

6. Alippi A.M., Ronco L. First Report of Crucifer Bacterial Leaf Spot Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Argentina // *Plant Disease*. – 1996. – Vol. 80. – P. 223.
7. Bartoli C., Carrere S., Lamichhane J.R., Varvaro L., Morris C.E. Whole-Genome Sequencing of 10 *Pseudomonas syringae* Strains Representing Different Host Range Spectra // *Genome Announcements*. – 2015. – Vol. 3, No. 2. – P. 1–3.
8. Basic local alignment search tool / NCBI. – URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 06.06.2020).
9. CABI, 2020. – URL: <https://www.cabi.org> (дата обращения: 06.06.2020).
10. EPPO Global Database, 2020. – URL: <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMMC> (дата обращения: 06.06.2020).
11. Gironde S., Manceau C. Housekeeping Gene Sequencing and Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis To Identify Subpopulations within *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* That Correlate with Host Specificity // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2012. – Vol. 78, No. 9. – P. 3266–3279.
12. Kazempour M.N., Kheyrgoo M., Pedramfar H., Rahimian H. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran // *African Journal of Biotechnology*. – 2010. – Vol. 9, No. 20. – P. 2860–2865.
13. Peters B.J., Ash G.J., Cother E.J., Hailstones D.L., Noble D.H., Urwin N.A.R. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Australia: pathogenic, phenotypic and genetic diversity // *Plant Pathology*. – 2004. – Vol. 53. – P. 73–79.
14. Shaad N.W., Jones J.B., Chun W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (3rd edition). – APS Press, 2001. – 373 p.
15. Takikawa Y., Takahashi F. Bacterial leaf spot and blight of crucifer plants (Brassicaceae) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *P. cannabina* pv. *Alisalensis* // *J Gen Plant Pathol*. – 2014. – Vol. 80. – P. 466–474.
16. Zhao Y., Damicone J.P., Demezas D.H., Rangaswamy V., Bender C.L. Bacterial Leaf Spot of Leafy Crucifers in Oklahoma Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* // *Plant Disease*. – 2000. – Vol. 84, No. 9. – P. 1015–1020.
17. Zhao Y., Damicone J.P., Bender C.L. Detection, Survival, and Sources of Inoculum for Bacterial Diseases of Leafy Crucifers in Oklahoma // *Plant Disease*. – 2002. – Vol. 86, No. 8. – P. 883–888.

4. Stancheva Y. Atlas of crop diseases I. Diseases of vegetable crops. Sofia – Moscow: Pensoft, 2005. 181 p. (in Russian).
5. AgroAtlas, 2020. URL: <http://www.agroAtlas.ru> (accessed date: 06.06.2020).
6. Alippi A.M., Ronco L. First Report of Crucifer Bacterial Leaf Spot Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Argentina. *Plant Disease*. 1996; 80: 223.
7. Bartoli C., Carrere S., Lamichhane J.R., Varvaro L., Morris C.E. Whole-Genome Sequencing of 10 *Pseudomonas syringae* Strains Representing Different Host Range Spectra. *Genome Announcements*. 2015; 3 (2): 1–3.
8. Basic local alignment search tool. NCBI. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed date: 06.06.2020).
9. CABI, 2020. URL: <https://www.cabi.org> (accessed date: 06.06.2020).
10. EPPO Global Database, 2020. URL: <https://gd.eppo.int/taxon/PSDMMC> (accessed date: 06.06.2020).
11. Gironde S., Manceau C. Housekeeping Gene Sequencing and Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis To Identify Subpopulations within *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* That Correlate with Host Specificity. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012; 78 (9): 3266–3279.
12. Kazempour M.N., Kheyrgoo M., Pedramfar H., Rahimian H. Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. *African Journal of Biotechnology*. 2010; 9 (20): 2860–2865.
13. Peters B.J., Ash G.J., Cother E.J., Hailstones D.L., Noble D.H., Urwin N.A.R. *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in Australia: pathogenic, phenotypic and genetic diversity. *Plant Pathology*. 2004; 53: 73–79.
14. Shaad N.W., Jones J.B., Chun W. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria (3rd edition). APS Press, 2001. 373 p.
15. Takikawa Y., Takahashi F. Bacterial leaf spot and blight of crucifer plants (Brassicaceae) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *P. cannabina* pv. *Alisalensis*. *J Gen Plant Pathol*. 2014; 80: 466–474.
16. Zhao Y., Damicone J.P., Demezas D.H., Rangaswamy V., Bender C.L. Bacterial Leaf Spot of Leafy Crucifers in Oklahoma Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. *Plant Disease*. 2000; 84 (9): 1015–1020.
17. Zhao Y., Damicone J.P., Bender C.L. Detection, Survival, and Sources of Inoculum for Bacterial Diseases of Leafy Crucifers in Oklahoma. *Plant Disease*. 2002; 86 (8): 883–888.

## Применение метода полимеразной цепной реакции для идентификации преимагинальных стадий *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931)

Е.В. КОЛЕСНИКОВА, заведующая лабораторией энтомологии Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР», e-mail: [katuxa-v@mail.ru](mailto:katuxa-v@mail.ru)

Г.Н. БОНДАРЕНКО, к. б. н., старший научный сотрудник, начальник Испытательного лабораторного центра ФГБУ «ВНИИКР», старший преподаватель Аграрно-технологического института ФGAOU ВО «Российский университет дружбы народов», e-mail: [reseachergm@mail.ru](mailto:reseachergm@mail.ru)

**Аннотация.** В процессе работы была изучена возможность применения метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) определенных участков гена COI для идентификации азиатской ягодной дрозифилы *Drosophila suzukii* на преимагинальных стадиях развития и возможность применения изучаемых тестов для лабораторной диагностики. В статье приведены оригинальные данные (нуклеотидные последовательности) для идентификации целевого объекта методом ПЦР и их последующего использования в подборе видоспецифичных генетических маркеров.

