



Нематоды рода
Globodera

17

Диагностика
фитоплазм из группы
Apple proliferation

26

Определение черной
бактериальной
пятнистости томата

37

Методика
ламинирования
гербария

58

ФИТОСАНИТАРИЯ. КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

PLANT HEALTH AND QUARANTINE

Свидетельство
о регистрации СМИ ПИ
№ ФС 77-76606
ISSN: 2782-327X

Русско-английский научный журнал

Август № 3 (11) 2022

СТАТЬЯ НОМЕРА:

Красный пальмовый
клещ *Raoiella indica* 2

Цикадовые (Auchenorrhyncha)
в ампелоценозах Крыма 45

Как защитить розы
в Абхазии 53



Редакционная коллегия Editorial board

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР:

Е.И. НАЗИН, директор ФГБУ «ВНИИКР»

ШЕФ-РЕДАКТОР:

В.В. ОЛЕШКЕВИЧ, кандидат филологических наук

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ ЖУРНАЛА

Ю.А. ШВАБАУСКЕНЕ – заместитель Руководителя Россельхознадзора

Н.Н. СОЛОВЬЕВА – начальник Управления фитосанитарного надзора при экспортно-импортных операциях и международного сотрудничества Россельхознадзора, кандидат биологических наук

А.Д. ОРЛИНСКИЙ – научный советник ЕОКЗР, доктор биологических наук

А.С. ШАМИЛОВ – эксперт ФАО по сельскому хозяйству, заместитель начальника группы по разработке стандартов Секретариата МККЗР, кандидат биологических наук

А.В. КОЧЕТОВ – директор ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», член-корреспондент РАН, профессор РАН, доктор биологических наук

М.Т. УПАДЫШЕВ – заведующий отделом биотехнологии и защиты растений ФГБНУ «ВСТИСП», член-корреспондент РАН, профессор РАН, доктор сельскохозяйственных наук

М.В. ПРИДАННИКОВ – заместитель директора Центра паразитологии при ИПЭЭ РАН им. А.Н. Северцова, кандидат биологических наук

Н.В. АЛЕЙНИКОВА – заместитель директора по научно-организационной работе ФГБНУ «Магарах» РАН, доктор сельскохозяйственных наук

А.В. ХЮТТИ – заведующий сектором «Грибных, вирусных, микоплазменных и нематодных болезней картофеля и овощных культур» ФГБНУ «ВНИИЗР», кандидат биологических наук

И.Т. БАЛАШОВА – главный научный сотрудник лаборатории новых технологий ФГБНУ «Федеральный научный центр овощеводства», доктор биологических наук

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

А.И. УСКОВ – заведующий отделом биотехнологии и иммунодиагностики ФГБНУ ВНИИХ им. А.Г. Лорха, доктор сельскохозяйственных наук

М.М. АБАСОВ – начальник Центра развития и внедрения инновационных методов защиты растений ФГБУ «ВНИИКР», доктор биологических наук

К.П. КОРНЕВ – заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР», кандидат биологических наук

О.Б. ДОБРОВОЛЬСКАЯ – заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР», доктор биологических наук

Ю.А. ШНЕЙДЕР – начальник научно-методического и экспериментального центра ФГБУ «ВНИИКР», кандидат биологических наук

С.Г. ЗИНОВЬЕВА – специалист по связям с общественностью редакционно-издательского отдела ФГБУ «ВНИИКР»

РЕДАКЦИЯ

В.В. ЧЕРЕПАНОВА – редактор-корректор

Г.Н. БОНДАРЕНКО – начальник ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», кандидат биологических наук

Е.М. ВОЛКОВА – заведующая лабораторией сорных растений ФГБУ «ВНИИКР», кандидат биологических наук

О.Г. ВОЛКОВ – начальник отдела биометода ФГБУ «ВНИИКР»

Е.В. КАРИМОВА – начальник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», кандидат биологических наук

О.А. КУЛИНИЧ – начальник отдела лесного карантина ФГБУ «ВНИИКР», доктор биологических наук

М.Б. КОПИНА – начальник научно-методического отдела микологии и гельминтологии ФГБУ «ВНИИКР», кандидат сельскохозяйственных наук

С.А. КУРБАТОВ – начальник научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР», кандидат биологических наук

С.В. СУДАРИКОВА – старший научный сотрудник лаборатории гельминтологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР»

В.С. КУЧЕРЯВЫХ – переводчик, кандидат филологических наук

CHIEF EDITOR:

E.I. NAZIN, Director of FGBU “VNIICR”

MANAGING EDITOR:

V.V. OLESHKEVICH, PhD in Philology

EDITORIAL BOARD

YU.A. SHVABAUSKENE – Deputy Head of Rosselkhoznadzor

N.N. SOLOVYOVA – Head of the Department of Phytosanitary Surveillance for Export-Import Operations and International Cooperation of Rosselkhoznadzor, PhD in Biology

A.D. ORLINSKI – EPPO Scientific Advisor, Doctor of Advanced Studies in Biological Sciences

A.S. SHAMILOV – FAO Agricultural Officer, Deputy Head of the Standards Setting Unit of IPPC Secretariat, PhD in Biology

A.V. KOCHETOV – Director of FGBNU “Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS”, Corresponding Member of the RAS, Professor of the RAS, Doctor of Advanced Studies in Biological Sciences

M.T. UPADYSHEV – Head of the Biotechnology and Plant Protection Department of FGBNU “All-Russian Horticultural Institute for Breeding, Agrotechnology and Nursery”, Corresponding Member of the RAS, Professor of the RAS, Doctor of Advanced Studies in Agricultural Sciences

M.V. PRIDANNIKOV – Deputy Director of the Center of Parasitology of A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution, RAS, PhD in Biology

N.V. ALEINIKOVA – Deputy Director for Scientific and Organizational Work of the FGBNU “Magarach” of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Advanced Studies in Agricultural Sciences

A.V. KHIUTTI – Head of the Group for Potato and Vegetable Crop Fungal, Viral, Mycoplasma and Nematode Diseases of FGBNU “VNIIZR”, PhD in Biology

I.T. BALASHOVA – Chief Researcher of the Laboratory of New Technologies of FGBNU “Federal Scientific Center of Vegetable Growing”, Doctor of Advanced Studies in Biological Sciences

F.S. DZHALILOV – Head of the Plant Protection Laboratory of the RSAU – MAA n. a. K.A. Timiryazev, Professor, Doctor of Advanced Studies in Biological Sciences

A.I. USKOV – Head of the Biotechnology and Immunodiagnostics Department of FGBNU “Lorch Potato Research Institute”, Doctor of Advanced Studies in Agricultural Sciences

M.M. ABASOV – Head of the Center for Development and Implementation of Innovative Methods of Plant Protection of FGBU “VNIICR”, Doctor of Advanced Studies in Biological Sciences

K.P. KORNEV – Deputy Director of FGBU “VNIICR”, PhD in Biology

O.B. DOBROVOLSKAYA – Deputy Director, FGBU “VNIICR”, Doctor of Biology

YU.A. SHNEYDER – Head of Research and Methodology and Experimental Center, FGBU “VNIICR”, PhD in Biology

S.G. ZINOVYEVA – PR specialist, Editorial and Publishing Department, FGBU “VNIICR”

EDITORSHIP

V.V. CHEREPANOVA – Copy Editor

G.N. BONDARENKO – Head of the Testing Laboratory Center of FGBU “VNIICR”, PhD in Biology

E.M. VOLKOVA – Head of the Laboratory of Weed Plants of FGBU “VNIICR”, PhD in Biology

O.G. VOLKOV – Head of the Biomethod Department of FGBU “VNIICR”

E.V. KARIMOVA – Head of the Scientific and Methodological Department of Virology and Bacteriology of the FGBU “VNIICR”, PhD in Biology

O.A. KULINICH – Head of the Forest Quarantine Department of FGBU “VNIICR”, Doctor of Advanced Studies in Biological Sciences

M.B. KOPINA – Head of the Research and Methodology Department for Mycology and Helminthology, PhD in Agriculture

S.A. KURBATOV – Head of the Entomological Research and Methodology Department of FGBU “VNIICR”, PhD in Biology

S.V. SUDARIKOVA – Senior Researcher of the Helminthology Laboratory of the Testing Laboratory Center of FGBU “VNIICR”

V.S. KUCHERYAVYKH – Translator, PhD in Philology

Содержание | Content

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Морфологическая идентификация красного пальмового клеща *Raoiella indica* Hirst, 1924 (Acari: Tenuipalpidae)

И.О. КАМАЕВ

IDENTIFICATION

Morphological identification of the red palm mite *Raoiella indica* Hirst, 1924 (Acari: Tenuipalpidae)

I.O. KAMAYEV

2

ДИАГНОСТИКА

К диагностике нематод рода *Globodera*, связанных с подкарантинной продукцией

Е.А. ХУДЯКОВА, С.В. СУДАРИКОВА

On diagnosis of *Globodera* genus nematodes connected with regulated products

E.A. KHUDYAKOVA, S.V. SUDARIKOVA

17

Исследование праймеров для диагностики фитоплазм из группы *Apple proliferation*

И.Г. БАШКИРОВА, Е.В. КАРИМОВА,
И.П. СМЕРНОВА

Study of primers for the diagnosis of phytoplasmas from the *Apple proliferation* group

I.G. BASHKIROVA, E.V. KARIMOVA,
I.P. SMIRNOVA

26

Испытание тест-системы для диагностики *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*

И.Н. ПИСАРЕВА, А.Б. ЯРЕМКО,
С.И. ПРИХОДЬКО, Е.Ю. ШНЕЙДЕР

Testing a test system for the diagnosis of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*

I.N. PISAREVA, A.B. YAREMKO,
S.I. PRIKHODKO, E.YU. SHNEYDER

37

МОНИТОРИНГ

Изучение видового состава цикадовых (*Auchenorrhyncha*) в ампелоценозах Республики Крым

Б.Б. ХАМАЕВА, Г.Н. БОНДАРЕНКО,
Я.Э. РАДИОНОВСКАЯ

Study of the species composition of *Auchenorrhyncha* in ampelocenoses of the Republic of Crimea

B.B. KHAMAEVA, G.N. BONDARENKO,
YA.E. RADIONOVSKAYA

45

НАУКА И ПРАКТИКА

Основные грибные болезни роз в Абхазии и защитные мероприятия

М.Ш. ШИНКУБА, Х.К. ВАРДАНИЯ

The main fungal diseases of roses in Abkhazia and protective measures

M.SH. SHINKUBA, H.K. VARDANIYA

53

Методика ламинирования гербария: наш опыт изготовления демонстрационных гербариев карантинных сорных растений

Н.В. ЦИНКЕВИЧ

Herbarium lamination technique: our experience in manufacturing demonstration herbariums of quarantine weeds

N.V. TSINKEVICH

58

Журнал «Фитосанитария. Карантин растений» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор), свидетельство о регистрации ПИ № ФС 77-76606 от 15 августа 2019 года
Фото на обложке: Самец красного пальмового клеща *Raoiella indica* (автор фото: И.О. Камаев)
Дизайн и верстка: Мария Бондарь
Учредитель: ФГБУ «ВНИИКР», 140150, Московская область, г. Раменское, р. п. Быково, ул. Пограничная, д. 32

Издатель: ООО «Вейнард»
Телефон редакции: 8 (495) 925-06-34
Электронная почта: veinardltd@gmail.com
Индексы издания для подписки в каталогах:
АО «Агентство «Роспечать» – 81075
ООО «Агентство Книга-Сервис» – 33095
Отпечатано в типографии
ООО «Полиграфический комплекс»
123298, г. Москва, ул. 3-я Хорошевская, дом 18, корпус 1
Тираж 3000 экз.
Подписано в печать: 19.08.2022
Дата выхода в свет: 06.09.2022

The Journal "Plant Health and Quarantine" is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor), Registration Certificate No. FS 77-76606, August 15, 2019
Photo on the cover: Male red palm mite *Raoiella indica* (photo: I.O. Kamayev)
Design & Composition: Mariya Bondar
Establisher: FGBU VNIICR, 140150, Moskovskaya oblast, Ramenskoye, r. p. Bykovo, Pogranichnaya ulitsa, 32

Publisher: ООО "Veynard"
Editorial Board Office:
Tel: +7 (495) 925-06-34
E-mail: veinardltd@gmail.com
Subscription indexes:
АО Агентство "Rospechat" – 81075
ООО Агентство "Kniga-Servis" – 33095
Printing house:
ООО "Poligrafichesky kompleks", 123298, ul. 3-ya Khoroshevskaya, 18, build. 1
Circulation: 3000 copies
Approved for print: 19/08/2022
Issue date: 06/09/2022

Морфологическая идентификация красного пальмового клеща *Raoiella indica* Hirst, 1924 (Acari: Tenuipalpidae)

И.О. КАМАЕВ

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»
(ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское,
Московская обл., Россия
ORCID 0000-0003-4251-4862,
e-mail: ilyakamayev@yandex.ru

АННОТАЦИЯ

Настоящая работа посвящена идентификации красного пальмового клеща *Raoiella indica*, относящегося к семейству клещей-плоскотелок (Acari: Tetranychidae: Tenuipalpidae). Этот вид клеща является активным инвайдером, повреждающим тропические и субтропические культуры растений. Предполагается, что потенциальным ареалом вида в случае его инвазии в Россию будет являться территория Южного федерального округа. В статье приведена развернутая морфологическая характеристика клещей семейства Tenuipalpidae, учитывающая общепринятые обозначения хеатома тела и конечностей, с кратким рассмотрением различий в терминологии относительно названия копулятивного органа самца. Для дифференциации важнейших жизненных стадий большинства видов семейства клещей-плоскотелок представлена определительная таблица, так как видовая идентификация проводится только по взрослым особям. В статье приведены признаки строения взрослых особей красного пальмового клеща (самцов и самок), обобщенные данные по распространению, растениям-хозяевам и диагностическим признакам видов рода *Raoiella*. Исследованы диагностические признаки дорсоцентрального хеатома, хеатома каудальной области и конечностей *R. indica* на примере доминиканской популяции. На основе сводки Beard et al. (2018) и с учетом работ Pritchard, Baker (1958) и Митрофанова, Струнковой (1979) составлена упрощенная определительная таблица для дифференциации *R. indica* от остальных видов рода для практики фитосанитарных лабораторий. Данный ключ базируется на следующих диагностических признаках: отношения длин дорсоцентральных щетинок, длин первой пары дорсоцентральных щетинок относительно первого междурядья, форма щетинок h_2 , количество щетинок на колене первой и второй пар ног, отношения длин проксимальных соленидия ω и тактильной щетинки ft на лапках первой пары ног.

Ключевые слова. Вредители растений, клещи-плоскотелки, морфология, идентификация, акарология.

Morphological identification of the red palm mite *Raoiella* *indica* Hirst, 1924 (Acari: Tenuipalpidae)

I.O. KAMAYEV

FGBU "All-Russian Plant Quarantine Center"
(FGBU "VNIIEKR"), Bykovo, Ramenskoye,
Moscow Oblast, Russia
ORCID 0000-0003-4251-4862,
e-mail: ilyakamayev@yandex.ru

ABSTRACT

The present work is dedicated to the identification of the red palm mite *Raoiella indica*, belonging to the family Acari: Tetranychidae: Tenuipalpidae. This mite species is an active invader, damaging tropical and subtropical plant crops. It is assumed that the potential range of the species in case of its invasion to Russia will be the territory of the Southern Federal District. The article provides detailed morphological characteristics of Tenuipalpidae mites, taking into account the generally accepted designations of the chaetome of the body and legs, with a brief consideration of differences in terminology regarding the name of the male copulatory organ. To differentiate the most important life stages of most Tenuipalpidae species, a key table is presented, since species identification is carried out only by adults. The article presents structural features of adult individuals of the red palm mite (males and females), generalized data on spreading, host plants and diagnostic characters of *Raoiella* species. The diagnostic features of the dorsocentral chaetome, the caudal region and legs of *R. indica* were studied on the example of the Dominican population. Based on a monograph by Beard et al. (2018) and taking into account the works of Pritchard, Baker (1958) and Mitrofanov, Strunkova (1979), a simplified key table was compiled for the differentiation of *R. indica* from other species of the genus for the practice of phytosanitary laboratories. This key is based on the following diagnostic characters: the ratio of the lengths of the dorsocentral setae, the lengths of the first pair of dorsocentral setae relative to the first row spacing, the shape of the setae h_2 , the number of setae on the genu of the first and second pairs of legs, the ratio of the lengths of the proximal solenidium ω and tactile seta ft on the first pair of legs.

Key words. Plant pests, Tenuipalpidae, morphology, identification, acarology.



Рис. 1. Хетотаксия дорсальной поверхности самки (a) и самца (b) красного пальмового клеща *Raoiella indica*. На правой половине тела индексами обозначены соответствующие щетинки. У самца эдеагус выделен контрастированием цвета (фото И.О. Камаева)



Fig. 1. Chaetotaxy of the dorsal surface of the female (a) and male (b) of the red palm mite *Raoiella indica*. Corresponding setae are indicated by indexes on the right half of the body. In the male, the aedeagus is highlighted by color contrast (photos by I.O. Kamayev)



Рис. 2. Симптомы, вызванные *R. indica* на фрагменте (сегментах) листа кокосовой пальмы: a – адаксиальная сторона; b – абаксиальная сторона сегмента листа; мелкие красные точки – особи клеща (фото И.О. Камаева)

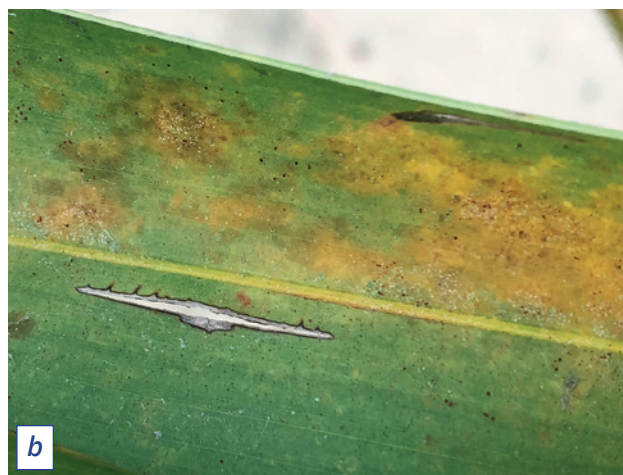


Fig. 2. Symptoms caused by *R. indica* on a fragment (segments) of a coconut palm leaf: a – adaxial side; b – abaxial side of the leaf segment; small red dots – mite individuals (photos by I.O. Kamayev)

ВВЕДЕНИЕ



расный пальмовый клещ *Raoiella indica* Hirst, 1924, относящийся к семейству клещей-плоскотелок (Acari: Tetranychidae: Tenuipalpidae), является значимым вредителем многих тропических и субтропических культур (рис. 1, 2). Этот вид характеризуется высокой инвазионной активностью (Roda et al., 2008; Dowling et al., 2010, 2012), а его ареал в настоящее время можно охарактеризовать как пантропический (CABI, 2022). Предполагается, что в случае вселения данного вида на территорию Российской Федерации наибольший вред будет проявляться прежде всего в Южном федеральном округе. Своевременное выявление этого вредителя на растительной продукции будет служить эффективной фитосанитарной мерой по предотвращению инвазии клеща.

INTRODUCTION

Red palm mite *Raoiella indica* Hirst, 1924, belonging to Acari: Tetranychidae: Tenuipalpidae, is a significant pest of many tropical and subtropical crops (Fig. 1, 2). This species is characterized by high invasive activity (Roda et al., 2008; Dowling et al., 2010, 2012), and its range can currently be described as pantropical (CABI, 2022). It is supposed that if this species is introduced into the territory of the Russian Federation, the greatest harm will be manifested primarily in the Southern Federal District. Timely detection of this pest on plant products will serve as an effective phytosanitary measure to prevent this mite bioinvasion.

