаться на журнал?

Сделать это совсем не сложно! Россияне и жители других государств СНГ могут оформить подписку в ближайших отделениях связи. Заказать подписку можно и в редакции, по e-mail: vkm@icZR.ru. В заказе надо обязательно указать свой почтовый адрес.

Научное издание.

Индекс 36189

Подписано к печати 9 марта 2017 г.
Формат 60x84/8. Объем 8 п.л. Тираж 500 экз. Заказ