**Ключевые слова.** Азиатская ягодная дрозифила *Drosophila suzukii*, видовая идентификация, ПЦР, ген COI, карантин растений.



### ВВЕДЕНИЕ

последние годы значительно увеличился импорт плодово-ягодной продукции на территорию Российской Федерации. По данным Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (статистика поступающей продукции в испытательные лаборатории страны согласно информационной системе «Аргус-Фито»), только за 2018–2019 гг. на территорию России импортировали около 2 млрд т плодовой и ягодной продукции на сумму более 3 млрд долларов США из стран распростра-

## Application of polymerase chain reaction method for identification of preimaginal stages of *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931)

E.V. KOLESNIKOVA, Head of the Entomology Laboratory of the Laboratory Testing Center of FGBU “VNIKR”, e-mail: [katuxa-v@mail.ru](mailto:katuxa-v@mail.ru)

G.N. BONDARENKO, PhD in Biology, Senior Researcher, Head of the Laboratory Testing Center of FGBU “VNIKR”, Senior Lecturer of the Agrarian and Technological Institute of FGAOU VO “Peoples’ Friendship University of Russia” (RUDN University), e-mail: [reseachergm@mail.ru](mailto:reseachergm@mail.ru)

**Abstract.** In the process of work, the possibility of application of polymerase chain reaction (PCR) of certain COI gene fragments for identification of preimaginal developmental stages of spotted-wing drosophila *Drosophila suzukii* and possibility of application of these methods for laboratory diagnostics were studied. The article presents original data (base sequences) for identification of the target object by PCR method as well as further use for selection of species-specific genetic markers.

**Keywords.** The spotted-wing drosophila *Drosophila suzukii*, species-level identification, PCR, COI gene, plant quarantine.

### INTRODUCTION

In recent years, the import of fruit products into the Russian Federation has increased significantly. According to the data of Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (statistics on products incoming to the testing laboratories of the country, according to the Argus-Phyto information system) in 2018–2019 only,

нения *Drosophila suzukii*. При таком потоке продукции есть большой риск инвазии *Drosophila suzukii* в Российской Федерации.

Ежедневно при фитосанитарном досмотре и лабораторном исследовании подкарантинной продукции выявляют как карантинные, так и некарантинные виды плодовых мушек семейства Drosophilidae.

За 2018–2019 гг. при фитосанитарном и лабораторном исследовании в плодово-ягодной и плодовоовощной продукции были выявлены такие виды плодовых мушек, относящихся к семейству Drosophilidae, как *Zaprionus tuberculatus*<sup>1</sup> Malloch, 1932, африканская фиговая муха *Zaprionus indianus* Gupta, 1970, дрозофила обыкновенная *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830, дрозофила похожая *Drosophila simulans* Sturtevant, 1919, азиатская ягодная дрозофила *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931). Если первые 4 не являются карантинными вредителями, то азиатская ягодная дрозофила *Drosophila suzukii* относится к числу карантинных объектов, отсутствующих на территории Евразийского экономического союза.

*Drosophila suzukii* – полифаг, повреждает растения из 15 семейств, особенно из родов *Vaccinium* (вакциниум), *Rubus* (малина), *Prunus* (слива), *Fragaria* (земляника), *Vitis* (виноград), *Ficus* (фикус), *Actinidia* (актинидия), *Rhamnus* (крушина), *Lonicera* (жимолюсть), *Sambucus* (бузина) и многих других (Kanzawa, 1939) [6].

Обычно целевые виды семейства Drosophilidae заселяют механически поврежденные, гниющие плоды; *Drosophila suzukii*, в отличие от таких видов, способна заселять свежие, неповрежденные плоды. Кроме того, самки *Drosophila suzukii* откладывают яйца в созревающие плоды. Вылупляющиеся из яиц личинки питаются внутри плода, вызывая размягчение тканей. На зараженных плодах проявляются вначале небольшие рубцы, оставленные яйцекладом самки, а затем мягкие вдавленные пятна, что в дальнейшем приводит к резкому снижению качества продукции [3].

При карантинном фитосанитарном обследовании и лабораторном исследовании подкарантинной продукции чаще выявляют преимагинальные стадии развития (личинки, пупарии). В настоящее время *Drosophila suzukii* можно идентифицировать только по морфологическим признакам взрослых особей. Ключей и диагностических признаков по преимагинальным стадиям не разработано [3]. В случае выявления преимагинальных стадий для достоверной идентификации необходимо дорастить обнаруженный объект до состояния имаго (для такого дорастивания требуется в среднем от 5 до 10 дней), что приводит к задержке продукции на фитосанитарных контрольных постах и в следствие – порче и потере товарных качеств партий плодовой и ягодной продукции.