Морфология красного пальмового клеща сравнительно хорошо исследована, имеются работы, позволяющие провести идентификацию этого вида, однако они имеют ограничения, которые рассмотрены ниже. На сегодняшний день известны более 20 видов рода *Raoiella* (Beard et al., 2018), тогда как ранее опубликованные сводки охватывали 3 вида данного рода (Pritchard, Baker, 1958*; Митрофанов, Стрункова, 1979) или только *R. indica* в ключах по идентификации Tenuipalpidae отдельных географических регионов (Hatzinikolis, 1987; Ueckermann et al., 2018). При этом предложенный Beard et al. (2018) ключ для идентификации видов рода *Raoiella*, на наш взгляд, представляется достаточно сложным для рутинной фитосанитарной диагностики, так как отражает возможные филогенетические связи между представителями указанного рода.

В настоящей работе предложен упрощенный алгоритм идентификации красного пальмового клеща для практики фитосанитарных лабораторий на основе синтеза предшествующего опыта диагностики данного вида.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал красного пальмового клеща (*R. indica*) – 28 экз. (8 ♂, 19 ♀, 1 нимфа) – был получен в 2019 г. с декоративных посадок *Cocos nucifera* (Monocotyledones: Arecaceae) на территории Доминиканской Республики (окрестности города Пуэрто-Плата); фиксация материала производилась в 70%-м этаноле.

Изготовление микропрепаратов клещей проводилось на базе лаборатории экологии и генетики насекомых и клещей научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР» под стереомикроскопом Zeiss Stemi 2000 с использованием среды Хойера, согласно рецептуре, приведенной Krantz, Walter (2009). На один микропрепарат помещалось несколько особей клещей, затем выдерживали при 70–75 °C на термостоліке (микротермостат «БИС-Н») в течение 3 часов.

Микроскопирование проводилось в проходящем свете с помощью фазово-контрастных микроскопов Zeiss Axio Imager 2 (ФГБУ «ВНИИКР») и Levenhuk MED D45T LCD (оборудование автора) при увеличении в 10–1000 раз. Фотографирование, морфометрические измерения и последующая обработка иллюстраций были осуществлены с помощью программного обеспечения Zen 2.3. В ряде случаев применялась послойная фотография для получения достаточной глубины резкости изображения. Для изготовления послойной фотографии серия кадров сшивалась в Zerene Stacker. Финальная обработка полученного файла производилась в фоторедакторе Adobe Photoshop CC.

В настоящей работе используется терминология, общепринятая в русскоязычной литературе по тетранихидным клещам (Митрофанов, Стрункова, 1979; Рекк, 1959; Вайнштейн, 1960, 1978; Митрофанов и др., 1987), обозначения щетинок тела

The red palm mite morphology is relatively well studied, there are works that allow identification of this species, however, they have limitations discussed below. At present, over 20 species of *Raoiella* are known (Beard et al., 2018), whereas previously published summaries covered 3 species of this genus (Pritchard, Baker, 1958*; Mitrofanov, Strunkova, 1979) and only *R. indica* in Tenuipalpidae identification keys for selected geographic regions (Hatzinikolis, 1987; Ueckermann et al., 2018). Meanwhile suggested by Beard et al. (2018) identification key to *Raoiella* species, in our opinion, seems to be quite difficult for routine phytosanitary diagnostics, as it reflects possible phylogenetic relationships between species of this genus.

In this paper, a simplified algorithm for the identification of the red palm mite for the practice of phytosanitary laboratories is proposed based on the synthesis of previous experience in diagnosing this species.

MATERIALS AND METHODS

Red palm mite material (*R. indica*) – 28 individuals (8 ♂, 19 ♀, 1 nymph) – was obtained in 2019 from ornamental plantings of *Cocos nucifera* (Monocotyledones: Arecaceae) on the territory of the Dominican Republic (near the city of Puerto Plata); the material was fixed in 70% ethanol.

The slides were prepared on the basis of the Ecology and Genetics of Insects and Mites Laboratory of the Research and Methodological Department of Entomology of FGBU “VNIICR” under a Zeiss Stemi 2000 stereomicroscope using Hoyer’s medium, according to the recipe given by Krantz, Walter (2009). Several mites were placed on one slide, then kept at 70–75 °C on a hot plate (BIS-N microthermostat) for 3 hours.

Microscopy was carried out in transmitted light using phase-contrast microscopes Zeiss Axio Imager 2 (VNIICR) and Levenhuk MED D45T LCD (author’s equipment) at a magnification of 10–1000 times. Photographing, morphometric measurements and subsequent processing of illustrations were carried out using Zen 2.3 software. In some cases, layered photography was used to obtain sufficient depth of field in the image. To make a layered photograph, a series of frames were stitched together in a Zerene Stacker. The final processing of the resulting file was carried out in the Adobe Photoshop CC photo editor.

In this work, we use the terminology generally accepted in the Russian-language literature on tetranychoid mites (Mitrofanov and Strunkova, 1979; Reck, 1959; Wainstein, 1960, 1978; Mitrofanov et al., 1987), designations of the setae of the body and legs are given according to the Lindquist system (Lindquist, 1985) with additions from Mitrofanov and Strunkova (1979) and Beard et al. (2018).

* Pritchard, Baker (1958) in their monograph, they give a key table for identifying *Raoiella queenslandica* Womersley, 1942 [currently belongs to the genus *Macfarlaneiella*], *R. australica* Womersley, 1940; *R. indica* Hirst, 1924; *R. macfarlanei* Pritchard et Baker, 1958.

* Pritchard, Baker (1958) в своей монографии приводят определительную таблицу для идентификации *Raoiella queenslandica* Womersley, 1942 [в настоящее время относится к роду *Macfarlaneiella*], *R. australica* Womersley, 1940; *R. indica* Hirst, 1924; *R. macfarlanei* Pritchard et Baker, 1958.

и ног приводятся по системе Линдквиста (Lindquist, 1985) с дополнениями из работ Митрофанова и Струнковой (1979) и Beard et al. (2018).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Таксономический статус *Raoiella indica*

Первоописание: *Raoiella indica* Hirst, 1924: 522.

Вид описан из Коимбатура, Южная Индия (Hirst, 1924). Типовой материал хранится в Музее естественной истории, Лондон, Великобритания [BMNH] (Mesa et al., 2009).

Синонимы (по Mesa et al. (2009) и частично по Beard et al. (2018)): *Rarosiella cocosae* Rimando, 1996; *Raoiella camur* Chaudhri et Akbar, 1985; *R. empedos* Chaudhri et Akbar, 1985; *R. neotericus* Chaudhri et Akbar, 1985; *R. obelias* Hasan et Akbar, 2000; *R. pandanae* Mohanasundaram, 1985; *R. phoenica* Meyer, 1979; *R. rahii* Akbar et Chaudhri, 1987.

Замечание. Существуют разногласия относительно валидности *R. pandanae*, который морфологически близок к *R. indica*. Mohanasundaram (1985) наблюдал заражение этим клещом растений *Pandanus* (Monocotyledones), которые были окружены произрастающими кокосовыми пальмами *Cocos nucifera* (Monocotyledones). Следует отметить, что известны случаи заноса *R. indica* на нехарактерное растение-хозяин, как это наблюдалось в Бразилии на *Fragaria* (Hata et al., 2017). Согласно Mesa et al. (2009), *R. pandanae* является младшим синонимом *R. indica*. По мнению Beard et al. (2018), статус данного вида не представляется полностью ясным, так как авторами не был изучен типовой материал, но на основании первоописания высказано предположение, что этот вид является валидным (при этом отмечается, что *R. pandanae* нуждается в переописании). В частности, авторы указывают на различия в длине дорсальных щетинок (что было определено по рисунку не очень хорошего качества из оригинального описания *R. pandanae*) и растениях-хозяевах.

В настоящей работе относительно *R. pandanae* принята точка зрения Mesa et al. (2009).

Обобщение сведений по морфологии клещей-плоскотелок (Tenuipalpidae) и идентификация важнейших стадий жизненного цикла

Для облегчения восприятия последующего материала приводим развернутую морфологическую характеристику клещей семейства Tenuipalpidae. Раздел основан на работах Митрофанова, Струнковой (1979), Mesa et al. (2009), Pritchard, Baker (1958), Вайнштейна (1960, 1978), Krantz, Walter (2009), с акцентом на *R. indica*.

Тело клещей семейства Tenuipalpidae подразделено на гнатосому, проподосому и гистеросому (метаподосома и опистосома), последние 2 отдела разделены явным швом, или бороздкой (рис. 3).

Гнатосому образуют стилфор с парой выдвигаемых стилетов (хелицеры), гипостом и пара педипальп (пальпы). Гипостом в виде 4-угольной пластинки, продолжающийся в конический роstrum; с парой вентральных щетинок или без них. Пальпы из 1–5 сегментов (вертлуг, бедро, колено, голень и лапка) или отсутствуют. Бедро с одной щетинкой или без нее, у самцов она может быть превращена в шип. На голени коготок не развит, что отличает

RESULTS AND DISCUSSION

Taxonomy of *Raoiella indica*

Original description: *Raoiella indica* Hirst, 1924: 522.

The species is described from Coimbatore, South India (Hirst, 1924). The type material is deposited at the Natural History Museum, London, UK [BMNH] (Mesa et al., 2009).

Synonyms (according to Mesa et al. (2009) and partly Beard et al. (2018)): *Rarosiella cocosae* Rimando, 1996; *Raoiella camur* Chaudhri et Akbar, 1985; *R. empedos* Chaudhri et Akbar, 1985; *R. neotericus* Chaudhri et Akbar, 1985; *R. obelias* Hasan et Akbar, 2000; *R. pandanae* Mohanasundaram, 1985; *R. phoenica* Meyer, 1979; *R. rahii* Akbar et Chaudhri, 1987.

Note. There is controversy regarding the validity of *R. pandanae*, which is morphologically similar to *R. indica*. Mohanasundaram (1985) observed infestation by this mite on *Pandanus* (Monocotyledones), which were surrounded by growing coconut palms *Cocos nucifera* (Monocotyledones). It should be noted that there are reported cases of introduction of *R. indica* to an uncommon host plant, as observed in Brazil on *Fragaria* (Hata et al., 2017). According to Mesa et al. (2009), *R. pandanae* is a junior synonym for *R. indica*. According to Beard et al. (2018), the status of this species is not completely clear, since the authors did not study the type material, but based on the original description, it was suggested that this species is valid (it is noted that *R. pandanae* needs a redescription). In particular, the authors point to differences in the length of the dorsal setae (which was determined from a not very good quality drawing from the original description of *R. pandanae*) and host plants.

In this work, *R. pandanae* is considered according to Mesa et al. (2009).

Generalization of information on the morphology of Tenuipalpidae and identification of the most important stages of the life cycle

To facilitate the perception of the following material, we present a detailed morphological description of Tenuipalpidae mites. The section is based on the works of Mitrofanov, Strunkova (1979), Mesa et al. (2009), Pritchard, Baker (1958), Wainstein (1960, 1978), Krantz, Walter (2009), with emphasis on *R. indica*.

Tenuipalpidae mite body is subdivided into gnathosoma, propodosoma, and hysterosoma (metapodosoma and opisthosoma), the last 2 parts are usually separated by a clear suture, or furrows (Fig. 3).

The gnathosoma is formed by a stylophore with a pair of retractable stylets (chelicerae), a hypostome, and a pair of pedipalps (palpi). Hypostome in the form of a 4-angle plate, continuing into a conical rostrum; with or without a pair of ventral setae. Palpi of 1–5 segments (trochanter, femur, genu, tibia, and tarsus) or absent. Femur with or without one seta, in males it may be turned into a spine. The palptibial thumb-claw is not developed, which distinguishes Tenuipalpidae family from representatives of other Tetranychoidae families. Leg with one or two sensory setae and one or two tactile setae.

клещей семейства Tenuipalpidae от представителей прочих семейств Tetranychidae. Лапка с одной-двумя сенсорными щетинками и одной-двумя тактильными щетинками.

Проподосома впереди часто вытянута в тонкую каемку с несколькими парными выростами без щетинок («коронка», или рostrальное поле). Перитремы представлены парой простых трубок (рис. 4), залегающих в стенках хелицеровой воронки. Вершина перитрем несколько утолщена, иногда слабо изогнута. На проподосоме может быть максимально представлено 3 пары щетинок ($v2$, $sc1$, $sc2$). Между щетинками $sc1$ и $sc2$ расположены глаза (обычно в количестве двух пар), или (реже) они редуцированы, как у *Raoiellana allium*.

Дорсально гистеросома несет от 5 до 13 пар щетинок (рис. 1, 3). Медиально расположен дорсоцентральный ряд щетинок (DC), которые начинаются с $c1$; краевое положение занимает дорсолатеральный ряд (DL), начинающийся с $c3$. Между ними расположен дорсосулатеральный ряд (DSL), начинающийся с $c2$. Максимальное количество щетинок варьирует в зависимости от ряда: по 3 щетинки в рядах c , d , e ; по 2 в рядах f (обозначаются как $f2$ и $f3$) и h ($h1$ и $h2$).

На вентральной поверхности тела клещей с сильно склеротизированными покровами имеются вентральный, генитальный и анальный щиты (рис. 3). У клещей со слабо склеротизированными покровами, например, *Raoiella*, щиты не развиты;

Propodosoma in front often extended into a thin border with several paired outgrowths without setae (“crown” or rostral shield). The peritremes are represented by a pair of simple tubes (Fig. 4) lying in the walls of the cheliceral funnel. Apex of peritrema somewhat thickened, sometimes slightly curved. 3 pairs of setae can be maximally represented on the propodosoma ($v2$, $sc1$, $sc2$). Eyes are placed between setae $sc1$ and $sc2$ (usually two pairs), or (more rarely) they are reduced, as in *Raoiellana allium*.

Dorsally, the hysterosoma bears from 5 to 13 pairs of setae (Fig. 1, 3). Medially located is the dorsocentral row of setae (DC), which begin with $c1$; the marginal position is occupied by the dorsolateral row (DL), starting with $c3$. Between them is the dorsosublateral row (DSL), starting with $c2$. The maximum number of setae varies depending on the row: 3 setae in rows c , d , e ; 2 setae in rows f (marked as $f2$ and $f3$) and h ($h1$ and $h2$).

On the ventral surface of the mite body with strongly sclerotized integuments, there are ventral, genital, and anal plates (Fig. 3). In mites with weakly sclerotized integuments, such as *Raoiella*, plates are not developed; these parts of the body are called regions (Fig. 5b).

Intercoxal setae are designated by index a (Fig. 5a): anterior setae, 1 pair; middle setae, 1–2 pairs; and posterior setae, 1–5 pairs; setae b and c on coxae of legs. Coxa chaetome formula I–IV: 1–2; 1–2; 0–1; 0–1.

There is a pair of setae on the ventral plate or in the pregenital region (ag); on the genital plate (region) –

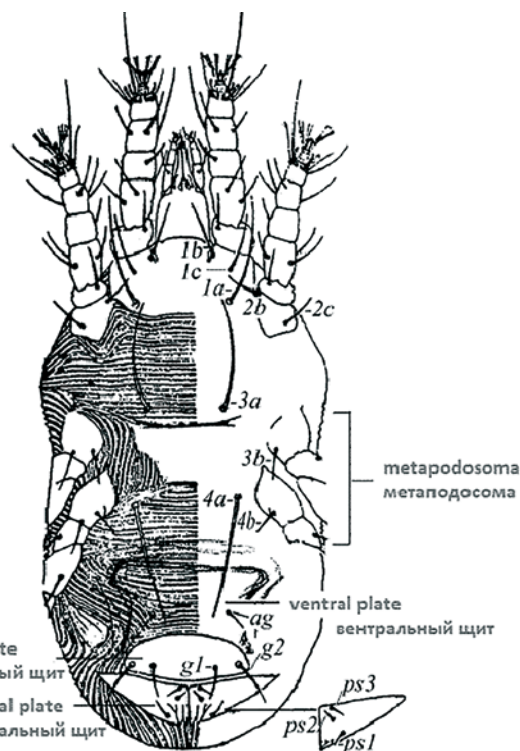
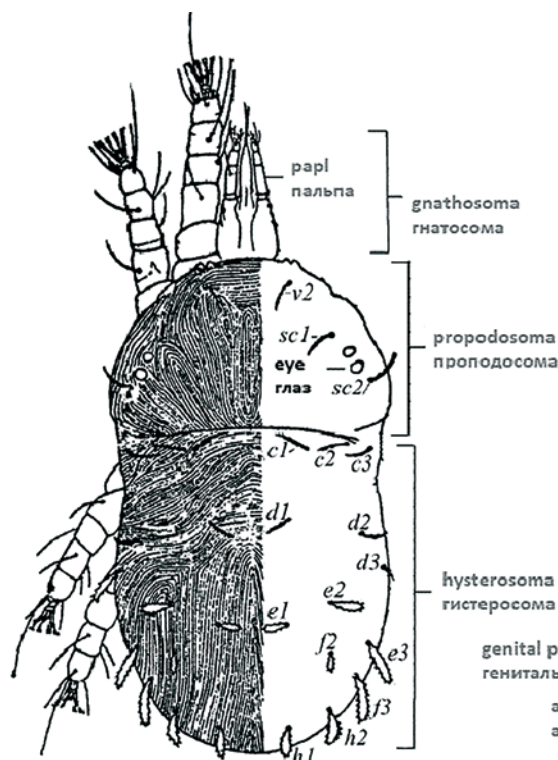


Рис. 3. Морфология клеща-плоскотелки рода *Aegyptobia*: слева – дорсальная поверхность, справа – вентральная поверхность. На левой стороне тела показана штриховка кутикулы, на правой стороне тела частично удалены ноги; в обоих случаях индексами приведены обозначения щетинок (по Mesa et al., 2009, с изменениями)

Fig. 3. Morphology of Tenuipalpidae mite of the genus *Aegyptobia*: on the left – dorsal surface, on the right – ventral surface. The integument with striae is shown on the left side of the body, legs are partially removed on the right side of the body; in both cases, the designations of setae are given by indices (according to Mesa et al., 2009, with modifications)

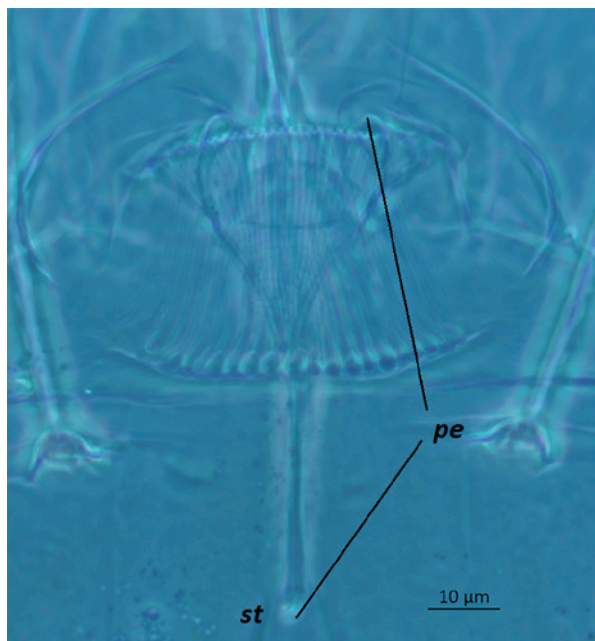


Рис. 4. Гнатосома и передняя часть проподосомы (продорсум), формирующая ребристый воротничок. Фото микропрепарата *R. indica* (самка) в фазовом контрасте, заметна просвечивающая сквозь воротничок трубчатая перитрема (pe), отходящая от стигм (st) (фото И.О. Камаева)

Fig. 4. Gnathosoma and anterior part of propodosoma (prodorsum), forming a ribbed collar. Slide photo of *R. indica* (female) in phase contrast, tubular peritreme (pe) visible through the collar, breaking away from the stigma (st) (photo by I.O. Kamayev)

эти участки тела называются областями (рис. 5b).

Межтазиковые щетинки обозначаются индексом *a* (рис. 5a): передние – 1 пара, средние – 1–2 пары, задние – 1–5 пар; на тазаках ног щетинки *b* и *c*. Формула хетоматазиков I–IV: 1–2; 1–2; 0–1; 0–1.

На вентральном щите или в прегенитальной области находится пара щетинок (*ag*); на генитальном щите (области) – 2 или 3 пары щетинок (*g1–3*); хетом этих структур также различается в зависимости от стадий жизненного цикла (рис. 5b и 6). Анальных щетинок, расположенных на одноименном щите (если он имеется), 2 или 3 пары (*ps1–3*). Как правило, если щетинки *g3* развиты, то представлены и 3 пары *ps*.