Для быстрой и достоверной идентификации *Drosophila suzukii* среди некарантинных видов плодовых мушек, которые встречаются при карантинном фитосанитарном обследовании импортируемой продукции на ранних стадиях развития (личинки, пупарии), необходимо разработать комплекс молекулярно-генетических методов

about 2 billion tons of fruit products worth over 3 billion dollars were imported into the territory of Russia from the countries where *Drosophila suzukii* is present. With such a flow of products there is a great risk of invasion of *Drosophila suzukii* into the Russian Federation.

Every day during phytosanitary inspection and laboratory tests of regulated products, both quarantine and non-quarantine species of fruit flies of family Drosophilidae are detected.

In 2018 and 2019, during phytosanitary and laboratory tests, species of fruit flies of the family Drosophilidae, such as *Zaprionus tuberculatus* Malloch, 1932, African fig fly *Zaprionus indianus* Gupta, 1970, common fruit fly *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830, *Drosophila simulans* Sturtevant, 1919 and spotted-wing drosophila *Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931), were detected in fruit and vegetable products. While the first four species are not quarantine pests, the spotted-wing drosophila *Drosophila suzukii* is one of the quarantine objects absent on the territory of the Eurasian Economic Union.

*Drosophila suzukii* is a polyphage that damages plants from 15 families, especially from genera *Vaccinium*, *Rubus* (raspberry), *Prunus* (plum), *Fragaria* (strawberry), *Vitis* (grape vine), *Ficus* (fig), *Actinidia*, *Rhamnus* (bearwood), *Lonicera* (honeysuckle), *Sambucus* (elder) and many others (Kanzawa, 1939) [6].

Target species of Drosophilidae family usually inhabit mechanically damaged, rotting fruits; *Drosophila suzukii*, unlike these species, is able to inhabit fresh, undamaged fruits. In addition, females of *Drosophila suzukii* lay eggs in ripening fruits. The larvae hatching from the eggs feed inside the fetus, causing tissue softening. Infected fruits first show small scars left by female's ovipositor, and then soft indented spots, which later leads to a sharp decline in the quality of the product [3].

Quarantine phytosanitary inspection and laboratory tests of regulated products more often reveal preimaginal developmental stages of (larvae, puparia). At present, *Drosophila suzukii* can only be identified by morphological features of adults. No keys or diagnostic features have been developed for the preimaginal stages [3]. In case of detection of preimaginal stages, for reliable identification it is necessary to grow the detected object to the state of imago (it takes on average 5 to 10 days for such completion of growing), which leads to production delay at phytosanitary border control posts and consequently – spoilage and loss of commercial qualities of lots of fruit products.

For quick and reliable identification of *Drosophila suzukii* among non-quarantine fruit fly species, which occur during quarantine phytosanitary inspection of imported products at early stages of development (larva, puparium), it is necessary to develop a complex of molecular-genetic methods of diagnostics. To accomplish this task, it is possible to test and use the world experience of molecular identification with PCR and subsequent sequencing of COI gene fragment with universal primers for insects S1859/A2191 (Bogdanowicz et al., 2000), in modification (Kamayev et al., 2015), as well as the proposed international Q-bank primers LCO1490/HCO2198 (Murphy et al., 2015) [2, 5, 7].

диагностики. Для выполнения поставленной задачи возможно апробировать и использовать мировой опыт молекулярной идентификации с применением ПЦР и последующим секвенированием области гена COI с универсальными праймерами для насекомых S1859/A2191 (Bogdanowicz et al., 2000), в модификации (Камаев и др., 2015), а также предложенными международной базой данных Q-bank праймерами LCO1490/ HCO2198 (Murphy et al., 2015) [2, 5, 7].

Использование молекулярного метода позволит идентифицировать *Drosophila suzukii* с точностью до 99–100% на преимагинальных стадиях развития в течение 2–3 дней в зависимости от количества поступивших на анализ образцов личинок или пупариев.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

До начала исследования биологический материал хранили в 70%-м этиловом спирте, перед выделением ДНК проводили его просушку до полного выпаривания спирта.

ДНК выделяли из исследуемого материала (пупарии и личинки на различных стадиях развития), обрабатывая образцы протеиназой К с последующим удалением белков без экстракции органическими растворителями, используя набор «ДНК Экстран-2», набор № NG-511-100 (ЗАО «Синтол», Российская Федерация) согласно инструкции производителя.

После выделения ДНК проводили изменение ее концентрации на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Stf., США). Рекомендуемая концентрация ДНК для получения качественных продуктов ПЦР должна составлять в пределах 2–130 нг/мкл. При необходимости тотальную ДНК разводили до 50–100 нг/мкл.

Для первого этапа анализа применяли ранее представленные праймеры [5]: S1859 (5' – GGAACIGGATGAAC (A/T) GTTTA (C/T) CCICC – 3') и A2191 (5' – CCCGGTAAATATAAACTTC – 3'). В работе использовали условия для ПЦР, оптимизированные Камаевым в соавт., 2015 [2].

Также проводили амплификацию участка ДНК праймерами с LCO1490 (5' – GGTCACAATCATAAAGATATTGG – 3') и HCO2198 (5' – TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA – 3') при условиях разработчиков.

Видоспецифичные праймеры для азиатской ягодной дрозофилы – Dro-Suz A390 (5' – TTGAACGTGTTTACCCACCTCTT – 3') и Dro-Suz S390 (5' – GGTATTCGGTCTAATGTAATACCC – 3') – апробировали с реагентами отечественного производства [8]. Авторами были предложены состав реакционной смеси и условия амплификации (табл. 1). Данных о том, что указанная пара праймеров была применена в России ранее, не найдено.