У половозрелых особей, как правило, 4 пары ног; но у некоторых таксонов имеются лишь 3 пары (*Larvacarus*, *Phytoptipalpus*) или, как у *Raoiellana*: у самцов – 4 пары ног, а у самок – 3.

Ноги 6-члениковые: тазик, вертлуг (трохантер), бедро, колено, голень, лапка. Хетом колена I–IV: 1–3; 1–3; 0–1; 0–1. Хетом голеней I–IV: 5–4; 5–4; 3; 3.

2 or 3 pairs of setae (*g1–3*); the chaetome of these structures also differs depending on the stages of the life cycle (Figs. 5b and 6). 2 or 3 pairs of setae (*ps1–3*) located on the anal plate (region). As a rule, if setae *g3* are developed, then there are 3 pairs of *ps*.

Mature individuals usually have 4 pairs of legs; but some taxa have only 3 pairs (*Larvacarus*, *Phytoptipalpus*) or, as in *Raoiellana*: males have 4 pairs of legs and females have 3.

Legs 6-segmented: coxa, trochanter, femur, genua, tibia, tarsus. Chaetome of the genu I–IV: 1–3; 1–3; 0–1; 0–1. Chaetome of the tibia I–IV: 5–4; 5–4; 3; 3.

On legs I–IV the chaetome formula is usually as follows: 9–10; 9–10; 5; 5. Chaetome of legs I and II is characterized by the presence of eupathidia (*pζ'* and *pζ''*), unguinals setae (*u'* and *u''*), flagelliform tactile or tectale setae (*tc'* and *tc''*) and proximal tactile or fastigials setae (*ft'* and *ft''*). Sensory setae or solenidia – 1–2 (*ω'* and *ω''*), they are narrowly cylindrical or ovoid, straight or curved.

Pretarsus: pad-like empodium with 2 or less often with 1 row of tenent hairs; true claw pad-like or claw-shaped with 2 rows of tenent hairs.

The following morphotypes of Tenuipalpidae are distinguished according to the characteristics of the female body structure (according to Mesa et al., 2009, with abbreviations and changes):

Dolichotetranychine – body long and elongated, posterior margin of propodosoma equal in width to hysterosoma; the “crown” on the propodosoma is absent; in most species, setae *e1* are absent; palps consist of 2–3 segments.

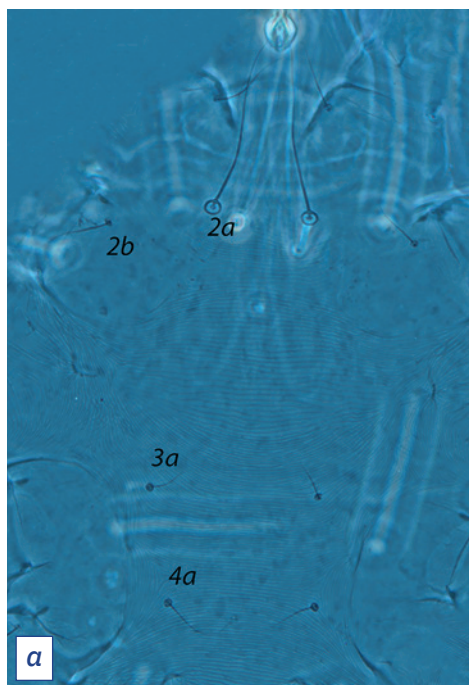


Рис. 5. Хетотаксия вентральной поверхности самки *R. indica*: а – подосома, отсутствуют щетинки на тазаках III–IV пар ног; б – генитальная и анальная области. Индексами обозначены соответствующие щетинки (фото И.О. Камаева)

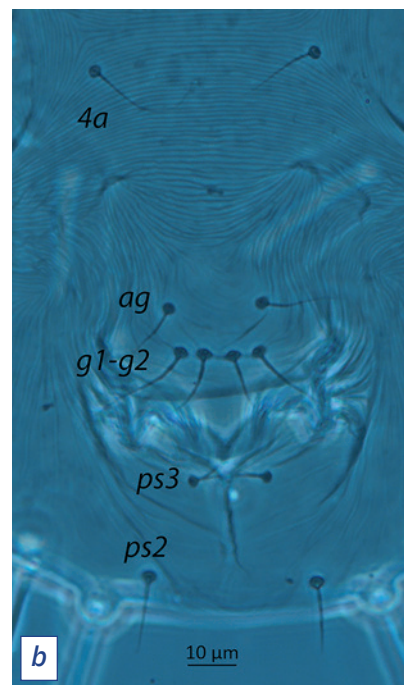


Fig. 5. Chaetotaxy of the ventral surface of the female *R. indica*: a – podosoma, no setae on coxae of III–IV pairs of legs; b – genital and anal regions. The corresponding setae are indicated by indices (photos by I.O. Kamayev)

На лапках I–IV формула хетомы обычно следующая: 9–10; 9–10; 5; 5. Хетом лапок I и II характеризуется наличием апикальных акантоидов ($p\zeta'$ и $p\zeta''$), подкоготковых щетинок (u' и u''), бичевидных тактильных щетинок (tc' и tc'') и проксимальных тактильных щетинок (ft' и ft''). Сенсорных щетинок (соленидиев) – 1–2 (ω' и ω''), они узкоцилиндрические или яйцевидные, прямые или изогнутые.

Онихиальный аппарат лапки: эмподий брусковидный с 2 или реже с 1 рядом железистых волосков (хетоидов); амбулакры брусковидные или когтевидные с 2 рядами хетоидов.

По признакам строения тела самок выделяют следующие морфотипы Tenuipalpidae (по Mesa et al., 2009, с сокращениями и изменениями):

Dolichotetranychine – тело длинное и вытянутое, задний край проподосомы равен по ширине гистеросоме; «коронка» на проподосоме отсутствует; у большинства видов щетинки $e1$ отсутствуют; пальпы состоят из 2–3 сегментов.

Tenuipalpine – проподосома значительно шире гистеросомы, передняя часть которой резко сужается; «коронка» на проподосоме имеется; пальпы из 1–3 сегментов и $h2$ очень длинные, волосовидные или пальпы 4-сегментные и $h2$ недлинные.

Brevipalpine – задний край проподосомы равен по ширине гистеросоме, последняя постепенно сужается к заднему краю; расширенная мембранозная «коронка» на проподосоме имеется; вентральный щит обычно имеется; пальпы 3–4-сегментные; дорсосублатеральный ряд щетинок отсутствует ($c2$ развиты у *Cenopalpus*).

Aegyptobine – напоминают Brevipalpine, но у них гистеросома несколько шаровидная, не сужается постепенно к своему заднему краю; «коронка» на проподосоме отсутствует; пальпы из 1–5 сегментов; дорсосублатеральный ряд щетинок имеется (кроме *Tenuilichus*).

Macfarlanielline – тело в дорсовентральной проекции округлое (или близкое к таковому); гистеросома обычно шире, чем проподосома; «коронка» на проподосоме отсутствует; пальпы из 2–3 сегментов. К этому морфотипу относится *Raoiella*.

Tegopalpine – проподосома напоминает капюшон, который накрывает гнатосому. Передний край проподосомы с выемкой или без нее.

Особенности строения самца (рис. 1b). Копулятивный орган самца тетранихонидных клещей в англоязычной литературе получил название «эдеагус», «aedeagus» (Baker, Wharton, 1952; Pritchard, Baker, 1955; Krantz, Walter, 2009), в том числе и для Tenuipalpidae (Pritchard, Baker, 1958; Beard et al., 2018); в некоторых источниках и российской литературе (по-видимому, как дань немецкой морфологической традиции) он называется «пенис», «penis», в том числе и для Tenuipalpidae (Hirst, 1924; Рекк, 1959; Вайнштейн, 1960; Митрофанов, Стрункова, 1979; Митрофанов и др., 1987). Здесь следует указать, что у Arachnida, кроме групп Acari, настоящий копулятивный орган имеется только у Opiliones, для последних используется термин «penis» (Martens, 1978). При этом в современной акарологической литературе широкое распространение получил термин «эдеагус». Копулятивный орган самца Tenuipalpidae тонкий, нитевидный, его апикальная часть защищена по бокам двумя щетинками-стилетами $ps3$ (рис. 1b, 7).

Tenuipalpine – propodosoma much wider than hysterosoma, the anterior part of which sharply narrows; there is a “crown” on the propodosoma; palps with 1–3 segments and $h2$ very long, hair-like or 4-segmented and $h2$ not long.

Brevipalpine – the posterior margin of the propodosoma is equal in width to the hysterosoma, the latter gradually narrowing towards the posterior margin; there is an extended membranous “crown” on the propodosoma; ventral shield usually present; palps 3–4-segmented; dorsosublateral row of setae absent ($c2$ are developed in *Cenopalpus*).

Aegyptobine – resemble Brevipalpine, but their hysterosoma is somewhat spherical, not tapering gradually towards its posterior margin; the “crown” on the propodosoma is absent; palps with 1–5 segments; dorsosublateral row of setae present (except for *Tenuilichus*).

Macfarlanielline – the body in the dorsoventral projection is rounded (or close to it); the hysterosoma is usually wider than the propodosoma; the “crown” on the propodosoma is absent; palps with 2–3 segments. *Raoiella* belongs to this morphotype.

Tegopalpine – the propodosoma resembles a hood that covers the gnathosoma. Anterior margin of propodosoma with or without notch.

Structural features of the male (Fig. 1b). The copulatory organ of the male tetranychoid mites in the English-language literature was called “aedeagus” (Baker, Wharton, 1952; Pritchard, Baker, 1955; Krantz, Walter, 2009), including for Tenuipalpidae (Pritchard, Baker, 1958; Beard et al., 2018); in some sources and Russian-language literature (apparently, as a tribute to the German morphological tradition) it is called “penis”, including for Tenuipalpidae (Hirst, 1924; Reck, 1959; Wainstein, 1960; Mitrofanov and Strunkova, 1979; Mitrofanov et al., 1987). It should be noted here that in

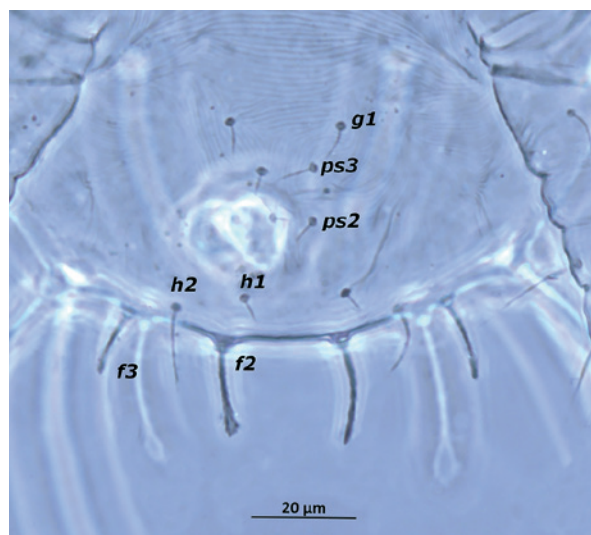


Рис. 6. Хетотаксия анальной и генитальной областей дейтонимфы *R. indica*. Индексами обозначены соответствующие щетинки (фото И.О. Камаева)

Fig. 6. Chaetotaxy of the anal and genital regions of the deutonymph *R. indica*. The corresponding setae are indicated by indices (photo by I.O. Kamayev)

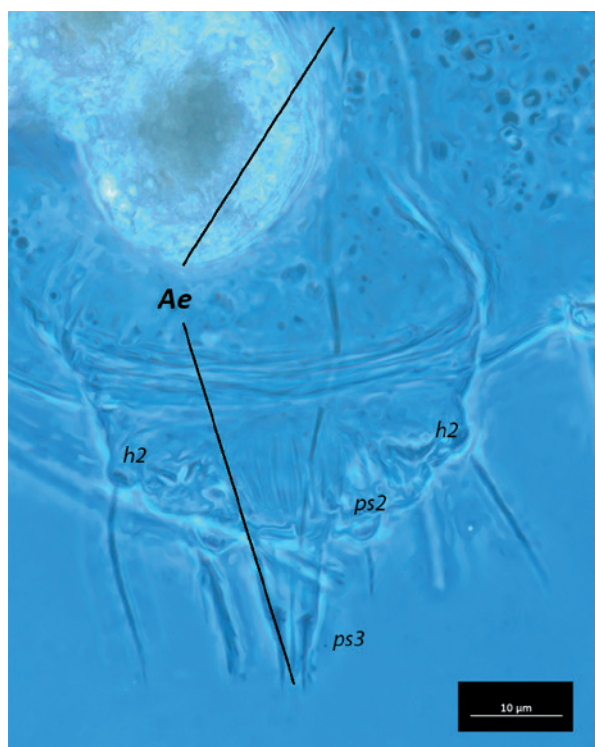


Рис. 7. Задняя часть тела самца *R. indica*. Индексами обозначены щетинки; эдеагус (Ae) длинный, бичевидный, просвечивает сквозь кутикулу (фото И.О. Камаева)

Fig. 7. Caudal part of the male body *R. indica*. Setae are indexed; aedeagus (Ae) elongate, flagelliform, shining through the cuticle (photo by I.O. Kamaev)

Определительная таблица важнейших стадий жизненного цикла клещей Tenuipalpidae

- 1 (2) Ног 3 пары личинка или иная стадия некоторых Tenuipalpidae (*Larvacarus*, *Phytoptipalpus*, самка *Raoiellana*)
- 2 (1) Ног 4 пары 3
- 3 (4) Хетом генитальной области (рис. 6): щетинки *g2* отсутствуют. Генитальное отверстие зачаточное нимфальные стадии
- 4 (3) Хетом генитальной области (рис. 3, 5): щетинки *g2* имеются. У самок генитальное отверстие развито в полной мере, у самцов развит копулятивный орган (эдеагус) (рис. 1b, 7) взрослая особь

Сравнительная характеристика диагностических признаков взрослых особей видов рода *Raoiella* и сведений по распространению и растениям-хозяевам

Совокупность данных по морфологии видов рода *Raoiella*, а также обобщенные сведения о распространении видов и о растениях-хозяевах представлены в таблице 1.

Из 21 валидного вида рода 16 были описаны в 2018 г. (Beard et al., 2018), при этом все они имеют австралийское происхождение и преимущественно встречаются на растениях Myrtaceae (за одним исключением: *R. davisii* обитает на Ericaceae). Прежде из Австралии был известен только 1 вид – *R. australica* Womersley, 1940. Три вида описаны из Индии, Греции и ЮАР и пока не известны за пределами этих регионов. Единственный вид рода с широким ареалом – *Raoiella indica*, который в отличие

Arachnida, apart from the Acari groups, only Opiliones has a real copulatory organ, for the latter the term “penis” is used (Martens, 1978). At the same time, the term “aedeagus” has become widespread in modern acarological literature. The copulatory organ of the male Tenuipalpidae is thin, flagelliform, its apical part is protected on the sides by two stylet setae *ps3* (Fig. 1b, 7).

Key to the most important life stages in the cycle of the Tenuipalpidae mites

- 1 (2) Legs 3 pairs larva or other stage of some Tenuipalpidae (*Larvacarus*, *Phytoptipalpus*, female *Raoiellana*)
- 2 (1) Legs 4 pairs 3
- 3 (4) Chaetome of genital region (Fig. 6): setae *g2* absent. Genital opening rudimentary nymphal stages
- 4 (3) Chaetome of genital region (Fig. 3, 5): setae *g2* present. In females, the genital opening is fully developed; in males, the copulatory organ (aedeagus) is developed (Fig. 1b, 7) adult

Comparative analysis of diagnostic characters of adult species of the genus *Raoiella* and data on geographical distribution and host plants

A set of data on the morphology of species of the genus *Raoiella*, as well as generalized information on the geographical distribution of species and on host plants are presented in Table 1.

Of the 21 valid species of the genus, 16 were described in 2018 (Beard et al., 2018), all of which are of Australian origin and predominantly occur on Myrtaceae plants (with one exception: *R. davisii* lives on Ericaceae). Previously only 1 species was known from Australia – *R. australica* Womersley, 1940. Three species have been described from India, Greece, and South Africa and are not yet known outside of these regions. The only species of the genus with a wide range – *Raoiella indica*, which, unlike the others, is occurs representatives of the families Arecaceae, Musaceae, etc.

An analysis of the morphological characters of currently known species of the genus *Raoiella* was carried out on the basis of descriptions and illustrations (drawings, photos) from the works of Beard et al. (2012, 2018) and partly own material.

Morphological diagnostic characters of the dorso-central chaetome and the chaetome of the dorsoposterior part of body and legs were analyzed for the subsequent simplified identification algorithm for the red palm mite.

The state of the following features was qualitatively assessed: the ratio of the lengths of the dorsocentral setae (*c1*, *d1*, *e1*) to each other and to the distances between the rows of these setae. It should be noted that the distances between the rows of setae could differ (for example, the spacing between rows *c1* – *d1* was shorter than *d1* – *e1* with approximately the same length of these setae), therefore, for further diagnostic purposes, only the sign of the ratio of the length of the first pair of dorsocentral setae (*c1*) to the distance *c1* – *d1* was used (column 1 of diagnostic characters of Table 1). The proportion was expressed in this way: “1” – equal to the length of the row and more; “3/4” – in the case when

Таблица 1
Сравнительная характеристика распространения, растений-хозяев и диагностических признаков видов рода *Raoiella*
Table 1
Comparative characteristics of geographical distribution, host plants and diagnostic characters of species of the genus *Raoiella*

Виды Species	Ареал Area	Таксон растений-хозяев Taxa of host-plants	Группа видов Species group (Beard et al., 2018)	Диагностические признаки Diagnostic characters						
				1	2	3	4	5	6	7
				Ld1/ Lc1 – d1	Lc1 – Ld1	Lc1 – Le1	Lh1/Lh2	Chaetome of genera I–II	Lft"/Lω" (TI)	Lft"/Lω" (TII)
<i>R. argenta</i> Beard, 2018	A	Myrtaceae	<i>macfarlanei</i>	3/4	≈		≈	3	1–1–1–1	>
<i>R. australica</i> Womersley, 1940	A	Myrtaceae	<i>austratica</i>	≤ 1/2	≈		>	2 (♂3)	1–1–0–0	>
<i>R. bauchani</i> Beard et Ochoa, 2018	A	Myrtaceae	<i>bauchani</i>	≤ 1/2	(Lc1 ≈ Ld1) > Le1		>	2	1–1–0–0	<
<i>R. calgoa</i> Beard et Ochoa, 2018	A	Myrtaceae	<i>wandoo</i>	1	≈		>	3	1–1–0–0	>
<i>R. crebra</i> Beard et Ochoa, 2018	A	Myrtaceae	<i>wandoo</i>	≤ 1/2	≈		>	3	1–1–0–0	≈
<i>R. davisi</i> Beard, 2018	A	Ericaceae	<i>austratica</i>	1	Lc1 > Ld1 > Le1		>	2 (♂3)	1–1–0–0	≈
<i>R. didcota</i> Beard, 2018	A	Myrtaceae	<i>austratica</i>	≤ 1/2	≈		>	2 (♂3)	1–1–0–0	≈
<i>R. eugeniae</i> (Mohanasundaram, 1996)	I	Myrtaceae	<i>macfarlanei</i>	1	≈		≈	3	1–1–1–1	>
<i>R. goyderi</i> Ochoa et Beard, 2018	A	Myrtaceae	<i>bauchani</i>	≤ 1/2	≈		>	2	1–1–0–0	<
<i>R. hallingi</i> Beard, 2018	A	Myrtaceae	<i>wandoo</i>	3/4	≈		>	3	1–1–0–0	≈
<i>R. illyarrie</i> Beard et Ochoa, 2018	A	Myrtaceae	<i>wandoo</i>	≤ 1/2	Lc1 > (Ld1 ≈ Le1)		>	3	1–1–0–0	≈
<i>R. indica</i> Hirst, 1924	PT	Arecaceae, Musaceae etc.	<i>indica</i>	1	Lc1 > Ld1 > Le1		x	3	1–1–0–0	>
<i>R. karri</i> Ochoa et Beard, 2018	A	Myrtaceae	<i>wandoo</i>	≤ 1/2	≈		>	3	1–1–0–0	>
<i>R. macfarlanei</i> Pritchard et Baker, 1958	G	Oleaceae	<i>macfarlanei</i>	1	≈		≈	3	1–1–1–1	>
<i>R. marri</i> Beard et Ochoa, 2018	A	Myrtaceae	<i>austratica</i>	≤ 1/2	≈		>	2 (♂3)	1–1–0–0	≈
<i>R. pooleyi</i> Beard et Ochoa, 2018	A	Myrtaceae	<i>bauchani</i>	≤ 1/2	≈		>	2	1–1–0–0	≈
<i>R. shimpiana</i> Meyer, 1979	SA	Celastraceae	<i>macfarlanei</i>	1	≈		≈	3	1–1–1–1	>
<i>R. tallerack</i> Beard et Ochoa, 2018	A	Myrtaceae	<i>wandoo</i>	3/4	≈		>	3	1–1–0–0	>
<i>R. taronga</i> Beard et Ochoa, 2018	A	Myrtaceae	<i>austratica</i>	≤ 1/2	≈		>	2 (♂3)	1–1–0–0	≈
<i>R. todiana</i> Beard et Ochoa, 2018	A	Myrtaceae	<i>wandoo</i>	≤ 1/2	≈		≈	3	1–1–0–0	>
<i>R. wandoo</i> Beard et Ochoa, 2018	A	Myrtaceae	<i>wandoo</i>	≥ 1/2	≈		>	3	1–1–0–0	≈

Ареал: А – Австралия, G – Греция, I – Индия, PT – пантропический (тропический пояс Азии, Африки и Америки), SA – ЮАР. Диагностические признаки, расшифровка обозначений по столбцам: 1 – длина первой пары дорсоцентральных щетинок (Ld1) к расстоянию между первыми рядами дорсоцентральных щетинок (Lc1 – d1); 2 – сравнение длин трех пар дорсоцентральных щетинок (Lc1 – Ld1 – Le1) относительно друг друга; 3 – отношение длин щетинок h (Lh1/Lh2); 4 – хетом колена I и II, Ld1 – Le1) в скобках указано значение для самок; 5 – хетом таза (I–II–III–IV), жирным шрифтом обозначены виды группы *macfarlanei*; 6 – отношение длины тактильной щетки (Lft") к длине соления (Lω") на лапке I (TI); 7 – отношение длины тактильной щетки (Lft") к длине соления (Lω") на лапке II (TII). Обозначения внутри ячеек таблицы: > – больше; < – меньше; ≈ – примерно равно; ≥ – больше или равно; ≤ – меньше или равно; x – требует уточнения. Светло-оранжевым цветом выделен целевой объект – красный пальмовый клещ (*R. indica*). Признаки дорсоцентрального хетомы (столбцы 1–2 диагностических признаков), сходные с изучаемым видом *R. indica*, выделены светло-желтым цветом.