Все праймеры разработаны для классической ПЦР, в связи с чем визуализацию продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 1,5%-м агарозном геле. При получении положительного результата на электрофореграмме все анализируемые образцы проходили подготовку проб к анализу методом секвенирования.

Для очистки продуктов ПЦР применяли набор реагентов GeneJET Purification PCR product

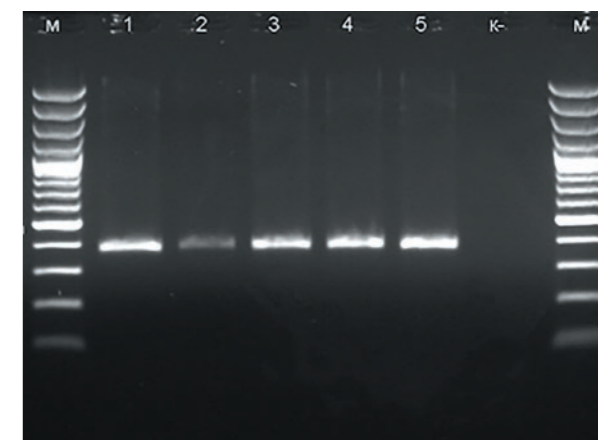


Рис. 1. Электрофореграмма с праймерами S1859/A2191: 1 – *Drosophila suzukii*, 2 – *Drosophila simulans*, 3 – *Drosophila melanogaster*, 4 – *Zaprionus tuberculatus*, 5 – *Zaprionus indianus*, К – отрицательный контроль

The use of the molecular method will make it possible to identify *Drosophila suzukii* with an accuracy of 99–100% at preimaginal stages of development within 2–3 days, depending on the number of larvae or puparia samples submitted for analysis.

#### MATERIALS AND METHODS

Before the study began, the biological material was stored at 70% ethanol, before DNA extraction it was dried until the alcohol was completely evaporated.

DNA was extracted from test material (puparia and larvae at various stages of development) by treating samples with K proteinase followed by protein removal without extraction with organic solvents, and the “DNA Extran-2” kit, kit № NG-511-100 (ZAO “Sintol”, Russian Federation) were used according to the manufacturer’s instructions.

After DNA extraction, its concentration was measured on the NanoDrop-2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Stf., USA). The recommended DNA concentration for quality PCR products should be in the range of 2–130 ng/μL. If necessary, total DNA was diluted to 50–100 ng/μL.

For the first stage of analysis, the previously presented primers [5] were used: S1859 (5' – GGAACIGGATGAAC (A/T) GTTTA (C/T) CCICC – 3') and A2191 (5' – CCCGGTAAATATAAACTTC – 3'). Optimized conditions for PCR were used in work PCR conditions were optimized by Kamaev et al., 2015 [2].

The amplification of the DNA fragment was also performed with primers LCO1490 (5' – GGTCACAATCATAAAGATATTGG – 3') and HCO2198 (5' – TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA – 3').

Species-specific primers for spotted-wing drosophila – Dro-Suz A390 (5' – TTGAACGTGTTTACCCACCTCTT – 3') and Dro-Suz S390 (5' – GGTATTCGGTCTAATGTAATACCC – 3') – were tested with reagents of domestic production [8]. The authors proposed the

<sup>1</sup> Русскоязычное название отсутствует.



**Таблица 1**  
**Состав реакционной смеси для праймеров Dro-Suz A390/Dro-Suz S390 и температурно-временной режим ПЦР**

Реагенты	Объем компонента на 1 образец, мкл
Forward primer: Dro-Suz A390	0,5
Reverse primer: Dro-Suz S390	0,5
ScreenMix-HS 5X	5
H <sub>2</sub> O	17
ДНК	2
Объем	25
<b>Условия ПЦР:</b>	
Денатурация при 95 °C в течение 90 сек	
Далее 35 циклов:	
денатурация	15 сек при 95 °C
отжиг праймеров	30 сек при 58 °C
элонгация	30 сек при 72 °C
Последний этап: финальная элонгация при 72 °C в течение 5 мин	

Kit (Thermo Fisher Stf., США). К каждому продукту ПЦР добавляли 1:1 объем буфера для связывания в готовую смесь для ПЦР (например, на каждые 100 мкл реакционной смеси добавляли 100 мкл буфера для связывания). Тщательно перемешивали. Переносили раствор в очистительную колонку, затем центрифугировали в течение 30–60 с. После этого в колонку очистки добавляли 700 мкл промычного буфера, центрифугировали в течение 30–60 с, потом выбрасывали проточную часть и помещали колонку очистки обратно в пробирку для сбора. Далее центрифугировали пустую очищающую колонку в течение дополнительной 1 мин, после чего переносили очищающую колонку в чистую 1,5-миллилитровую микроцентрифугированную пробирку. Для элюции добавляли 50 мкл буфера в центр мембраны и центрифугировали в течение 1 мин.

Секвенирование проводили на генетическом анализаторе AB-3500 (Applied Biosystems, США/Япония) с использованием оптимизированного протокола [1].

Полученные участки гена COI анализировали, выравнивали и редактировали с помощью редактора BioEdit v.7.0.5.3. Сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с последовательностями Международной базы данных National Center for Biotechnology Information Search database (NCBI) [4].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ**

В процессе проведенной работы проанализирован материал, полученный за 2018–2019 гг. лабораторией энтомологии Испытательного лабораторного

составления смеси для ПЦР (таблица 1). Не найдены данные на использование этой пары праймеров в России.

Все праймеры разработаны для конвенционального ПЦР, в этом случае визуализация продуктов была проведена методом горизонтальной электрофореза на 1.5% агарозном геле. Если был получен положительный результат, то все образцы были готовы к анализу.

Для очистки ПЦР-продукта был использован набор реагентов GeneJET Purification PCR product kit (Thermo Fisher Stf., USA). Для каждого ПЦР-продукта добавляли 1:1 объем буфера для связывания в готовую смесь для ПЦР (например, на каждые 100 мкл реакционной смеси добавляли 100 мкл буфера для связывания). Тщательно перемешивали. Переносили раствор в очистительную колонку, затем центрифугировали в течение 30–60 с. После этого в колонку очистки добавляли 700 мкл промычного буфера, центрифугировали в течение 30–60 с, потом выбрасывали проточную часть и помещали колонку очистки обратно в пробирку для сбора. Далее центрифугировали пустую очищающую колонку в течение дополнительной 1 мин, после чего переносили очищающую колонку в чистую 1,5-миллилитровую микроцентрифугированную пробирку. Для элюции добавляли 50 мкл буфера в центр мембраны и центрифугировали в течение 1 мин.

Секвенирование проводили на генетическом анализаторе AB-3500 (Applied Biosystems, USA/Япония) с использованием оптимизированного протокола [1].

Полученные фрагменты гена COI анализировали, выравнивали и редактировали с помощью редактора BioEdit v.7.0.5.3. Сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с последовательностями Международной базы данных National Center for Biotechnology Information Search database (NCBI) [4].

**Table 1**  
**Composition of reaction mixture for Dro-Suz A390/Dro-Suz S390 primers and temperature-time regime of PCR**

Reagents	Component volume per 1 sample, µl
Forward primer: Dro-Suz A390	0.5
Reverse primer: Dro-Suz S390	0.5
ScreenMix-HS 5X	5
H <sub>2</sub> O	17
DNA	2
Volume	25
<b>PCR conditions</b>	
Denaturation at 95 °C for 90 sec	
Next 35 cycles:	
Denaturation	15 sec at 95 °C
annealing of primer	30 sec at 58 °C
elongation	30 sec at 72 °C
Last stage: final elongation at 72 °C for 5 min	

**Таблица 2**  
**Результаты секвенирования участка гена COI**

№ п/п	Идентифицированный вид	Покрытие	Идентичность
1	<i>Drosophila suzukii</i> , ID-код N868747.1, страна Португалия	100%	99,57%
	<i>Drosophila suzukii</i> , ID-код МК435599, страна Турция	100%	99,58%
2	<i>Drosophila simulans</i> , ID-код МК251433, страна Южная Африка	100%	99,66%
	<i>Drosophila simulans</i> , ID-код КJ671606, страна Новая Зеландия	100%	99,66%
3	<i>Drosophila melanogaster</i> , ID-код КJ463787, страна США	100%	100%
	<i>Drosophila melanogaster</i> , ID-код МК251427, страна Южная Африка	100%	100%
4	<i>Zaprionus tuberculatus</i> , ID-код МК509763, страна Турция	100%	99,62%
	<i>Zaprionus tuberculatus</i> , ID-код МК509764, страна Турция	100%	99,65%
5	<i>Zaprionus indianus</i> , ID-код EF632362, страна Египет	99%	99,87%
	<i>Zaprionus indianus</i> , ID-код MN824026, страна Иран	99%	99,98%

центра ФГБУ «ВНИИКР» (около 200 образцов пупариев и личинок), с помощью 2 участков гена (COI) цитохром С-оксидазы. Апробированы видоспецифичные праймеры для диагностики *Drosophila suzukii*.

Получены последовательности участка гена COI для дальнейшего подбора видоспецифичных праймеров для полноценного подтверждения лабораторных исследований без применения метода секвенирования. Это позволит ускорить время анализа плодовоовощной продукции при выявлении преимагинальных стадий развития карантинных видов плодовых мушек семейства Drosophilidae.

Результаты электрофореза, представленные на рисунке 1, показали, что праймерная система S1859/A2191 амплифицировала продукты ПЦР одного размера – 385 пар оснований (п. о.).