Area: A – Australia, G – Greece, I – India, PT – pantropical (tropical belt of Asia, Africa and America), SA – South Africa. Diagnostic characters, interpretation of designations in columns: 1 – length of the first pair of dorsocentral setae (Ld1) to the distance between the first two rows of dorsocentral setae (Lc1 – d1); 2 – comparison of the lengths of three pairs of dorsocentral setae (Lc1 – Ld1 – Le1) relative to each other; 3 – ratio of lengths of setae h (Lh1/Lh2); 4 – chaetome of tribes I and II, the value for males is indicated in brackets; 5 – chaetome of coxae (I–II–III–IV), species of the *macfarlanei* group are indicated in bold; 6 – ratio of the length of the tactile seta (Lft") to the length of the solenidion (Lω") on tarsus I (TI); 7 – ratio of the length of the tactile setae (Lft") to the length of the solenidion (Lω") on tarsus II (TII). Designations inside table cells: > – more; < – less; ≈ – approximately equal; ≥ – greater than or equal; ≤ – less than or equal; x – to be clarified. Light orange is for the target object – red palm mite (*R. indica*). Features of the dorsocentral chaetome (columns 1–2 of diagnostic characters) similar to the *R. indica* species under study are highlighted in light yellow.

от остальных встречается на представителях семейств Agresaceae, Musaceae и др.

Анализ морфологических признаков известных к настоящему времени видов рода *Raoiella* был проведен на основе описаний и иллюстраций (рисунков, фото) из работ Beard et al. (2012, 2018) и собственного материала.

Были проанализированы морфологические диагностические признаки дорсоцентрального хетомы и признаки хетомы каудальной области и конечностей для последующего упрощенного алгоритма идентификации красного пальмового клеща.

Было качественно оценено состояние следующих признаков: отношение длин дорсоцентральных щетинок ($c1$, $d1$, $e1$) между собой и к расстояниям между рядами этих щетинок. Следует отметить, что расстояния между рядами щетинок могли различаться (например, между рядами $c1$ – $d1$ было короче $d1$ – $e1$ при примерно одинаковой длине этих щетинок), поэтому в дальнейшем для диагностических целей использовали только признак отношения длины первой пары дорсоцентральных щетинок ($c1$) к расстоянию $c1$ – $d1$ (столбец 1 диагностических признаков табл. 1). Отношения выражали таким образом: «1» – равный длине ряда и более; «3/4» – в случае, когда длина более половины расстояния между рядами, но явно менее этого самого расстояния; «1/2» – длина примерно равна половине расстояния или менее его. При этом для *R. indica* наряду с пятью видами характерна длинная первая пара дорсоцентральных щетинок (равная по длине расстоянию между рядами или превышающая его). Данный признак хотя и не использовался для идентификации видов рода *Raoiella* (Pritchard, Baker, 1958; Митрофанов, Стрункова, 1979), но применяется для некоторых таксонов Tetranychidae (Pritchard, Baker, 1955; Митрофанов и др., 1987).

Сравнение длин дорсоцентральных щетинок относительно друг друга (столбец 2 диагностических признаков табл. 1) для видов рода *Raoiella* применили Pritchard, Baker (1958) и Митрофанов, Стрункова (1979). Из 21 вида только у *R. indica* и *R. davis* наблюдается последовательное уменьшение длин дорсоцентральных щетинок от первой к третьей паре.

Признак «отношение длин щетинок $h1/h2$ » (рис. 8), указанный в столбце 3 диагностических признаков табл. 1, используется в работах Beard et al. (2018) и Ueckermann et al. (2018). В частности, в этих работах указывается, что для самок *R. indica* длина $h1$ примерно равна длине $h2$.

Для группы видов *australica*, к которой принадлежит *R. davis*, в отличие от всех остальных характерен половой диморфизм в числе щетинок на коленях I–II: для самок – 2 щетинки, для самцов – 3 щетинки. В то же время для самок и самцов *R. indica* характерно наличие трех щетинок на коленях I–II (табл. 1 и рис. 9).

Хетом тапиков с формулой 1–1–0–0 Митрофановым и Струнковой (1979) первоначально предлагался как диагностический признак рода *Raoiella*, включая *R. indica*. Однако, Beard et al. (2018) показали, что такое состояние признака характерно не для всех видов рода. Так, видам группы *macfarlanei* свойственно наличие по одной щетинке на тапиках III и IV.

the length is more than half the distance between the rows, but clearly less than this very distance; “1/2” – the length is approximately equal to half the distance or less. Also, for *R. indica* along with five species, a long first pair of dorsocentral setae is characteristic (equal in length to the distance between the rows or exceeding it). Although this character was not used to identify species of the genus *Raoiella* (Pritchard and Baker, 1958; Mitrofanov and Strunkova, 1979), it is used for some taxa of Tetranychidae (Pritchard and Baker, 1955; Mitrofanov et al., 1987).

Comparison of the lengths of dorsocentral setae relative to each other (column 2 of diagnostic characters in Table 1) for species of the genus *Raoiella* was performed by Pritchard and Baker (1958) and Mitrofanov and Strunkova (1979). Out of 21 species, only in *R. indica* and *R. davis* a successive decrease in the length of dorsocentral setae from the first to the third pair is observed.

The character “ratio of lengths of setae $h1/h2$ ” (Fig. 8) indicated in column 3 of the diagnostic characters of Table 1 is used by Beard et al. (2018) and Ueckermann et al. (2018). In particular, these works indicate that for *R. indica* females, the length $h1$ is approximately equal to the length $h2$.

The group of species *australica*, to which *R. davis* belongs, unlike all the others, is characterized by sexual dimorphism in the number of setae on the genu I–II: females have 2 setae, males have 3 setae. At the same time, *R. indica* females and males are characterized by the presence of three setae on genu I–II (Table 1 and Fig. 9).

Mitrofanov and Strunkova (1979) originally suggested a coxal chaetome with the formula 1–1–0–0 as a diagnostic character for the genus *Raoiella*, including *R. indica*. However, Beard et al. (2018) showed that this state of the character is not typical for all species of the genus. Thus, species of the *macfarlanei* group are characterized by the presence of one seta each on coxae III and IV.

Thus, according to the results of the analysis of the characters of the dorsocentral chaetome, it was shown that *R. indica* differs well from the vast majority of currently known valid species of the genus *Raoiella*, with the exception of *R. davis*. According to Beard et al. (2018) the above two species can be distinguished by the number of setae on the genu of the first and second pairs of legs (Table 1 and Fig. 9; however, the third seta is much smaller than the first two and is clearly visible using phase-contrast microscopy), the shape of setae $h2$ (in *R. indica*, hair-like, long; in *R. davis*, spatula-like, short), as well as the ratio of the lengths of double setae on legs I–II: tactile setae (ft) and solenidion (ω) (Table 1 and Fig. 10).

Morphometric study of diagnostic characters of *Raoiella indica*

The results of a morphometric study of some characters of the dorsal chaetome of *Raoiella indica* females and males are presented in Table 2.

In the lengths of the studied setae and the distance between the first and second pairs of dorsocentral

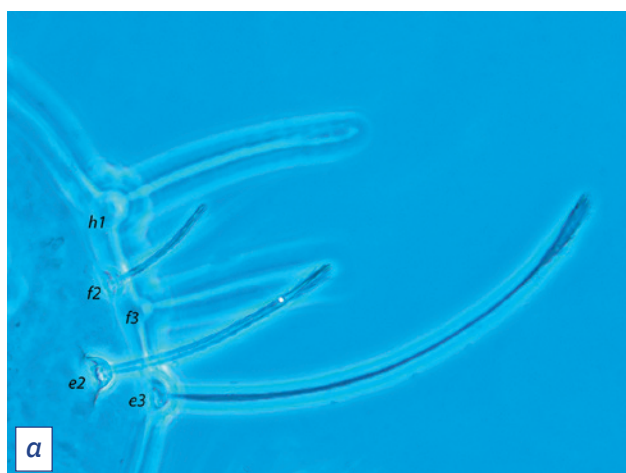


Рис. 8. Хетотаксия дорсальной поверхности задней части тела самки *R. indica*. Каудальная часть тела направлена вверх. Индексами обозначены соответствующие щетинки (фото И.О. Камаева)

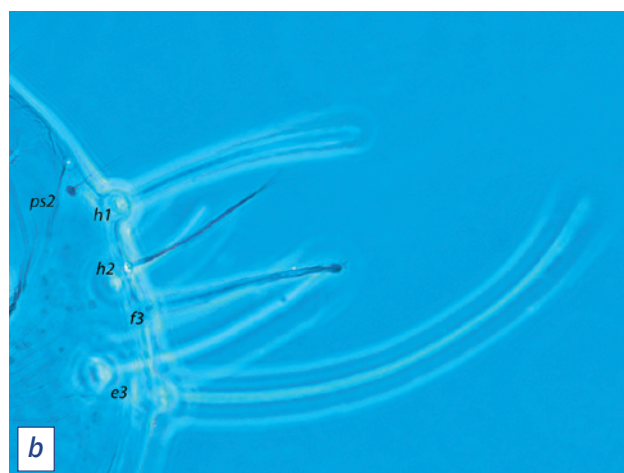


Fig. 8. Chaetotaxy of the dorsal surface of the posterior part of the *R. indica* female. The posterior margin of the body is directed upwards. The corresponding setae are indicated by indices (photos by I.O. Kamayev)

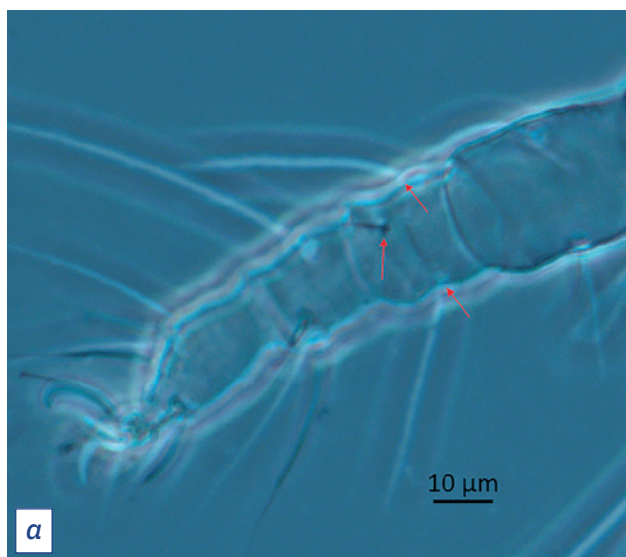


Рис. 9. Хетотаксия левого колена первой пары ног самки *R. indica*. Характерно наличие трех щетинок (а, показаны красными стрелками), при этом в одной проекции (b) видно только 2 крупные щетинки (фото И.О. Камаева)

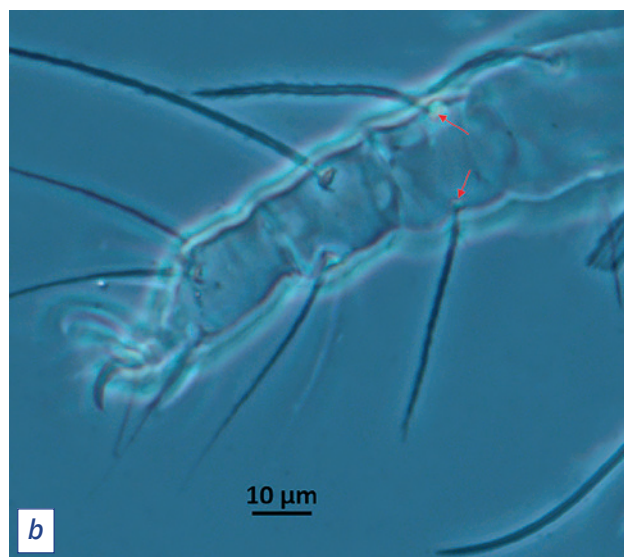


Fig. 9. Chaetotaxy of the left genua of the first pair of legs of the *R. indica* female. The presence of three setae is characteristic (a, shown by red arrows), while in one projection (b) only 2 large setae are visible (photos by I.O. Kamayev)

Таким образом, по результатам анализа признаков дорсоцентрального хетона показано, что *R. indica* хорошо отличается от подавляющего числа известных к настоящему времени валидных видов рода *Raoiella*, за исключением *R. davisi*. Согласно Beard et al. (2018) два выше указанных вида могут быть различимы по количеству щетинок на коленях первой и второй пар ног (табл. 1 и рис. 9; однако третья щетинка значительно меньше первых двух и хорошо заметна при использовании фазово-контрастной микроскопии), форме щетинок *h2* (у *R. indica* – волосовидная, длинная; у *R. davisi* – шпательевидная, короткая), а также отношению длин сдвоенных щетинок на лапках I–II: тактильной щетинки (*ft*“) и соленидия (*ω*“) (табл. 1 и рис. 10).

Морфометрическое исследование диагностических признаков *Raoiella indica*

Результаты морфометрического исследования признаков дорсального хетона самок и самцов *Raoiella indica* представлены в таблице 2.

setae, size sexual dimorphism is manifested: the measured characters in females, with some exceptions, are greater than those in males.

In both sexes of *R. indica*, the length of dorso-central setae decreases successively from the first pair to the last one (*c1* – *d1* – *e1*), in μm: females – 49.6–32.3–17.9; males – 34.9–25.2–13.1.

The length of the first pair of dorso-central setae in all studied cases exceeds the distance between the first and second pairs of dorso-central setae (interstriae), both in females (*Lc1* = 46.9 μm and *Lc1* – *d1* = 41.3 μm), and males (*Lc1* = 34.9 μm and *Lc1* – *d1* = 23.9 μm).

In the studied *R. indica* females, the length of intact setae *h2* (hair-like) varied within 46.7–61.7 μm, while the length of setae *h1* (spatula shaped) varied in the range 51.9–70.5 μm. This is generally consistent with

В длинах исследуемых щетинок и расстоянии между первой и второй парами дорсоцентральных щетинок проявляется размерный половой диморфизм: измеряемые признаки у самок, за некоторым исключением, больше, чем таковые у самцов.

У обоих полов *R. indica* длины дорсоцентральных щетинок последовательно уменьшаются от первой пары к последней ($c1 - d1 - e1$), в μm : самки – 49,6–32,3–17,9; самцы – 34,9–25,2–13,1.

Длина первой пары дорсоцентральных щетинок во всех изученных случаях превышает расстояние между первой и второй парами дорсоцентральных щетинок (междурядье) как у самок ($Lc1 = 46,9 \mu\text{m}$ и $Lc1 - d1 = 41,3 \mu\text{m}$), так и у самцов ($Lc1 = 34,9 \mu\text{m}$ и $Lc1 - d1 = 23,9 \mu\text{m}$).

У изученных самок *R. indica* длина неповрежденных щетинок $h2$ (волосовидной формы) варьировала в пределах 46,7–61,7 μm , в свою очередь, длина щетинок $h1$ (шпательевидной формы) изменялась в диапазоне 51,9–70,5 μm . Это в целом согласуется с данными, приведенными в описании вида у Beard et al. (2018), где $h2 = 48\text{--}72 \mu\text{m}$, $h1 = 49\text{--}85 \mu\text{m}$. Во всех изученных нами случаях у самок длина $h2$ (в среднем составляя 54,1 μm) была меньше длины $h1$ (в среднем – 62,1 μm); отношение длин $h2$ к $h1$ варьировало в пределах от 0,83 до 0,92 μm . Существует определенная методическая трудность при оценке длины щетинок $h2$ у *R. indica*, т. к. они сильно истончаются в своей дистальной части, а вершины щетинок плохо заметны при микроскопировании. Интересно отметить, что у самцов доминиканской популяции во всех изученных случаях щетинка $h2$ длиннее $h1$.

Длина тактильной щетинки ft на лапках первой и второй пар ног самок и самцов *R. indica* значительно превышает (более чем в 3 и 2 раза соответственно) длину ω во всем изученном материале (рис. 10).

Таблица 2
Значения количественных
диагностических признаков самцов
и самок *Raoiella indica*

Признак	Самки (n = 19)	Самцы (n = 8)
Длина $c1$, μm	49,6 ± 0,6	34,9 ± 0,6
Длина $d1$, μm	32,3 ± 1,0	25,2 ± 0,6
Длина $e1$, μm	17,9 ± 0,7	13,1 ± 0,7
Длина $c1 - d1$, μm	41,3 ± 1,1	23,9 ± 0,5
Длина $h1$, μm	62,1 ± 0,7	22,6 ± 0,4
Длина $h2$, μm	54,1 ± 0,7	24,4 ± 0,5
Отношение длин $h2$ к $h1$	0,87 ± 0,01	1,07 ± 0,02
Отношение длин ft к ω на лапке I	> 3	> 2
Отношение длин ft к ω на лапке II	> 3	> 2

the data given in the description of the species by Beard et al. (2018), where $h2 = 48\text{--}72 \mu\text{m}$, $h1 = 49\text{--}85 \mu\text{m}$. In all cases studied by us, in females, the length $h2$ (on average, 54.1 μm) was less than the length $h1$ (on average, 62.1 μm); the ratio of the lengths $h2$ to $h1$ varied from 0.83 to 0.92 μm . There is a certain methodological difficulty in estimating the length of setae $h2$ in *R. indica*, since they become very thin in their distal part, and the apices of the setae are poorly visible under microscope. It is interesting to note that in the males of the Dominican population, in all the cases studied, the seta $h2$ is longer than $h1$.