**Table 2**  
**Results of COI gene's fragment sequencing**

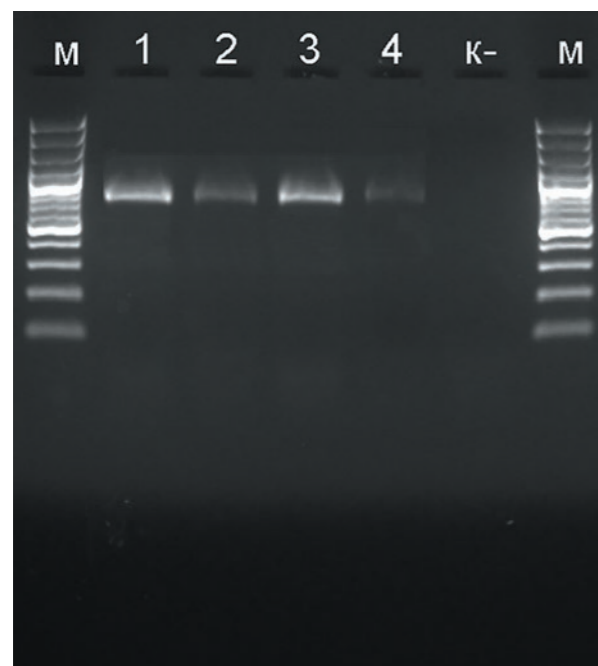
№	Identified species	Coverage	Identity
1	<i>Drosophila suzukii</i> , ID code N868747.1, Portugal	100%	99.57%
	<i>Drosophila suzukii</i> , ID code МК435599, Turkey	100%	99.58%
2	<i>Drosophila simulans</i> , ID code МК251433, South Africa	100%	99.66%
	<i>Drosophila simulans</i> , ID code КJ671606, New Zealand	100%	99.66%
3	<i>Drosophila melanogaster</i> , ID code КJ463787, USA	100%	100%
	<i>Drosophila melanogaster</i> , ID code МК251427, South Africa	100%	100%
4	<i>Zaprionus tuberculatus</i> , ID code МК509763, Turkey	100%	99.62%
	<i>Zaprionus tuberculatus</i> , ID code МК509764, Turkey	100%	99.65%
5	<i>Zaprionus indianus</i> , ID code EF632362, Egypt	99%	99.87%
	<i>Zaprionus indianus</i> , ID code MN824026, Iran	99%	99.98%

performed with the sequences of International database of the National Center for Biotechnology Information Search database (NCBI) [4].

**RESULTS AND DISCUSSIONS**

In the course of the work, the material obtained in 2018–2019 by the Entomology Laboratory of the Laboratory Testing Center of FGBU “VNIIKR”, for 2 fragments of the gene of cytochrome C-oxidase (COI) was analyzed, and primers for species identification of *Drosophila suzukii* were tested.

Sequences of the fragment of the COI gene were obtained for further selection of species-specific primers for full laboratory validation without sequencing. This will allow to speed up fruit and vegetable product analysis when identifying the preimaginal developmental stages of the quarantine species of the fruit flies of Drosophilidae family.



**Рис. 2. Электрофореграмма с праймерами HCO2198/LCO1490:**  
 1 – *Drosophila suzukii*,  
 2 – *Zaprionus indianus*,  
 3 – *Drosophila simulans*,  
 4 – *Drosophila melanogaster*,  
 K – отрицательный контроль

**Fig. 2. Electrophoregram with primers HCO2198/LCO1490:**  
 1 – *Drosophila suzukii*,  
 2 – *Zaprionus indianus*,  
 3 – *Drosophila simulans*,  
 4 – *Drosophila melanogaster*,  
 K – negative control

Отрицательный контроль показал отсутствие контаминации между образцами разных видов плодовых мушек при выделении ДНК из них. Положительный контроль в исследовании не предполагался, так как выделение ДНК осуществляли из проб макрообъекта. Результаты генетического анализа последовательностей представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 видно, что представленные образцы разного географического происхождения идентичны последовательностям базы NCBI от 99,57% до 100% с покрытием от 99% до 100%. Полученные данные могут быть использованы для дальнейшего анализа целевого участка ДНК плодовых мушек при подборе видоспецифичных тестов.

Результаты ПЦР с праймерами HCO2198/LCO1490 представлены на рисунке 2. Отмечено, что все целевые образцы сработали положительно с образованием продукта ПЦР размером около 800 п. о. Точный размер продуктов ПЦР из-за размерного ряда маркера молекулярного веса установить не представлялось возможным, и это не влияло на результат исследования. Результаты анализа последовательностей представлены на рисунке 2.

Результат генетического анализа представлен в таблице 3 при соответствии порядкового номера с электрофореграммой амплификации (рис. 2).

Из таблицы 3 видно, что полученные последовательности соответствуют данным NCBI при анализе образцов разного географического происхождения при идентичности и покрытии от 99,81% до 100% и от 99% до 100% соответственно. На основе нуклеотидных последовательностей, представленных выше, а также не вошедших в полное описание результатов анализа коллекции образцов

The results of electrophoresis, which are presented in Fig. 1, showed that the primer system S1859/A2191 amplified PCR products of the same size – 385 base pairs (b. p.).

Negative control showed no contamination between samples of different species of fruit flies during DNA extraction. No positive control was used in the study since DNA was extracted from macro-object samples. The results of genetic analysis of the sequences are presented in Table 2.

Table 2 shows that the presented samples of different geographical origin are identical to the NCBI base sequences from 99.57% to 100% with coverage from 99% to 100%. The data obtained can be used for further analysis of the target fragment of fruit fly DNA in the selection of species-specific tests.

The results of PCR with HCO2198/LCO1490 primers are shown in Figure 2. It is noted that all target samples have worked positively with formation of PCR product of about 800 b. p. It was not possible to specify the exact size of the PCR products due to the range size of the molecular weight marker, which did not affect the result of the study. The results of sequence analysis are presented in Figure 2.



**Рис. 3. Электрофореграмма с праймерами Dro-Suz A390/Dro-Suz S390:**  
 1 – *Drosophila suzukii*,  
 2 – *Drosophila simulans*,  
 3 – *Drosophila melanogaster*,  
 K – отрицательный контроль

**Fig. 3. Electrophoregram with primers Dro-Suz A390/Dro-Suz S390:**  
 1 – *Drosophila suzukii*,  
 2 – *Drosophila simulans*,  
 3 – *Drosophila melanogaster*,  
 K – negative control

**Таблица 3**  
**Результаты анализа с праймерами HCO2198/LCO1490**

№ п/п	Результат исследования	Покрытие	Идентичность
1	<i>Drosophila suzukii</i> , ID-код МК435596, страна Турция	100%	100%
	<i>Drosophila suzukii</i> , ID-код MG605095, страна Швейцария	100%	100%
2	<i>Zaprionus indianus</i> , ID-код EF632367, страна Индия	99%	99,81%
	<i>Zaprionus indianus</i> , ID-код KF736189, страна Индия	99%	99,81%
3	<i>Drosophila simulans</i> , ID-код МК801758, страна Турция	100%	100%
	<i>Drosophila simulans</i> , ID-код KX161438, страна Испания	100%	100%
4	<i>Drosophila melanogaster</i> , ID-код МК236169, страна Китай	100%	100%
	<i>Drosophila melanogaster</i> , ID-код МК236173, страна Китай	100%	100%

лаборатории будет выполнен подбор видоспецифичных праймеров не только для проведения идентификации методом классической ПЦР, но также с подбором зондов для ПЦР в режиме реального времени.

Результаты исследования с праймерной системой Dro-Suz A390/Dro-Suz S390, предполагаемой для видовой идентификации, на первом этапе исследования получили достаточно информативные.

На электрофореграмме (рис. 3) видно, что праймеры позволили получить продукт ПЦР только для *Drosophila suzukii*, в то время как ДНК *Drosophila simulans* и *Drosophila melanogaster* оказались неспецифичны для целевого участка, на который подобрана система праймеров Dro-Suz A390/Dro-Suz S390. Установлено, что вышеуказанная система может использоваться в качестве видоспецифичного теста для выявления азиатской ягодной дрозофилы среди видов мушек, встречающихся в характерной для нее продукции. Необходимы дальнейшие апробация и валидация для

Table 3 shows the result of genetic analysis; the order number corresponds with the amplification electrophoregram (Fig. 2).

The table 3 shows that the obtained sequences correspond to NCBI data while analyzing samples of different geographical origin with an identity and coverage from 99.81% to 100% and from 99% to 100% respectively. On the basis of the nucleotide sequences presented above, as well as those not included in the full description of the results of the analysis of the collection of samples, the selection of species-specific primers will be made not only for identification by conventional PCR, but also with the selection of probes for Real Time PCR.

The results obtained at the first stage of the research using Dro-Suz A390/Dro-Suz S390 primer system for species identification were quite informative.

The electrophoregram (Fig. 3) shows that the primers allowed to obtain PCR product only for *Drosophila suzukii*, while DNAs of *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster* were not specific for the target fragment, for which the Dro-Suz A390/Dro-Suz S390 primer system was selected. It was found that

**Table 3**  
**Results of analysis with primers HCO2198/LCO1490**

№	Result of research	Coverage	Identity
1	<i>Drosophila suzukii</i> , ID code МК435596, Turkey	100%	100%
	<i>Drosophila suzukii</i> , ID code MG605095, Switzerland	100%	100%
2	<i>Zaprionus indianus</i> , ID code EF632367, India	99%	99.81%
	<i>Zaprionus indianus</i> , ID code KF736189, India	99%	99.81%
3	<i>Drosophila simulans</i> , ID code МК801758, Turkey	100%	100%
	<i>Drosophila simulans</i> , ID code KX161438, Spain	100%	100%
4	<i>Drosophila melanogaster</i> , ID code МК236169, China	100%	100%
	<i>Drosophila melanogaster</i> , ID code МК236173, China	100%	100%



определения перекрестных реакций с другими видами семейства Drosophilidae.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Белкин Д.Л., Бондаренко Г.Н., Яремко А.Б., Уварова Д.А. Метод секвенирования в видовой идентификации карантинных вредных организмов // Карантин растений. Наука и практика. – 2019. – № 2 (28). – С. 31–37.
2. Камаев И.О., Мазурин Е.С., Шипулин А.В. Непарный шелкопряд (*Lymantria dispar*): выделение внутривидовых комплексов и молекулярно-генетические подходы к идентификации азиатского подвида // Карантин растений. Наука и практика. – 2015. – № 1 (11). – С. 45–58.
3. Нестеренкова А.Э. Методические рекомендации по выявлению и идентификации азиатской плодовой мушки *Drosophila suzukii* Mats. – М.: ФГБУ «ВНИИКР», 2012. – 36 с.
4. Basic local alignment search tool / NCBI. – URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения: 28.05.2020).
5. Bogdanowicz S.M., Schaefer P.W., Harrison R.G. Mitochondrial DNA variation among worldwide populations of gypsy moths, *Lymantria dispar* // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2000. – Vol. 15, No. 3. – P. 487–495.
6. Kanzawa T. Studies on *Drosophila suzukii* Mats. Kofu, Yamanashi agricultural experiment station. 49 p. // Abstract in Review of Applied Entomology. – 1939. – Vol. 29. – P. 622.
7. Murphy K.A., Unruh T.R., Zhou L.M., Zalom F.G., Shearer P.W., Beers E.H., ... & Chiu J.C. Using comparative genomics to develop a molecular diagnostic for the identification of an emerging pest *Drosophila suzukii* // Bulletin of entomological research. – 2015. – Vol. 105, No. 3. – P. 364–372.
8. Wolf S., Zeisler C., Sint D., Romeis J., Trau-gott M., Collatz J. A simple and cost-effective molecular method to track predation on *Drosophila suzukii* in the field // Journal of Pest Science. – 2018. – Vol. 91, No. 2. – P. 927–935.

the above-mentioned system could be used as a species-specific test to identify spotted-wing drosophila among the species of flies found in its host products. Further approbation and validation for possible cross-reactions with other species of Drosophilidae family is required.