The length of the tactile seta ft on the tarsi of the first and second pairs of legs of *R. indica* females and males significantly exceeds (by more than 3 and 2 times, respectively) the length ω in the entire material studied (Fig. 10).

Key to differentiating *Raoiella indica* from other species of the genus

- 1 (2) Coxae III and IV have one seta each other species
- 2 (1) No setae on coxae III and IV 3
- 3 (4) The length of the dorsocentral setae successively decreases from the first ($c1$) to the third pair ($e1$), while the length of the first pair ($c1$) is approximately equal to or exceeds the distance between the first and second rows of dorsocentral setae 5
- 4 (3) Other state of characters other species
- 5 (6) Females and males have tactile seta ft on tarsus I–II slightly larger than solenidion ω . Females have 2 setae on genu I–II, males have 3 setae. Seta $h2$ is spatulate, short *R. davisi*
Note. Known only from Australia. Occurs on Ericaceae plants.
- 6 (5) In females and males, on tarsi I–II (Fig. 10), tactile seta ft is 2 or more times longer than solenidion ω . Females and males have 3 setae on genu I–II (Fig. 9). Seta $h2$ is hair-like (Fig. 8) *R. indica*

Table 2
Values of quantitative
diagnostic characters of *Raoiella indica*
males and females

Character	Females (n = 19)	Males (n = 8)
Length $c1$, μm	49.6 ± 0.6	34.9 ± 0.6
Length $d1$, μm	32.3 ± 1.0	25.2 ± 0.6
Length $e1$, μm	17.9 ± 0.7	13.1 ± 0.7
Length $c1 - d1$, μm	41.3 ± 1.1	23.9 ± 0.5
Length $h1$, μm	62.1 ± 0.7	22.6 ± 0.4
Length $h2$, μm	54.1 ± 0.7	24.4 ± 0.5
Length ratio $h2$ to $h1$	0.87 ± 0.01	1.07 ± 0.02
Length ratio ft to ω on tarsus I	> 3	> 2
Length ratio ft to ω on tarsus II	> 3	> 2

**Определительная
таблица
для дифференциации
Raoiella indica
от остальных видов рода**

- 1 (2) На тазиках III и IV по одной щетинке другие виды
- 2 (1) На тазиках III и IV щетинок нет 3
- 3 (4) Длина дорсоцентральных щетинок последовательно уменьшается от первой (*c1*) к третьей паре (*e1*), при этом длина первой пары (*c1*) примерно равна расстоянию между первым и вторым рядами дорсоцентральных щетинок или превышает его 5
- 4 (3) Состояние признаков иное другие виды
- 5 (6) У самок и самцов на лапке I–II тактильная щетинка *ft*" ненамного больше соленидия ω ". У самок на колене I–II по 2 щетинки, у самцов – 3. Щетинка *h2* шпательевидная, короткая *R. davis*
- Примечание. Известен только из Австралии. Обитает на растениях сем. Ericaceae.
- 6 (5) У самок и самцов на лапках I–II (рис. 10) тактильная щетинка *ft*" в 2 и более раза длиннее соленидия ω ". У самок и самцов на колене I–II по 3 щетинки (рис. 9). Щетинка *h2* волосовидная (рис. 8) *R. indica*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Красный пальмовый клещ является активным инвайдером, который за последние десятилетия занял пантропический ареал. В связи с этим представляется возможным его занос на территорию Южного федерального округа Российской Федерации, определенную как потенциальный ареал вида.

Для практических целей, т. к. видовая идентификация основана на признаках взрослых особей (преимущественно самок), в работе приведена определительная таблица важнейших жизненных стадий подавляющего большинства представителей клещей семейства Tenuipalpidae.

Анализ признаков дорсоцентрального хетомы, приведенных в работах Beard et al. (2012, 2018), показал, что *Raoiella indica* хорошо дифференцируется от подавляющего большинства видов рода (кроме *R. davis*) по последовательному уменьшению длин дорсоцентральных щетинок и длинной первой паре этих щетинок. Различия между *R. indica* и *R. davis* проявляются по следующим признакам: количество щетинок на колене первой и второй пар ног, форма щетинок *h2*, отношения длин проксимальных соленидия ω " и тактильной щетинки *ft*" на лапках первой пары ног. В работе были исследованы с проведением морфометрии диагностические признаки дорсоцентрального хетомы, хетомы каудальной области и конечностей особей доминиканской популяции *R. indica*.

На основе сводки Beard et al. (2018) и с учетом работ Pritchard, Baker (1958) и Митрофанова, Струнковой (1979) составлена упрощенная

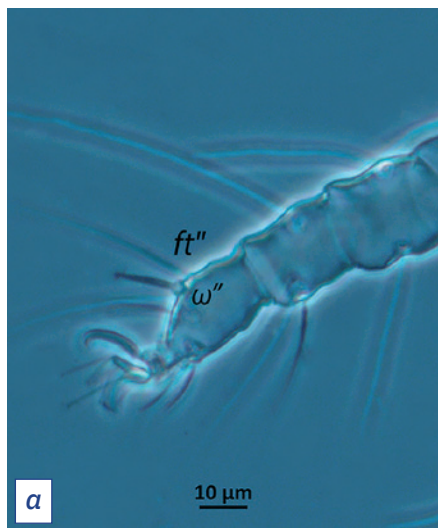


Рис. 10. Особенности хетотаксии левой лапки первой пары ног самки *R. indica*. Обозначены соответствующие щетинки (фото И.О. Камаева)

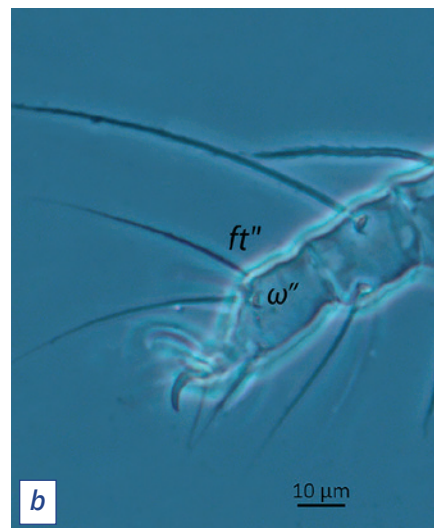


Fig. 10. Features of chaetotaxy of the left tarsus of the first pair of legs of the *R. indica* female. The corresponding setae are indicated (photos by I.O. Kamayev)

CONCLUSION

The red palm mite is an active invader that has occupied the pantropical range in recent decades. In this regard, its introduction into the territory of the Southern Federal District of the Russian Federation is possible, which is defined as a potential range of the species.

For practical purposes, since species identification is based on the adult characters (mainly females), the paper provides a key to the most important life stages of the vast majority of the family Tenuipalpidae members.

Analysis of the characters of the dorsocentral chaetome given in the works of Beard et al. (2012, 2018) showed that *Raoiella indica* is well differentiated from the vast majority of species of the genus (except *R. davis*) by the successive decrease in the length of dorsocentral setae and the long first pair of these setae. Differences between *R. indica* and *R. davis* are manifested in the following characters: the number of setae on the genu of the first and second pairs of legs, the shape of the setae *h2*, the ratio of the lengths of the proximal solenidion ω " and the tactile seta *ft*" on the tarsi of the first pair of legs. In this work, the diagnostic characters of the dorsocentral chaetome, chaetome of the dorsoposterior part of body and legs of individuals of the Dominican population of *R. indica* were studied using morphometry.

Based on a report by Beard et al. (2018) and taking into account the works of Pritchard, Baker (1958) and Mitrofanov, Strunkova (1979), a simplified key table was developed for differentiating *R. indica* from other species of the genus.

Acknowledgment. The author expresses his gratitude to the leading specialists of FGBU "VNIIEK" PhD in Biology M.K. Mironova and PhD in Biology V.N. Zhimeikin for help in carrying out this work, the staff of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences

определяющая таблица для дифференциации *R. indica* от остальных видов рода.

Благодарность. Автор выражает благодарность ведущим специалистам ФГБУ «ВНИИКР» кандидатам биологических наук М.К. Мироновой и В.Н. Жимерикину за помощь при выполнении данной работы, сотрудникам Зоологического института РАН (г. Санкт-Петербург), особенно доктору биологических наук О.Г. Овчинниковой и Г.М. Сулеймановой, за помощь в поиске некоторых редких источников.

Работа выполнена в рамках НИР по государственному заданию (НИОКТР № 5121042600339-5).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вайнштейн Б., 1960. Тетраниховые клещи Казахстана (с ревизией семейства). – Тр. НИИЗР. Каз. Филиал ВАСХНИЛ. Т. 5, 276 с.
2. Вайнштейн Б. Семейство Tenuipalpidae / Определитель обитающих в почве клещей Trombidiformes. – М.: Наука, 1978, с. 206.
3. Митрофанов В., Стрункова З. Определитель клещей-плоскотелок. – Душанбе: Дониш, 1979, 148 с.
4. Митрофанов В., Стрункова З., Лившиц И. Определитель тетраниховых клещей фауны СССР и сопредельных стран. – Душанбе: Дониш, 1987, 224 с.
5. Рекк Г. Фауна Закавказья. Определитель тетраниховых клещей. – Тбилиси: Изд-во АН Грузинской ССР, 1959, 152 с.
6. Baker E., Wharton G. An Introduction to Acarology. – The Macmillan Co. of New York and Toronto, 1952, 465 p.
7. Beard J., Ochoa R., Bauchan G., Pooley C., Dowling A., 2018. *Raoiella* of the world (Trombidiformes: Tetranychidae: Tenuipalpidae). – Zootaxa, 4501 (1): 1–301. URL: <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.4501.1.1>.
8. Dowling A., Ochoa R., Welbourn W., Beard J., 2010. *Raoiella indica*: (Acari: Tenuipalpidae): a rapidly expanding generalist among specialist congeners. – XIII International Congress of Acarology, Recife, Brazil, 23–27 August, p. 72–73.
9. Dowling A., Ochoa R., Beard J., Welbourn W., Ueckermann E., 2012. Phylogenetic investigation of the genus *Raoiella* (Prostigmata: Tenuipalpidae): diversity, distribution, and world invasions. – Experimental and Applied Acarology, 57 (3–4): 257–269. URL: <https://doi.org/10.1007/s10493-011-9483-z>.
10. Hata F., Silva J., Ventura M., Pasini A., Roggia S., 2017. First report of *Raoiella indica* (Hirst) (Acari: Tenuipalpidae) in southern Brazil. – Neotropical Entomology, 46 (3): 356–359. URL: <https://doi.org/10.1007/s13744-016-0468-9>.
11. Hatzinikolis E., 1987. A Revision of Tenuipalpid Mites of Greece (Acari: Tenuipalpidae). – Entomologia Hellenica, 5 (2): 47–60.
12. Hirst S., 1924. LV. – On some new species of red spider. – Annals and Magazine of Natural History, Series 9, Vol. 14, Issue 83: 522–527.
13. Krantz G., Walter D. (eds.). A Manual of Acarology. Third Edition. – Texas Tech University Press, Lubbock, Texas, 2009, 807 p.
14. Lindquist E., 1985. External anatomy. In: Spider mites: their biology, natural enemies and (St. Petersburg), especially Advanced Doctor of Biology O.G. Ovchinnikova and G.M. Suleymanova, for help in finding some rare sources.
15. The work was carried out within the framework of research under the state order (NIOKTR No. 5121042600339-5).

REFERENCES

1. Wainstein B. Tetranychoid mites of Kazakhstan (with revision of the family). Trudy Nauchno-Issled. Inst. Zashchita Rastenii Kazakh. 1960; 5: 1–276 (in Russian).
2. Wainstein B. Family Tenuipalpidae / Определитель обитавших в почве клещей Trombidiformes [Key to soil-dwelling mites of Trombidiformes]. Moscow: Nauka, 1978, p. 206 (in Russian).
3. Mitrofanov V., Strunkova Z. Opredelitel' kleshchey-ploskotelok [Key to the flat mites]. Dushanbe: Donish, 1979, 148 p. (in Russian).
4. Mitrofanov V., Strunkova Z., Livshits I. Opredelitel' tetranikhovykh kleshchey fauny SSSR i sopredel'nykh stran (Tetranychidae, Bryobiidae) [Key to the tetranychid mites (Tetranychidae, Bryobiidae) of the fauna of the USSR and adjacent countries]. Dushanbe: Donish, 1987, 224 p. (in Russian).
5. Reck G. Fauna Zakavkaz'ya. Opredelitel' tetranikhovykh kleshchey [Fauna of TransCaucasus. A key to the tetranychoid mites]. Tbilisi: Academy of Sciences of the Georgian SSR, 1959, 152 p. (in Russian).
6. Baker E., Wharton G. An Introduction to Acarology. The Macmillan Co. of New York and Toronto, 1952, 465 p.
7. Beard J., Ochoa R., Bauchan G., Pooley C., Dowling A. *Raoiella* of the world (Trombidiformes: Tetranychidae: Tenuipalpidae). Zootaxa, 2018; 4501 (1): 1–301. URL: <https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.4501.1.1>.
8. Dowling A., Ochoa R., Welbourn W., Beard J. *Raoiella indica*: (Acari: Tenuipalpidae): a rapidly expanding generalist among specialist congeners. XIII International Congress of Acarology, Recife, Brazil, 23–27 August, 2010; p. 72–73.
9. Dowling A., Ochoa R., Beard J., Welbourn W., Ueckermann E. Phylogenetic investigation of the genus *Raoiella* (Prostigmata: Tenuipalpidae): diversity, distribution, and world invasions. Experimental and Applied Acarology, 2012; 57 (3–4): 257–269. URL: <https://doi.org/10.1007/s10493-011-9483-z>.
10. Hata F., Silva J., Ventura M., Pasini A., Roggia S. First report of *Raoiella indica* (Hirst) (Acari: Tenuipalpidae) in southern Brazil. Neotropical Entomology, 2017; 46 (3): 356–359. URL: <https://doi.org/10.1007/s13744-016-0468-9>.
11. Hatzinikolis E. A Revision of Tenuipalpid Mites of Greece (Acari: Tenuipalpidae). Entomologia Hellenica, 1987; 5 (2): 47–60.
12. Hirst S. LV. – On some new species of red spider. Annals and Magazine of Natural History, 1924; Series 9, Vol. 14, Issue 83: 522–527.
13. Krantz G., Walter D. (eds.). A Manual of Acarology. Third Edition. Texas Tech University Press, Lubbock, Texas, 2009, 807 p.

control. – Amsterdam: Elsevier Sci. Publ. B.V., 1A (1.1): 3–28.

15. Martens J., 1978. Spinnentiere, Arachnida: Weberknechte, Opiliones. In: Die Tierwelt Deutschlands. – Jena: G. Fischer Verlag, 64: 1–464.

16. Mesa N., Ochoa R., Welbourn W., Evans G., Moraes G., 2009. A catalog of the Tenuipalpidae (Acari) of the world with a key to genera. – *Zootaxa*, 2098: 1–185. URL: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2098.1.1>.

17. Mohanasundaram M., 1985. A new species of *Raoiella* (Acari: Tenuipalpidae) from Tamil Nadu. – *Indian Journal of Acarology*, 10 (1–2): 31–33.

18. Pritchard A., Baker E., 1955. A revision of the spider mite family Tetranychidae. – *Memoirs Series*, San Francisco, Pacific Coast Entomological Society, 2: 1–472.

19. Pritchard A., Baker E., 1958. The false spider mites (Acarina: Tenuipalpidae). – *University of California Publications in Entomology*, 14: 175–274.

20. Roda A., Dowling A., Welbourn C., Peña J., Rodrigues J., Hoy M., Ochoa R., Duncan R., De Chi W., 2008. Red palm mite situation in the Caribbean and Florida. – *Proceedings of the Caribbean Food Crops Society*, 44 (1): 80–87.

21. Ueckermann E., Palevsky E., Gerson U., Recht E., Theron P., 2018. The Tenuipalpidae (Acari: Trombidiformes) of Israel. – *Acarologia*, 58 (2): 483–525. URL: <https://doi.org/10.24349/acarologia/20184255>.

22. Beard J.J., Ochoa R., Baughan G.R., Trice M.D., Redford A.J., Walters T.W., Mitter C. Flat Mites of the World, Edition 2. Identification Technology Program, CPHST, PPQ, APHIS, USDA; Fort Collins, CO. 2012 [Электронный ресурс]. URL: <http://idtools.org/id/mites/flatmites/> (дата обращения: 10.03.2022).

23. CABI. Invasive Species Compendium, 2022 [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/46792> (дата обращения: 09.03.2022).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Камаев Илья Олегович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией экологии и генетики насекомых и клещей научно-методического отдела энтомологии, ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; *ORCID 0000-0003-4251-4862*, e-mail: ilyakamayev@yandex.ru.

14. Lindquist E. External anatomy. In: Spider mites: their biology, natural enemies and control. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ. B.V., 1985; 1A (1.1): 3–28.

15. Martens J. Spinnentiere, Arachnida: Weberknechte, Opiliones. In: Die Tierwelt Deutschlands. Jena: G. Fischer Verlag, 1978; 64: 1–464.

16. Mesa N., Ochoa R., Welbourn W., Evans G., Moraes G. A catalog of the Tenuipalpidae (Acari) of the world with a key to genera. *Zootaxa*, 2009; 2098: 1–185. URL: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2098.1.1>.

17. Mohanasundaram M. A new species of *Raoiella* (Acari: Tenuipalpidae) from Tamil Nadu. *Indian Journal of Acarology*, 1985; 10 (1–2): 31–33.

18. Pritchard A., Baker E. A revision of the spider mite family Tetranychidae. – *Memoirs Series*, San Francisco, *Pacific Coast Entomological Society*, 1955; 2: 1–472.

19. Pritchard A., Baker E. The false spider mites (Acarina: Tenuipalpidae). *University of California Publications in Entomology*, 1958; 14: 175–274.

20. Roda A., Dowling A., Welbourn C., Peña J., Rodrigues J., Hoy M., Ochoa R., Duncan R., De Chi W. Red palm mite situation in the Caribbean and Florida. *Proceedings of the Caribbean Food Crops Society*, 2008; 44 (1): 80–87.

21. Ueckermann E., Palevsky E., Gerson U., Recht E., Theron P. The Tenuipalpidae (Acari: Trombidiformes) of Israel. *Acarologia*, 2018; 58 (2): 483–525. URL: <https://doi.org/10.24349/acarologia/20184255>.

22. Beard J.J., Ochoa R., Baughan G.R., Trice M.D., Redford A.J., Walters T.W., Mitter C. Flat Mites of the World, Edition 2. Identification Technology Program, CPHST, PPQ, APHIS, USDA; Fort Collins, CO. 2012 [Electronic resource]. URL: <http://idtools.org/id/mites/flatmites/> (last accessed: 10.03.2022).

23. CABI. Invasive Species Compendium, 2022 [Electronic resource]. URL: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/46792> (last accessed: 09.03.2022).

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Ilya Kamayev, PhD in Biology, Senior Researcher, Head of the Ecology and Genetics of Insects and Mites Laboratory of the Research and Methodological Department of Entomology of FGBU “VNIICR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; *ORCID 0000-0003-4251-4862*, e-mail: ilyakamayev@yandex.ru.