**REFERENCES**

1. Belkin D.L., Bondarenko G.N., Yaremko A.B., Uvarova D.A. Sequencing method in identification of species of quarantine pests. *Plant Health. Research and Practice*. 2019; 2 (28): 31–37.
2. Kamayev I.O., Mazurin E.S., Shipulin A.V. Distinguishing between the Gypsy moth (*Lymantria dispar*) intraspecific groups and molecular genetic approaches to the identification of Asian subspecies. *Plant Health. Research and Practice*. 2015; 1 (11): 45–58.
3. Nesterenkova A.E. Methodical recommendations for detection and identification of spotted-wing drosophila *Drosophila suzukii* Mats. [Metodicheskie rekomendacii po vyivleniiu i identifikacii aziatskoj plodovoj mushki *Drosophila suzukii* Mats.]. М.: FGBU “VNIKR”, 2012. 36 p. (in Russian).
4. Basic local alignment search tool. NCBI. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed date: 28.05.2020).
5. Bogdanowicz S.M., Schaefer P.W., Harrison R.G. Mitochondrial DNA variation among worldwide populations of gypsy moths, *Lymantria dispar*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2000; 15 (3): 487–495.
6. Kanzawa T. Studies on *Drosophila suzukii* Mats. Kofu, Yamanashi agricultural experiment station. 49 p. Abstract in *Review of Applied Entomology*. 1939; 29: 622.
7. Murphy K.A., Unruh T.R., Zhou L.M., Zalom F.G., Shearer P.W., Beers E.H., ... & Chiu J.C. Using comparative genomics to develop a molecular diagnostic for the identification of an emerging pest *Drosophila suzukii*. *Bulletin of entomological research*. 2015; 105 (3): 364–372.
8. Wolf S., Zeisler C., Sint D., Romeis J., Trau-gott M., Collatz J. A simple and cost-effective molecular method to track predation on *Drosophila suzukii* in the field. *Journal of Pest Science*. 2018; 91 (2): 927–935.

УДК 632.9

## Анализ экологического риска *Torymus sinensis* – специализированного паразитоида восточной каштановой орехотворки *Dryocosmus kuriphilus*

Ю.И. ГНИНЕНКО, к. б. н., заведующий лабораторией защиты леса от инвазивных и карантинных организмов ФБУ «ВНИИЛМ» (Всероссийский научно-исследовательский институт лесоводства и механизации лесного хозяйства), e-mail: [gninenko-yuri@mail.ru](mailto:gninenko-yuri@mail.ru)

**Аннотация.** Восточная каштановая орехотворка после первого появления в России довольно быстро заняла все места произрастания каштана посевного и стала вредить. Местные энтомофаги не могут эффективно регулировать ее численность, поэтому интродукция ее специализированного паразитоида *Torymus sinensis*, основанная на опыте многих стран, является единственной возможностью быстро снизить численность вредителя и предотвратить дальнейшее ухудшение состояния каштана. Проведен анализ экологического риска завоза нового энтомофага и показано, что его интродукция не имеет сколько-нибудь заметных рисков для естественных лесных сообществ.

**Ключевые слова.** Восточная каштановая орехотворка, торимус, анализ экологического риска.

UDC 632.9

## Environmental risk assessment of *Torymus sinensis*, a specialized parasitoid of the oriental chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus*

YU.I. GNINENKO, PhD in Biology, Head of the Laboratory of Forest Protection against Invasive and Quarantine Organisms FBU “VNIILM” (All-Russian Research Institute for Silviculture and Mechanization of Forestry), e-mail: [gninenko-yuri@mail.ru](mailto:gninenko-yuri@mail.ru)

**Abstract.** After the introduction into Russia, the oriental chestnut gall wasp has spread in all growing areas of sweet chestnut and started to cause damage. Local entomophages are unable to regulate its numbers effectively, so the introduction of its specialized parasitoid *Torymus sinensis*, based on the experience of many countries, is the only way to quickly reduce the number of pests and prevent further deterioration of chestnut. The environmental risk assessment of the new entomophage has been carried out and its introduction has been shown not to have notable risks for natural forest communities.

**Keywords.** Oriental chestnut gall wasp, *Torymus sinensis*, environmental risk assessment.



**ВВЕДЕНИЕ**

Восточная каштановая орехотворка *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu, 1951 (Hymenoptera, Cynipidae) проникла на территорию России в районе г. Сочи и впервые была выявлена на каштане посевном в Сочинском национальном парке (СНП) в 2016 г. [2, 6]. Попав на особо охраняемую природную территорию (ООПТ), каковой является СНП, этот инвайдер фактически сам оказался под охраной статуса национального парка.

В результате сложившейся ситуации принять действенные меры по защите каштана от серьезной опасности, которую представляет орехотворка,

**INTRODUCTION**

The oriental chestnut gall wasp *Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu, 1951 (Hymenoptera, Cynipidae) was introduced in the territory of Russia near the city of Sochi and was first detected on the sweet chestnut in Sochi National Park (SNP) in 2016 [2, 6]. Having entered the specially protected natural area (SPNA), which is the SNP, this invader actually found himself under protection of the status of the national park.