К диагностике нематод рода *Globodera*, связанных с подкарантинной продукцией

Е.А. ХУДЯКОВА¹, С.В. СУДАРИКОВА²

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия

¹ e-mail: fer59@mail.ru

² e-mail: sudarikovah@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Цистообразующие нематоды рода *Globodera* паразитируют на корнях растений. Два вида – золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis* и бледная картофельная нематода *Globodera pallida* – являются карантинными для многих стран мира, в том числе для Российской Федерации. Был проанализирован материал по растениям – хозяевам нематод рода *Globodera*. Восемь видов нематод этого рода паразитируют на растениях семейства Solanaceae, за исключением картофеля. Помимо того, существует большая группа нематод рода *Globodera*, паразитирующих на растениях семейства Asteraceae. Представлены также результаты исследования по географическому распространению *Globodera*, возможным путям распространения. При лабораторных исследованиях в почвенных образцах и в подкарантинной продукции бывают случаи выявления некарантинных видов цистообразующих нематод рода *Globodera*, а также смешанных популяций карантинных и некарантинных видов. Правильная диагностика важна для установления фитосанитарного состояния продукции. Идентификация морфологическим методом близкородственных видов рода *Globodera* может быть затруднена из-за схожести некоторых характеристик строения нематод. В статье представлен дифференциальный диагноз, позволяющий отделить карантинные виды от некарантинных по морфологическим признакам. Даны описания трех некарантинных видов, которые периодически встречались при лабораторных исследованиях. Поскольку карантинные виды *Globodera rostochiensis* и *Globodera pallida* могут распространяться не только с картофелем, но и с частицами почвы на корневищах и луковицах цветочных растений и другом посадочном материале, в статье представлен полный перечень продукции (с указанием кодов ТН ВЭД), которая подлежит лабораторным исследованиям. При идентификации нематод до вида очень важен четкий подход к понятиям, обозначаемым отдельными терминами, и единообразие промеров. Определены разночтения в терминологии и промерах морфометрических признаков, которые важно учитывать при диагностике.

Ключевые слова. Карантин, подкарантинная продукция, цистообразующие нематоды, географическое распространение, морфология нематод, типовые локализации.

On diagnosis of *Globodera* genus nematodes connected with regulated products

E.A. KHUDYAKOVA¹, S.V. SUDARIKOVA²

FGBU "All-Russian Plant Quarantine Center" (FGBU "VNIKIR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia

¹ e-mail: fer59@mail.ru

² e-mail: sudarikovah@mail.ru

ABSTRACT

Cyst nematodes of the genus *Globodera* colonize root plants. Two species – golden potato nematode *Globodera rostochiensis* and pale potato cyst nematode *Globodera pallida* – are quarantine pests for many countries, including the Russian Federation. The material on host plants of *Globodera* nematodes has been analyzed. Eight nematode species of this genus colonize Solanaceae family plants, except for potato. Besides, there is a large *Globodera* nematode group colonizing Asteraceae. The work also presents the results of geographical distribution of *Globodera*, as well as possible pathways. In laboratory studies of soil samples and regulated products, there are cases of detection of non-quarantine species of *Globodera* cyst nematodes, as well as mixed populations of quarantine and non-quarantine species. Proper diagnosis is important to establish the phytosanitary status of products. Identification by morphological method of closely related species of the genus *Globodera* can be difficult due to the similarity of some characteristics of the nematode structure. The article presents a differential diagnosis that makes it possible to separate quarantine species from non-quarantine ones by morphological features. Descriptions are given of three non-quarantine species that periodically occurred in laboratory studies. Since the quarantine species *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida* can spread not only with potatoes, but also with soil particles on the rhizomes and bulbs of flower plants and other planting material, the article provides a complete list of products (indicating the Commodity Classification of Foreign Trade Activity codes) that are subject to laboratory research. When identifying nematodes to a species, a clear approach to the concepts denoted by individual terms and the uniformity of measurements are very important. Discrepancies in the terminology and measurements of morphometric features are determined, which are important to consider in the diagnosis.

Key words. Plant quarantine, quarantine products, cyst nematodes, geographical distribution, nematode morphology, typical localizations.

ВВЕДЕНИЕ



ва вида цистообразующих нематод из рода *Globodera* семейства Heteroderidae – золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis* и бледная картофельная нематода *Globodera pallida* – являются карантинными для ЕАЭС видами. Это опасные эндопаразиты корней картофеля, которые наносят большой ущерб урожаю картофеля. Также они поражают томаты, баклажаны, некоторые виды паслена. Картофельные нематоды были завезены в Европу, Азию и другие регионы мира из Южной Америки с посадочным материалом (клубнями картофеля).

Золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis* – объект внешнего и внутреннего карантина во многих странах мира. В настоящее время она встречается в 51 субъекте РФ на площади 39,2 тыс. га (Национальный доклад, 2022). Эта нематода представлена в России только патотипом Ro1 (Ефременко и др., 1988; Лиманцева, 2010). Бледная картофельная нематода *Globodera pallida*, близкий по биологическим особенностям вид, но более агрессивный, отсутствует в России и является объектом внешнего карантина. Очень важно не допустить проникновения этого вида на территорию РФ. В 2008 г. в США, в штатах Айдахо и Орегон, обнаружен новый вид *Globodera ellingtonae*, который поражает картофель, но пока еще не включен в карантинные списки (Zasada et al., 2013a; Zasada et al., 2013b).

При лабораторных исследованиях в образцах выявляются как карантинные, так и некарантинные виды рода *Globodera*. Изучение морфологических признаков некарантинных видов рода *Globodera* и их дифференциальный диагноз имеют большое значение для правильной идентификации. Это очень важно при установлении фитосанитарного состояния продукции. Ниже приводится описание некарантинных видов рода *Globodera*, не паразитирующих на картофеле, но встречающихся в исследуемых образцах. Надо отметить, что в случае затруднений при морфологической идентификации исследование проводят методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

При проведении исследований был использован оригинальный сравнительный материал по близким видам, собранный исполнителями ранее на территории Российской Федерации. Были использованы все необходимые и доступные литературные источники и электронные базы данных.

Материалом для исследований были образцы почвы, растений, яйца, личинки, взрослые особи, цисты нематод различных видов рода *Globodera*. Исследовали образцы почвы с приусадебных участков и из-под луговой растительности происхождением из Московской, Тульской, Орловской, Рязанской областей, Дальнего Востока, а также импортный и отечественный материал, поступивший на экспертизу. Всего было исследовано 28 образцов. Изготовление временных и постоянных препаратов, определение видового состава нематод осуществляли в соответствии с общепринятыми методиками. Данные о географической распространенности

INTRODUCTION

Two species of cyst nematodes from the genus *Globodera* of the family Heteroderidae – golden potato nematode *Globodera rostochiensis* and pale potato cyst nematode *Globodera pallida* – are quarantine species for the EAEU. These are dangerous endoparasites of potato roots that cause great damage to the potato crop. They also infect tomatoes, eggplants, some Solanaceae species. Potato nematodes were introduced in Europe, Asia and other regions of the world from South America with planting material (potato tubers).

Golden potato nematode *Globodera rostochiensis* is an object of external and internal quarantine in many countries. Currently, it occurs in 51 constituent entities of the Russian Federation on an area of 39.2 thousand hectares (National report, 2022). This nematode is represented in Russia only by the Ro1 pathotype (Efremenko et al., 1988; Limantseva, 2010). Pale potato cyst nematode *Globodera pallida* is a species similar in biological characteristics, but more aggressive, is absent in Russia and is an object of external plant quarantine. It is very important to prevent the introduction of this species into the territory of the Russian Federation. In 2008, a new species, *Globodera ellingtonae*, was discovered in the US in Idaho and Oregon, which infects potatoes, but has not yet been included in plant quarantine lists (Zasada et al., 2013a; Zasada et al., 2013b).

In laboratory studies, both quarantine and non-quarantine species of the genus *Globodera* are detected in the samples. The study of morphological characters of *Globodera* non-quarantine species and their differential diagnosis are of great importance for correct identification. This is essential when establishing the phytosanitary status of products. Below is a description of *Globodera* non-quarantine species that do not colonize on potatoes, but are detected in the studied samples. It should be noted that in case of difficulties in morphological identification, the study is carried out by the polymerase chain reaction (PCR) method.

MATERIALS AND METHODS

During the research, original comparative material on closely related species, collected by the performers earlier on the territory of the Russian Federation, was used. All necessary and available literary sources and electronic databases were used.

The material for the study was soil samples, plants, eggs, larvae, adults, nematode cysts of various *Globodera* species. We studied soil samples from home gardens and from under meadow vegetation originating from the Moscow Oblast, Tula Oblast, Oryol Oblast, Rязан Oblast, the Far East, as well as imported and domestic material submitted for examination. A total of 28 samples were examined. The manufacture of temporary and permanent slides, determination of the species composition of nematodes was carried out in accordance with generally accepted methods. Data on the geographical distribution of *Globodera* were obtained on the basis of the results of our own research, as well as the systematization of disparate primary sources and reports from a number of scientific and government

глободер получены на основе результатов собственных исследований, а также систематизации разрозненных первоисточников и отчетов ряда научных и государственных учреждений и сведены в таблицу. Для изучения коллекционного материала применялись традиционные в гельминтологии методы приготовления микропрепаратов и микроскопирование с помощью микроскопа Axio Imager A1 (Karl Zeiss, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ литературных данных показал, что род *Globodera* включает 14 действительных видов:

- 1) *Globodera agulhasensis* Knoetze, Swart, Wentzel & Tiedt, 2017;
- 2) *Globodera arenaria* Chizhov, Udalova & Nasonova, 2008;
- 3) *Globodera artemisiae* (Eroshenko & Kazachenko, 1972) Behrens, 1975;
- 4) *Globodera capensis* Knoetze, Swart & Tiedt, 2013;
- 5) *Globodera ellingtonae* Handoo, Carta, Skantar & Chitwood, 2012;
- 6) *Globodera leptonepia* (Cobb & Taylor, 1953) Skarbilovich, 1959;
- 7) *Globodera mali* (Kirjanova & Borisenko, 1975) Behrens, 1975;
- 8) *Globodera mexicana* Subbotin, Mundo-Ocampo & Baldwin, 2010;
- 9) *Globodera millefolii* (Kirjanova & Krall, 1965) Behrens, 1975; синоним: *Globodera achilleae* (Golden & Klindic, 1973) Behrens, 1975;
- 10) *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975;
- 11) *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Skarbilovich, 1959;
- 12) *Globodera sandveldensis* Knoetze, Swart, Wentzel & Tiedt, 2017;
- 13) *Globodera tabacum sensu lato* (Lownsbery & Lownsbery, 1954) Skarbilovich, 1959;
- 14) *Globodera zelandica* Wouts, 1984.

Цистообразующие нематоды, принадлежащие к роду *Globodera*, паразитируют на растениях, принадлежащих к семейству Solanaceae либо Asteraceae. Филогенетический анализ последовательностей ДНК выявил 3 основные группы видов *Globodera* (Subbotin et al., 2011).

Первая группа – это нематоды, паразитирующие на пасленовых растениях, включая группу видов *G. tabacum* из Северной Америки. Было идентифицировано по крайней мере 8 видов *Globodera*, паразитирующих на Solanaceae. Все 8 видов паразитируют и на томатах, но картофель не является для них растением-хозяином (Subbotin et al., 2019).

Ко второй группе относятся 3 вида картофельных цистообразующих нематод – золотистая картофельная *Globodera rostochiensis*, бледная картофельная нематода *Globodera pallida*, которые паразитируют на картофеле и вызывают значительные экономические потери картофеля во всем мире, а также *Globodera ellingtonae*.

К третьей группе нематод рода *Globodera* относятся виды, паразитирующие не на пасленовых растениях, включая небольшую группу видов глободер из Европы, паразитирующих на Asteraceae (Stone, 1973). Недавно в Западно-Капской провинции Южно-Африканской Республики были обнаружены 3 новых вида глободер, которые также входят в клад глободер, паразитирующих на неполянистых

institutions, and are summarized in a table. To study the collection material, traditional methods of slide preparation in helminthology and microscopy using an Axio Imager A1 microscope (Karl Zeiss, Germany) were used.

RESULTS AND DISCUSSION

An analysis of the literature data showed that the genus *Globodera* includes 14 valid species:

- 1) *Globodera agulhasensis* Knoetze, Swart, Wentzel & Tiedt, 2017;
- 2) *Globodera arenaria* Chizhov, Udalova & Nasonova, 2008;
- 3) *Globodera artemisiae* (Eroshenko & Kazachenko, 1972) Behrens, 1975;
- 4) *Globodera capensis* Knoetze, Swart & Tiedt, 2013;
- 5) *Globodera ellingtonae* Handoo, Carta, Skantar & Chitwood, 2012;
- 6) *Globodera leptonepia* (Cobb & Taylor, 1953) Skarbilovich, 1959;
- 7) *Globodera mali* (Kirjanova & Borisenko, 1975) Behrens, 1975;
- 8) *Globodera mexicana* Subbotin, Mundo-Ocampo & Baldwin, 2010;
- 9) *Globodera millefolii* (Kirjanova & Krall, 1965) Behrens, 1975; synonym: *Globodera achilleae* (Golden & Klindic, 1973) Behrens, 1975;
- 10) *Globodera pallida* (Stone, 1973) Behrens, 1975;
- 11) *Globodera rostochiensis* (Wollenweber, 1923) Skarbilovich, 1959;
- 12) *Globodera sandveldensis* Knoetze, Swart, Wentzel & Tiedt, 2017;
- 13) *Globodera tabacum sensu lato* (Lownsbery & Lownsbery, 1954) Skarbilovich, 1959;
- 14) *Globodera zelandica* Wouts, 1984.

Globodera cyst nematodes colonize on plants belonging to the Solanaceae or Asteraceae families. Phylogenetic analysis of DNA sequences revealed 3 main groups of *Globodera* species (Subbotin et al., 2011).

The first group are nematodes colonizing on Solanaceae, including the *G. tabacum* species group from North America. At least 8 *Globodera* species have been identified as parasites on Solanaceae. All 8 species also colonize on tomatoes, but potato is not a host plant for them (Subbotin et al., 2019).

The second group includes 3 species of potato cyst nematodes – golden potato nematode *Globodera rostochiensis*, pale potato cyst nematode *Globodera pallida*, which colonize on potatoes and cause significant economic losses of potatoes worldwide, as well as *Globodera ellingtonae*.

The third *Globodera* group includes species colonizing not on Solanaceae, including a small group of *Globodera* species from Europe parasitizing Asteraceae (Stone, 1973). Recently, in the Western Cape of South Africa, 3 new *Globodera* species have been detected, which are also included in the *Globodera* clade parasitizing non-weedy plants (Subbotin et al., 2011). This confirms the theory of the Gondwanan origin of the genus that the divergence of the two main *Globodera* lineages could occur after the separation of the continents of Africa and South America (Subbotin et al., 2011). Data on the distribution of *Globodera* species are given in the table.

Таблица

Распространение видов *Globodera** по географическим регионам

Table

Distribution of *Globodera** species according to geographic regions

Европа Europe	Африка Africa	Азия Asia	Северная и Центральная Америка North and Central America	Южная Америка South America	Океания Oceania
<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. rostochiensis</i>	<i>G. rostochiensis</i>
<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>	<i>G. pallida</i>
<i>G. artemisiae</i>	<i>G. agulhasensis</i>	<i>G. artemisiae</i>	<i>G. bravoae</i> = <i>G. mexicana</i>	<i>G. leptonepia</i>	<i>G. zelandica</i>
<i>G. tabacum</i>	<i>G. tabacum</i>	<i>G. tabacum</i>	<i>G. tabacum</i>	<i>G. tabacum</i>	
<i>G. arenaria</i>	<i>G. capensis</i>	<i>G. mali</i>	<i>G. ellingtonae</i>		
<i>G. millefolii</i>	<i>G. sandveldensis</i>				

* Каждый вид *Globodera* выделен отдельным цветом.

* Each *Globodera* species is marked in a different colour.

растениях (Subbotin et al., 2011). Это подтверждает теорию гондванского происхождения рода о том, что расхождение двух основных линий глободер могло произойти после разделения континентов Африки и Южной Америки (Subbotin et al., 2011). Данные по распространению видов нематод рода *Globolera* приведены таблице.

Globodera bravoae была описана на сарахе съедобной *Jaltomata procumbens* в Мексике, также является синонимом *G. mexicana* (= *G. bravoae* n. syn.) (Subbotin et al., 2019).

Нематоды рода *Globodera* распространены в Европе (6 видов), Северной и в Центральной Америке (5 видов), Азии (5 видов), Южной Америке (4 вида), Океании (3 вида) и Африке (6 видов) (Subbotin et al., 2010).

G. rostochiensis и *G. pallida* присутствуют на всех континентах, но местом происхождения считается Южная Америка (Turner, Evans, 1998).

Наиболее часто в отечественном и импортном материале встречается золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis*, но нередко попадают и некарантинные виды нематод – *Globodera millefolii*, *Globodera tabacum* и *Globodera artemisiae*. Поэтому необходимо отличать карантинные виды от некарантинных.

Анализ образцов почвы из приусадебных участков показал присутствие вида *Globodera rostochiensis* в 20 образцах. В трех образцах отечественного и импортного происхождения были обнаружены некарантинные виды, были проанализированы их основные морфологические характеристики, позволяющие провести дифференциальный диагноз. Ниже мы приводим описание признаков этих видов нематод.

Globodera millefolii (Kirjanova & Krall, 1965) Behrens, 1975 – тысячелистниковая цистообразующая нематода

Globodera millefolii интересна тем, что ее типовые местонахождения (Эстония и Россия) географически далеки от мест обитания картофельных цистообразующих нематод, а также тем, что типовое растение-хозяин принадлежит к семейству Asteraceae, а не Solanaceae. Размножается на тысячелистнике, ромашке, трехребернике, нивянике, пижме, купальнице, хризантеме. Может

Globodera bravoae was described on *Jaltomata procumbens* in Mexico, is also a synonym for *G. mexicana* (= *G. bravoae* syn. n.) (Subbotin et al., 2019).

Globodera nematodes are spread in Europe (6 species), North and Central America (5 species), Asia (5 species), South America (4 species), Oceania (3 species) and Africa (6 species) (Subbotin et al., 2010).

G. rostochiensis and *G. pallida* occur on all continents, but are considered to originate from South America (Turner, Evans, 1998).

Most often detected in domestic and imported material is golden potato nematode *Globodera rostochiensis*, but non-quarantine nematode species are often detected too – *Globodera millefolii*, *Globodera tabacum* and *Globodera artemisiae*. Therefore, it is necessary to distinguish between quarantine and non-quarantine species.

Analysis of soil samples from household plots showed the presence of the species *Globodera rostochiensis* in 20 samples. In three samples of domestic and imported origin, non-quarantine species were detected, their main morphological characters were analyzed, allowing for a differential diagnosis. Below we provide a description of the features of these nematode species.

Globodera millefolii (Kirjanova & Krall, 1965) Behrens, 1975

Globodera millefolii is interesting because its type localities (Estonia and Russia) are geographically far from the habitats of potato cyst nematodes, and also because the type host plant belongs to the family Asteraceae, and not Solanaceae. Propagated on yarrow, chamomile, wild chamomile, daisy, tansy, globeflower, chrysanthemum. It occurs in household plots, along fields, in meadows. Does not breed on wormwood (Zinovieva, Chizhov, 2012).

Cysts of the studied species were of domestic origin, were identified during the examination (Fig. 1).

Eggs (n = 10): length, 130–133 (132) µm; width – 50–52 (51) microns; length to width ratio – 2.6.

Cysts (n = 3): length, 550–585 (568) µm; width, 354–367 (360) µm; length to width ratio – 1.6; fenestra diameter, 18–22.5 (20) µm; the distance from the edge

встретиться на приусадебных участках, вдоль полей, на лугах. На полыни не размножается (Зиновьева, Чижов, 2012).

Цисты исследуемого вида имели отечественное происхождение, были выявлены при экспертизе (рис. 1).

Яйца ($n = 10$): длина – 130–133 (132) мкм; ширина – 50–52 (51) мкм; отношение длины к ширине – 2,6.

Цисты ($n = 3$): длина – 550–585 (568) мкм; ширина – 354–367 (360) мкм; отношение длины к ширине – 1,6; диаметр фенестры – 18–22,5 (20) мкм; расстояние от края фенестры до ануса – 26–33 (30) мкм; индекс Гранека – 1,5.

Личинки 2-го возраста ($n = 10$): длина – 495–503 (499) мкм; $a = 22$; $c = 9,6$; стилет – 23,8–24,5 (24) мкм; ширина тела – 21–24 (23) мкм; длина хвоста – 50–54 (52) мкм.

Дифференциальный диагноз. Нематода *G. millefolii* сходна с *G. artemisiae*, от которой она отличается более длинным стилетом личинки 2-го возраста (25 против 22–24 мкм), различными видами растений-хозяев (Зиновьева, Чижов, 2012). От карантинного вида *G. rostochiensis* тысячелистниковая цистообразующая нематода *G. millefolii* отличалась меньшим количеством складок между анусом и вульвой (8 против 14–21), меньшим индексом Гранека (1,5 против 3,7), круговым рисунком кутикулярных складок вокруг вульвы и ануса, большим размером стилета (25 против 22). От *G. pallida* отличается более мелкими головками стилета инвазионных личинок, наклоненными назад, как у *G. rostochiensis*.

Globodera tabacum sensu lato (Lownsbery & Lownsbery, 1954) Skarbilovich, 1959 – табачная цистообразующая нематода

Хотя есть некоторые разногласия среди ученых по систематике *Globodera tabacum*, считается, что этот комплекс состоит из трех подвидов, отличающихся некоторыми морфологическими признаками, ареалом обитания и географическим распределением (Subbotin et al., 2019). Это следующие подвиды:

Globodera tabacum solanacearum;
Globodera tabacum tabacum;
Globodera tabacum virginiae.

Распространение

(<https://www.cabi.org/isc/datasheet/27037>):

Африка: Мадагаскар, Марокко;

Азия: Китай, Пакистан, Северная Корея, Япония;

Европа: Болгария, Греция, Испания, Италия, Словения, Франция, Югославия;

Америка: Аргентина, Канада, Куба, Колумбия, Мексика, США.

Жизненный цикл и биология комплекса *G. tabacum* очень похожи на таковые у картофельных цистообразующих нематод, хотя нематоды комплекса *G. tabacum* были изучены гораздо менее подробно. Паразитирует на пасленовых растениях, но не на картофеле.

of the fenestra to the anus, 26–33 (30) μm ; Granek index – 1.5.

Second instar larvae ($n = 10$): length, 495–503 (499) μm ; $a = 22$; $c = 9.6$; stylet, 23.8–24.5 (24) μm ; body width, 21–24 (23) μm ; tail length – 50–54 (52) μm .

Differential diagnosis. Nematode *G. millefolii* is similar to *G. artemisiae*, from which it differs in the longer stylet of the 2nd instar larvae (25 versus 22–24 μm), various host plant species (Zinovieva, Chizhov, 2012). *G. millefolii* differed from the quarantine species *G. rostochiensis* fewer folds between the anus and vulva (8 versus 14–21), smaller Granek index (1.5 versus 3.7), circular pattern of cuticular folds around the vulva and anus, larger stylet size (25 versus 22). From *G. pallida* it differs in smaller stylet heads of infective larvae, tilted backwards, as in *G. rostochiensis*.

Globodera tabacum sensu lato (Lownsbery & Lownsbery, 1954) Skarbilovich, 1959

Although there is some controversy among scholars on taxonomy of *Globodera tabacum*, it is believed that this complex consists of three subspecies that differ in some morphological characters, habitat, and geographical distribution (Subbotin et al., 2019). These are the following subspecies:

Globodera tabacum solanacearum;
Globodera tabacum tabacum;
Globodera tabacum virginiae.

Distribution (<https://www.cabi.org/isc/datasheet/27037>):

Africa: Madagascar, Morocco;

Asia: China, Pakistan, North Korea, Japan;

Europe: Bulgaria, Greece, Spain, Italy, Slovenia, France, Yugoslavia;

America: Argentina, Canada, Cuba, Colombia, Mexico, USA.

Life cycle and biology of the complex *G. tabacum* very similar to those of potato cyst nematodes, although the nematodes of the complex *G. tabacum* have been studied in much less detail. It parasitizes Solanaceae plants, but not on potatoes.

The studied cysts of *G. tabacum* were of European origin (Fig. 2).

Eggs ($n = 10$): length, 95–98 (97) μm ; width, 43–53 (48) μm ; length to width ratio – 2.

Cysts ($n = 6$): length, 565–570 (568) μm ; width, 348–355 (352) μm ; length to width ratio – 1.6; fenestra

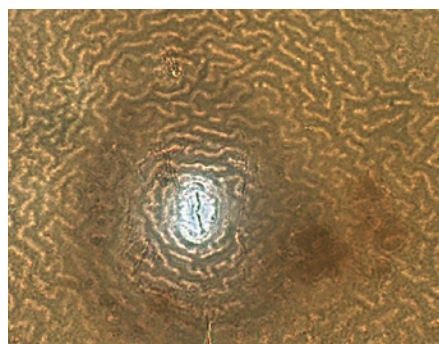


Рис. 1. Анально-вульварная область *Globodera millefolii* (фото Е.А. Худяковой)

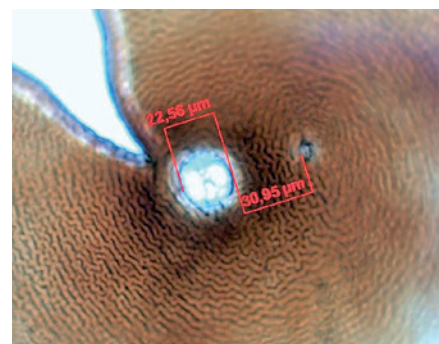


Fig. 1. Anal-vulvar region of *Globodera millefolii* (photos by E.A. Khudyakova)

Исследуемые цисты *G. tabacum* имели европейское происхождение (рис. 2).

Яйца (n = 10): Длина – 95–98 (97) мкм; ширина – 43–53 (48) мкм; отношение длины к ширине – 2.

Цисты (n = 6): длина – 565–570 (568) мкм; ширина – 348–355 (352) мкм; отношение длины к ширине – 1,6; диаметр фенестры – 28–33 (31) мкм; расстояние от края фенестры до ануса – 33–45 (39) мкм; индекс Гранека – 1,3.

Личинки 2-го возраста (n = 10): длина – 488–502 (495) мкм; a = 23; c = 9,9; стилет – 25–27 (26) мкм; ширина тела – 21–23 (22) мкм; длина хвоста – 49–51 (50) мкм (рис. 3).

Дифференциальный диагноз. От карантинного вида *G. rostochiensis* табачная цистообразующая нематода *G. tabacum* отличалась большим диаметром фенестры (31 мкм против 20 мкм), меньшим количеством складок между анусом и вульвой (менее 14), меньшим индексом Гранека (1,3 против 3,7), более крупными складками и округлым рисунком кутикулярных складок вокруг вульвы. От *G. pallida* и *G. rostochiensis* исследуемая популяция *G. tabacum* отличалась более округлыми, вытянутыми в поперечном направлении головками стилета инвазионных личинок, от *G. rostochiensis* – более длинным стилетом (26 мкм против 22 мкм).

Globodera artemisiae (Eroshenko & Kazachenko, 1972) Behrens, 1975 – полынная

цистообразующая нематода

Исходное описание не задокументировано.

Globodera artemisiae паразитирует на полынн *Artemisia vulgaris* L. и распространена в России, Армении, Польше, Германии, Швеции, Японии (Зиновьева, Чижов, 2012; Буторина и др., 2006).

Исследуемые цисты *G. artemisiae* выявлены в образцах с Дальнего Востока России (рис. 4).

Яйца (n = 10): длина – 85–99 (92) мкм; ширина – 35–39 (37) мкм; отношение длины к ширине – 2,4.

Цисты (n = 5): длина – 457–535 (496) мкм; ширина – 290–340 (315) мкм; отношение длины к ширине – 1,6; диаметр фенестры – 22–28 (25) мкм; расстояние от края фенестры до ануса – 24–33 (29) мкм; индекс Гранека – 1,2.

Личинки 2-го возраста (n = 10): длина – 370–450 (410) мкм; a = 21; c = 9,7; стилет – 25–27,5 (26) мкм; ширина тела – 18–22 (20) мкм; длина хвоста – 35–48 (42) мкм (рис. 5).

Дифференциальный диагноз. От карантинного вида *G. rostochiensis* полынная цистообразующая нематода *G. artemisiae* отличалась большим диаметром фенестры (25 мкм против 20 мкм), меньшим количеством складок между анусом и вульвой (менее 10), меньшим индексом Гранека (1,2 против 3,7), округлым рисунком кутикулярных складок вокруг вульвы и ануса, напоминающим цифру 8. От *G. pallida* исследуемая популяция *G. artemisiae* отличалась головками стилета инвазионных личинок, наклоненными назад, от *G. rostochiensis* – более длинным стилетом (26 мкм против 22 мкм).

Анализ данных лабораторных исследований показал, что основным путем распространения цистообразующих нематод *Globodera pallida* и *Globodera rostochiensis* является картофель свежий или охлажденный (код ТНВЭД 0701); также они могут распространяться с луковицами, клубнями, клубневидными корнями, клубнелуковицами,

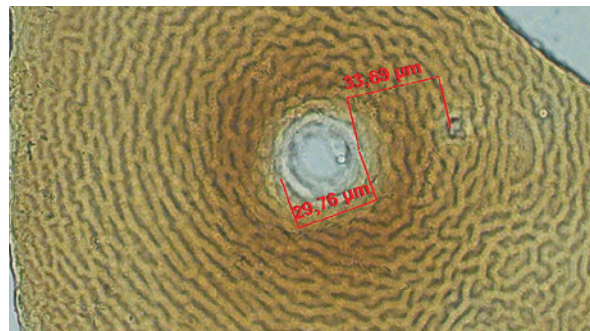


Рис. 2. Анально-вульварная область *G. tabacum* (фото С.В. Судариковой)

Fig. 2. Anal-vulvar region of *G. tabacum* (photo by S.V. Sudarikova)



Рис. 3. Личинка *G. tabacum* (фото С.В. Судариковой)

Fig. 3. *G. tabacum* larva (photo by S.V. Sudarikova)

diameter, 28–33 (31) μm; the distance from the edge of the fenestra to the anus, 33–45 (39) μm; Granek index – 1.3.

Second instar larvae (n = 10): length, 488–502 (495) μm; a = 23; c = 9.9; stylet, 25–27 (26) μm; body width, 21–23 (22) μm; tail length, 49–51 (50) μm (Fig. 3).

Differential diagnosis. *G. tabacum* differs from the quarantine species *G. rostochiensis* by a larger fenestra diameter (31 μm vs 20 μm), fewer folds between anus and vulva (less than 14), lower Granek index (1.3 vs 3.7), larger folds, and a rounded pattern of cuticular folds around the vulva. The studied population of *G. tabacum* differed from *G. pallida* and *G. rostochiensis* by more rounded, transversely elongated stylet heads of invasive larvae, from *G. rostochiensis* – by a longer stylet (26 μm versus 22 μm).

Globodera artemisiae (Eroshenko & Kazachenko, 1972) Behrens, 1975

The original description is not documented.

Globodera artemisiae parasitizes *Artemisia vulgaris* L. and is distributed in Russia, Armenia, Poland, Germany, Sweden, and Japan (Zinovieva and Chizhov, 2012; Butorina et al., 2006).

The studied cysts of *G. artemisiae* were detected in samples from the Russian Far East (Fig. 4).

Eggs (n = 10): length, 85–99 (92) μm; width, 35–39 (37) μm; length to width ratio – 2.4.

Cysts (n = 5): length, 457–535 (496) μm; width, 290–340 (315) μm; length to width ratio – 1.6; fenestra diameter, 22–28 (25) μm; the distance from the edge of the fenestra to the anus, 24–33 (29) μm; Granek index – 1.2.

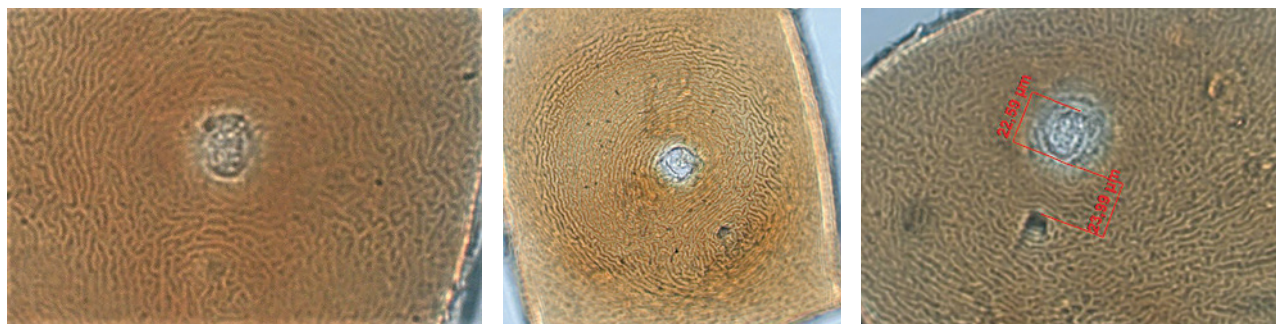


Рис. 4. Вариации анально-вульварных пластинок у *G. artemisiae* (фото С.В. Судариковой, Е.А. Худяковой)

Fig. 4. Variations of anal-vulvar plates of *G. artemisiae* (photos by S.V. Sudarikova, E.A. Khudyakova)

корневищами (код ТНВЭД 0601); прочими живыми растениями (включая их корни), черенками и отводками (кроме неукорененных черенков и мицелия гриба) (код ТНВЭД 0602); луком репчатым, луком-шалотом, чесноком, луком-пореем и прочими луковичными овощами, свежими или охлажденными (код ТНВЭД 0703); морковью, репой, свеклой столовой, козлородником, сельдереем корневым, редисом и прочими аналогичными съедобными корнеплодами, свежими или охлажденными (код ТНВЭД 0706); маниоком, марантой, салепом, земляной грушей, или топинамбуром, сладким картофелем, или бататом, и аналогичными корнеплодами и клубнеплодами (код ТНВЭД 0714).

Несмотря на то что *Globodera pallida* и *Globodera rostochiensis* не паразитируют на всей вышеперечисленной продукции (кроме картофеля), они могут передаваться с загрязняющими ее частицами почвы, поэтому продукция подлежит обязательным лабораторным исследованиям. Например, *Globodera pallida* дважды выявлялась на продукции «газонные травы» из Европы.

Интенсивное изучение рода *Globodera*, осуществляемое сейчас в странах Европы и Америки, привело к описанию ряда видов, очень близких морфологически к картофельной нематоде *G. rostochiensis*. Необходимость правильного разграничения всех этих нематод очевидна, но оно представляет довольно большие трудности, особенно если учесть отсутствие достаточно четкой договоренности о понятиях, обозначаемых отдельными терминами.

Так, необходимо пояснить, что Е.С. Кирьянова и А.В. Борисенко подразумевают под расстоянием «вульва – анус» расстояние от щели вульвы до центра анального отверстия. Диаметр вульварной

Second instar larvae (n = 10): length, 370–450 (410) μm; a = 21; c = 9.7; stylet, 25–27.5 (26) μm; body width, 18–22 (20) μm; tail length, 35–48 (42) μm (Fig. 5).

Differential diagnosis. *G. artemisiae* differs from the quarantine species *G. rostochiensis* by a larger fenestra diameter (25 μm vs 20 μm), fewer folds between the anus and vulva (less than 10), lower Granek index (1.2 vs 3.7), rounded pattern of cuticular folds around the vulva and anus resembling the number 8. The studied population of *G. artemisiae* differed from *G. pallida* in the stylet heads of invasive larvae, inclined backwards, from *G. rostochiensis* in a longer stylet (26 μm versus 22 μm).

Analysis of laboratory research data showed that the main pathway of cyst nematodes *Globodera pallida* and *Globodera rostochiensis* is fresh or chilled potatoes (HS code 0701); they can also spread with bulbs, tubers, tuberous roots, corms, rhizomes (HS code 0601); other live plants (including their roots), cuttings and layering (except unrooted cuttings and mycelium of the fungus) (HS code 0602); onions, shallots, garlic, leeks and other alliacious vegetables, fresh or chilled (HS code 0703); carrots, turnips, beetroot, buckthorn, celeriac, radishes and other similar edible root vegetables, fresh or chilled (HS code 0706); cassava, arrowroot, salep, ground pear or Jerusalem artichoke, sweet potato or sweet potato, and similar roots and tubers (HS code 0714).

Despite the fact that *Globodera pallida* and *Globodera rostochiensis* do not parasitize on all of the above products (except potatoes), they can be transmitted with soil particles contaminating it, therefore the products are subject to mandatory laboratory tests. For example, *Globodera pallida* was twice detected on “lawn grass” from Europe.

Intensive study of the genus *Globodera* carried out now in the countries of Europe and America, has led to the description of a number of species, morphologically very close to the potato nematode *G. rostochiensis*. The need for a correct distinction between all these nematodes is obvious, but it presents rather great difficulties, especially given the lack of a sufficiently clear agreement on the concepts denoted by individual terms.

So, it is necessary to clarify that Е.С. Kiryanova and А.В. Borisenko mean by the distance “vulva – anus” the distance from the gap of the vulva to the center of the anus. The diameter of the vulvar plate, together with the basin, is measured along a long diameter, i. e., in the direction of the anus. The Granek index is taken with



Рис. 5. Личинка *G. artemisiae* (фото С.В. Судариковой)

Fig. 5. *G. artemisiae* larva (photo by S.V. Sudarikova)

пластинки вместе с базином измеряют по длинному поперечнику, т. е. в направлении к анусу. Индекс Гранека принимают с поправкой: в числителе помещают расстояние от щели вульвы до центра ануса, а в знаменателе – наиболее длинный диаметр вульварной пластинки. У цист с разрушенной вульвой измерение ведется от центра этого отверстия (Кириянова, Борисенко, 1975). При таком измерении ошибка в оценке расстояния от вульвы до ануса будет минимальной, особенно когда кутикула близ вульвы разрушена далеко за пределами вульварной пластинки и фенестры. Кроме того, это позволяет сравнивать такие измерения с данными предшествующих авторов. Несмотря на правильность и удобство такого способа измерений, в настоящее время все зарубежные авторы производят измерения от края вульварного окна. Поэтому при проведении исследований мы придерживались международной практики.

Также часто есть разночтения в терминологии. Например, термин «вульварная пластинка» у некоторых современных авторов используется вместо термина «анально-вульварная пластинка», и наоборот. Следует четко различать эти термины. Термин «вульварная пластинка» является синонимом вульварной фенестры (вульварного окна, базина), а термин «анально-вульварная пластинка» – синонимом перинеальной области, т. е. поверхностной области вокруг ануса и вульвы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ материала по растениям – хозяевам нематод рода *Globodera* показал, что 8 видов нематод этого рода паразитируют на растениях семейства Solanaceae, за исключением картофеля. Группа нематод рода *Globodera* паразитирует на растениях семейства Asteraceae. Цистообразующие нематоды передаются с почвой, поэтому могут встречаться в подкарантинной продукции, загрязненной частицами почвы. Составлен список такой продукции, а также представлены результаты исследования по географическому распространению нематод рода *Globodera*. Проведен сбор и исследование образцов почвы из разных областей Российской Федерации и импортной продукции. Обнаружены некарантинные виды рода *Globodera*, проведено их исследование. Представлен дифференциальный диагноз, позволяющий отделить карантинные виды от некарантинных по основным морфологическим признакам. Даны описания трех некарантинных видов, которые периодически встречались при лабораторных исследованиях. Определены разночтения в терминологии и промерах морфометрических признаков, которые важно учитывать при диагностике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Буторина Н., Зиновьева С., Кулинич О. и др. Прикладная нематология. – М.: Наука, 2006, 350 с.
2. Ефременко Т., Боровикова А., Дудик О., Гуськова Л., Маковская С. Инструкция по выявлению золотистой и бледной картофельных нематод и мерам борьбы с ними. – М.: Агропромиздат, 1988, 47 с.
3. Зиновьева С., Чижов В. и др. Фитопаразитические нематоды России. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2012, 386 с.
4. Кириянова Е.С., Борисенко А.В., 1975. Цистообразующая нематода – *Heterodera (Globodera)*

a correction: the numerator is the distance from the slit of the vulva to the center of the anus, and the denominator is the longest diameter of the vulvar plate. In cysts with a destroyed vulva, measurements are made from the center of this hole (Kiryanova, Borisenko, 1975). With this measurement, the error in estimating the distance from the vulva to the anus will be minimal, especially when the cuticle near the vulva is destroyed far beyond the vulvar plate and fenestra. In addition, this allows such measurements to be compared with those of previous authors. Despite the correctness and convenience of this measurement method, at present, all foreign authors measure from the edge of the vulvar window. Therefore, when conducting research, we adhered to international practice.

There are also often inconsistencies in terminology. For example, the term “vulvar plate” is used by some modern authors instead of the term “anal-vulvar plate”, and vice versa. These terms should be clearly distinguished. The term “vulvar plate” is synonymous with the vulvar fenestra (vulvar window, basin), and the term “anal-vulvar plate” is synonymous with the perineal region, i. e., the superficial area around the anus and vulva.

CONCLUSION

The analysis of the material of host plants of the *Globodera* genus nematodes showed that 8 nematode species of this genus parasitize on Solanaceae plants, with the exception of potatoes. Group of nematodes of the genus *Globodera* parasitize on Asteraceae plants. Cyst nematodes are transmitted with the soil; therefore, they can be detected in regulated products contaminated with soil particles. A list of such products has been compiled, as well as the results of a study on the geographical distribution of nematodes of the genus *Globodera* are presented. Soil samples were collected and studied from different regions of the Russian Federation and imported products. Non-quarantine species of the genus *Globodera* were detected and studied. A differential diagnosis is presented, which makes it possible to separate quarantine species from non-quarantine ones according to the main morphological features. Descriptions are given of three non-quarantine species that were periodically detected in laboratory studies. Discrepancies in the terminology and measurements of morphometric features, which are important to take into account in the diagnosis, are determined.

REFERENCES

1. Butorina N., Zinovieva S., Kulinich O. et al. Applied nematology [Prikladnaya nematologiya]. M.: Nauka, 2006, 350 p. (in Russian).
2. Efremenko T., Borovikova A., Dudik O., Guskova L., Makovskaya S. Instructions for the detection of golden and pale potato nematodes and measures to control them [Instruktsiya po vyavleniyu zolotistoy i blednoy kartofelnykh nematod i meram borby s nimi]. M.: Agropromizdat, 1988, 47 p. (in Russian).
3. Zinovieva S., Chizhov V. et al. Phytoparasitic nematodes in Russia [Fitoparaziticheskiye nematody Rossii]. M.: Association of scientific publications KMK, 2012, 386 p. (in Russian).

mali sp. n. – паразит яблони в Казахстане. – Паразитология, вып. 4: 335–338.

5. Лиманцева Л. Золотистая картофельная нематода *Globodera rostochiensis* в Северо-Западном регионе РФ: состав популяции, источники и доноры устойчивости; автореф. дисс. канд. биол. наук: 06.01.07 / Лиманцева Людмила Алексеевна. – Санкт-Петербург, 2010, 21 с.

6. Национальный доклад о карантинном фитосанитарном состоянии территории Российской Федерации в 2021 году. – Фитосанитария. Карантин растений, 2022, 10 (2): 2–13.

7. Stone A., 1973. *Heterodera pallida* and *Heterodera rostochiensis*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes, № 16 and 17. – Wallingford, UK: CAB International, 71 p.

8. Subbotin S., Mundo-Ocampo M. and Baldwin J., 2010. Systematics of cyst nematodes (Nematoda: Heteroderinae). – In: Nematology Monographs and Perspectives, 8A Series, eds D.J. Hunt and R.N. Perry (Leiden: Brill), 351 p.

9. Subbotin S., Cid Del Prado Vera I., Mundo-Ocampo M. and Baldwin J., 2011. Identification, phylogeny and phylogeography of circumfenestrate cyst nematodes (Nematoda: Heteroderidae) as inferred from analysis of ITS-rDNA. – Nematology, 13 (7): 805–824. URL: <https://doi.org/10.1163/138855410x552661>.

10. Subbotin S., Franco J., Knoetze R., Roubtsova T., Bostock R., Cid Del Prado Vera I., 2019. DNA barcoding, phylogeny and phylogeography of the cyst nematode species from the genus *Globodera* (Tylenchida: Heteroderidae). – Nematology, Vol. 0 (0), 1–29. URL: https://www.Russjnmematology.com/Subbotin/reprint/Globodera_2019.pdf.

11. Turner S. and Evans K., 1998. The origins, global distribution and biology of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* (Woll.) and *Globodera pallida* Stone). – In: Potato Cyst Nematodes: Biology, Distribution and Control, Marks, R.J. and B.B. Brodie (eds.). Wallingford, UK: CAB International, p. 7–26.

12. Zasada I., Ingham R., Phillips W., 2013a. Current state of knowledge of *Globodera ellingtonae*: a new cyst nematode species. – La Serena, Chile: ONTA Abstracts.

13. Zasada I., Peetz A., Wade N., Navarre R., Ingham R., 2013b. Host status of different potato (*Solanum tuberosum*) varieties and hatching in root diffusates of *Globodera ellingtonae*. – Journal of Nematology, 45 (3): 195–201.

14. CABI. Invasive Species Compendium, 2022 [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/27037> (дата обращения: 16.06.2022).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Худякова Елена Анатольевна, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией гельминтологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; *e-mail: fer59@mail.ru*.

Сударикова Стелла Валериевна, старший научный сотрудник лаборатории гельминтологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; *e-mail: sudarikovah@mail.ru*.

4. Kiryanova E.S., Borisenko A.V. Cyst nematode – *Heterodera (Globodera) mali* sp. n. – a parasite of the apple tree in Kazakhstan [Tsistoobrazuyushchaya nematoda – *Heterodera (Globodera) mali* sp. n. – parazit yablони v Kazakhstane]. *Parasitology*, 1975; 4: 335–338 (in Russian).

5. Limantseva L. Golden potato nematode *Globodera rostochiensis* in the Northwestern region of the Russian Federation: population composition, sources and donors of resistance; PhD in Biology dissertation abstract: 06.01.07 / Lyudmila Alekseevna Limantseva. St. Petersburg, 2010, 21 p. (in Russian).

6. National report on the quarantine phytosanitary state of the territory of the Russian Federation in 2021. *Plant Health and Quarantine*, 2022, 10 (2): 2–13.

7. Stone A. *Heterodera pallida* and *Heterodera rostochiensis*. C.I.H. Descriptions of Plant-parasitic Nematodes, № 16 and 17. Wallingford, UK: CAB International, 1973, 71 p.

8. Subbotin S., Mundo-Ocampo M. and Baldwin J. Systematics of cyst nematodes (Nematoda: Heteroderinae). In: Nematology Monographs and Perspectives, 8A Series, eds D.J. Hunt and R.N. Perry (Leiden: Brill), 2010, 351 p.

9. Subbotin S., Cid Del Prado Vera I., Mundo-Ocampo M. and Baldwin J. Identification, phylogeny and phylogeography of circumfenestrate cyst nematodes (Nematoda: Heteroderidae) as inferred from analysis of ITS-rDNA. *Nematology*, 2011; 13 (7): 805–824. URL: <https://doi.org/10.1163/138855410x552661>.

10. Subbotin S., Franco J., Knoetze R., Roubtsova T., Bostock R., Cid Del Prado Vera I. DNA barcoding, phylogeny and phylogeography of the cyst nematode species from the genus *Globodera* (Tylenchida: Heteroderidae). *Nematology*, 2019; Vol. 0 (0), 1–29. URL: https://www.Russjnmematology.com/Subbotin/reprint/Globodera_2019.pdf.

11. Turner S. and Evans K. The origins, global distribution and biology of potato cyst nematodes (*Globodera rostochiensis* (Woll.) and *Globodera pallida* Stone). In: Potato Cyst Nematodes: Biology, Distribution and Control, Marks, R.J. and B.B. Brodie (eds.). Wallingford, UK: CAB International, 1998, p. 7–26.

12. Zasada I., Ingham R., Phillips W. Current state of knowledge of *Globodera ellingtonae*: a new cyst nematode species. La Serena, Chile: ONTA Abstracts, 2013a.

13. Zasada I., Peetz A., Wade N., Navarre R., Ingham R. Host status of different potato (*Solanum tuberosum*) varieties and hatching in root diffusates of *Globodera ellingtonae*. *Journal of Nematology*, 2013b; 45 (3): 195–201.

14. CABI. Invasive Species Compendium, 2022 [Electronic resource]. URL: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/27037> (last accessed: 16.06.2022).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Elena Khudyakova, Senior Researcher, Head of Helminthology Laboratory of FGBU “VNIIR” Testing Laboratory Center, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; *e-mail: fer59@mail.ru*.

Stella Sudarikova, Senior Researcher, Helminthology Laboratory of FGBU “VNIIR” Testing Laboratory Center, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; *e-mail: sudarikovah@mail.ru*.

Исследование праймеров для диагностики фитоплазм из группы Apple proliferation

И.Г. БАШКИРОВА¹, Е.В. КАРИМОВА²,
И.П. СМЕРНОВА³

^{1,2} ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»),
р. п. Быково, г. Раменское,
Московская обл., Россия

^{1,3} ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (ФГАОУ ВО «РУДН»),
г. Москва, Россия

¹ ORCID 0000-0001-9014-4179,
e-mail: bashkirova@mail.ru

² ORCID 0000-0001-6474-8913,
e-mail: elenavkar@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-3584-9130,
e-mail: smir-ip@yandex.ru

АННОТАЦИЯ

Одними из наиболее опасных вредных организмов для растений являются фитоплазмы. Фитопатогены из группы Apple proliferation (16SrX) вызывают фитоплазмозы у семечковых и косточковых культур, которые приводят к огромным потерям плодово-ягодной продукции по всему миру. В группу 16SrX входят, в частности, такие некультивируемые бактерии: *Candidatus Phytoplasma mali*, которая вызывает болезнь пролиферации яблони (Apple proliferation); *Candidatus Phytoplasma pyri*, которая вызывает болезнь истощения груши (Pear decline); *Candidatus Phytoplasma prunorum*, вызывающая европейскую желтуху косточковых (European stone fruit yellows). Первые два вида включены в Единый перечень карантинных объектов Евразийского экономического союза (ЕАЭС). Несмотря на то что эти фитоплазмы входят в одну группу, им присущи разные естественные растения-хозяева, насекомые-переносчики, а также различный набор характерных симптомов у инфицированных растений. В статье приведены данные по изучению аналитических характеристик (специфичность и чувствительность) специфичных праймеров для выявления фитопатогенных микроорганизмов из группы Apple proliferation методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени и для последующей видовой идентификации возбудителя заболевания пролиферации яблони *Candidatus Phytoplasma mali* с использованием специфичных праймеров методом классической ПЦР. В ходе экспериментов получены качественные специфичные продукты амплификации. Установлено, что с помощью исследуемой пары праймеров для классической ПЦР возможно диагностировать и идентифицировать возбудителя пролиферации яблони в зараженном растительном материале. В работе

Study of primers for the diagnosis of phytoplasmas from the Apple proliferation group

I.G. BASHKIROVA¹, E.V. KARIMOVA²,
I.P. SMIRNOVA³

^{1,2} FGBU "All-Russian Plant Quarantine Center" (FGBU "VNIICR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia

^{1,3} Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Peoples' Friendship University of Russia" (FGAOU VO "RUDN University"), Moscow, Russia

¹ ORCID 0000-0001-9014-4179,
e-mail: bashkirova@mail.ru

² ORCID 0000-0001-6474-8913,
e-mail: elenavkar@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-3584-9130,
e-mail: smir-ip@yandex.ru

ABSTRACT

One of the most dangerous pests for plants are phytoplasmas. Phytopathogens from the Apple proliferation group (16SrX) cause phytoplasmoses in pome and stone fruit crops, which lead to huge losses of fruit and berry products around the world. The 16SrX group includes, in particular, such uncultivated bacteria as: *Candidatus Phytoplasma mali*, causing apple proliferation; *Candidatus Phytoplasma pyri*, resulting in pear decline; *Candidatus Phytoplasma prunorum*, leading to European stone fruit yellows. The first two species are included in the Common List of Quarantine Pests of the Eurasian Economic Union (EAEU). Although they belong to the same group, these phytoplasmas have different natural hosts, insect vectors, and a different set of characteristic symptoms in infected plants. The article presents data on the study of the analytical characteristics (specificity and sensitivity) of specific primers for the detection of phytopathogenic microorganisms from the Apple proliferation group by real-time polymerase chain reaction (PCR) and for subsequent species identification of the causative agent of apple proliferation *Candidatus Phytoplasma mali* using specific primers classical PCR method. During the experiments, high-quality specific amplification products were obtained. It has been established that using the studied pair of primers for classical PCR, it is possible to diagnose and identify the causative agent of apple proliferation in infected plant material. In this work, the analysis of the studied specific primers was carried out using the NCBI Primer-BLAST online service. For research,

осуществлен анализ исследуемых специфичных праймеров с использованием онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST. Для проведения исследований использовали коллекцию ДНК фитоплазм из различных групп: Apple proliferation, Stolbur, Foxtail palm yellow decline, Peanut witches' broom, Elm yellows.

Ключевые слова. Фитопатоген, идентификация, ПЦР, фитоплазмозы, плодовые культуры, карантин растений.

ВВЕДЕНИЕ



итоплазмы *Candidatus* Phytoplasma mali, *Candidatus* Phytoplasma pyri, *Candidatus* Phytoplasma prunorum группы Apple proliferation (16SrX) – одни из наиболее опасных и экономически значимых фитопатогенов для плодовых и эконо-

номически значимых для сельскохозяйственных культур не только для Российской Федерации, но и для зарубежных стран (Picard et al., 2018; Bashkirova et al., 2019; gd.eppo.int). Возбудитель европейской желтухи косточковых является карантинным вредным организмом (КВО) для многих стран, например для Бахрейна, Израиля, Иордании, Канады, Молдовы, Туниса и других, а также регулируемым некарантинным вредным организмом для стран Европейского союза. Возбудители заболеваний пролиферации яблони и истощения груши относятся к КВО для Аргентины, Бахрейна, Бразилии, Молдовы, Норвегии и других стран и к карантинным вредным организмам, ограниченно распространенным на территории стран ЕАЭС (Башкирова и др., 2018b; Каримова и др., 2019; gd.eppo.int).

Фитоплазмы – фитопатогенные прокариоты рода *Candidatus* Phytoplasma внутри класса Mollicutes. Другими представителями данного класса являются микоплазмы, ахлеоплазмы, спироплазмы и иные микроорганизмы. Все известные виды из рода *Candidatus* Phytoplasma являются растительными патогенами. Они близки к бактериям из рода *Bacillus*, *Clostridium* и *Streptococcus* (Свиридова, Ванькова, 2012; Гирсова и др., 2013; МСФМ 27, 2018).

Совершенствование молекулярно-генетических методов позволило провести исследование генома этой группы микроорганизмов, определить консервативные гены и разработать более точную классификацию. Диагностика фитоплазм и их филогенетический анализ основаны на исследовании фрагментов генов 16S-23S рРНК, для которых разработан комплекс праймеров (Woese, 2000). Для предварительной классификации фитоплазм чаще всего используют генетические различия в маркере – гене 16S рРНК. Генетическое различие между представителями рода *Candidatus* Phytoplasma графически представляют в виде филогенетических деревьев (Lee et al., 2000; Jomantiene et al., 2002; Wei et al., 2008).

Для современной классификации фитоплазм используют пороговое значение сходства

we used a collection of phytoplasma DNA from various groups: Apple proliferation, Stolbur, Foxtail palm yellow decline, Peanut witches' broom and Elm yellows.

Key words. Phytopathogen, identification, PCR, phytoplasmoses, fruit crops, plant quarantine.

INTRODUCTION



hytoplasmas *Candidatus* Phytoplasma mali, *Candidatus* Phytoplasma pyri, *Candidatus* Phytoplasma prunorum of Apple proliferation group (16SrX) are one of the most dangerous and economically significant phytopathogens for fruit and economically significant for agricultural crops not only for the Russian Federation, but also for other countries (Picard et al., 2018; Bashkirova et al., 2019; gd.eppo.int). The causative agent of European stone fruit yellows is a quarantine pest for many countries, such as Bahrain, Israel, Jordan, Canada, Moldova, Tunisia and others, as well as a regulated non-quarantine pest for the countries of the European Union. The causative agents of apple proliferation and pear decline belong to quarantine pests for Argentina, Bahrain, Brazil, Moldova, Norway and other countries and to quarantine pests that are limitedly spread on the territory of the EAEU countries (Bashkirova et al., 2018b; Karimova et al., 2019; gd.eppo.int).

Phytoplasmas are phytopathogenic prokaryotes of the genus *Candidatus* Phytoplasma within the class Mollicutes. Other representatives of this class are mycoplasmas, achleoplasmas, spiroplasmas and other microorganisms. All known species of the genus *Candidatus* Phytoplasma are plant pathogens. They are close to bacteria of the genus *Bacillus*, *Clostridium* and *Streptococcus* (Sviridova, Vankova, 2012; Girsova et al., 2013; ISPM 27, 2018).

Improvement in molecular genetic methods has made it possible to study the genome of this group of microorganisms, identify conservative genes, and develop a more accurate classification. The diagnosis of phytoplasmas and their phylogenetic analysis is based on the study of 16S-23S rRNA gene fragments, for which a set of primers was developed (Woese, 2000). For the preliminary classification of phytoplasmas, genetic differences in the marker, the 16S rRNA gene, are most often used. The genetic difference between members of the genus *Candidatus* Phytoplasma is graphically represented as phylogenetic trees (Lee et al., 2000; Jomantiene et al., 2002; Wei et al., 2008).

For the modern phytoplasmas classification, a threshold similarity of the nucleotide sequences of the 16S rRNA gene equal to 97.5% is used. For example, differences in the sequences of one gene region during interspecific comparison of phytoplasmas from the

нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК, равное 97,5%. Например, различия в последовательностях одного участка гена при межвидовом сравнении фитоплазм из группы Apple proliferation составили: *Candidatus Phytoplasma mali/Candidatus Phytoplasma pyri* – 1,0–1,1%; *Candidatus Phytoplasma mali/Candidatus Phytoplasma prunorum* – 1,3–1,5% и *Candidatus Phytoplasma pyri/Candidatus Phytoplasma prunorum* – 1,2–1,3% (Seemüller, Schneider, 2004; IRPCM, 2004). По сравнению с видами из рода *Bacillus* фитоплазмы имеют небольшой геном: он состоит из 680–1600 тысяч пар нуклеотидов (Duduk, 2009).

Фитоплазмы переносятся с помощью насекомых из отряда Homoptera, подотрядов Psyllinea, Cicadinea, или Auchenorrhyncha. Доказано, что распространение возбудителя пролиферации яблони – *Candidatus Phytoplasma mali* – осуществляется видами *Cacopsylla picta* Foerster (синоним *C. costalis*), *C. melanoneura* (Foerster, 1848) и *Fieberiella florii* (Stål, 1864) (Mehle et al., 2011). Насекомые-переносчики распространены в Республике Крым, на Северном Кавказе, на юге Иркутской области и на территории СНГ (Приходько, Матяшова, 2015). *Candidatus Phytoplasma pyri*, возбудитель истощения груши, переносится с помощью *Cacopsylla pyri* (Linnaeus, 1758), *C. pyrisuga* (Foerster, 1848) и *Psylla pyricola* (Foerster, 1848). Эти виды выявлены на территории Дальнего Востока, Северного Кавказа и СНГ (Матяшова, Морозова, 2016; Башкирова и др., 2018а). В естественных условиях переносчиком возбудителя европейской желтухи косточковых – *Candidatus Phytoplasma prunorum* – является *C. pruni* (Scopoli, 1763) (Weintraub, Beanland, 2006), который распространен в Республике Крым и на Южном Кавказе (Шнейдер и др., 2017). К характерным симптомам заражения фитоплазмами из группы Apple proliferation относятся: ветвящиеся побеги «ведьмины метлы», мелкие листья с увеличенными прилистниками, пожелтение и покраснение листьев, скручивание и хлоротизация листьев, некроз флоэмы (рис. 1).

Для диагностики и идентификации возбудителей фитоплазмозов из группы Apple proliferation используют современные молекулярно-генетические методы (МСФМ 27, 2018). В данной работе проводили изучение фитопатогенов *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* с использованием праймеров, рекомендованных в публикациях Nikolić et al. (2010), Mehle et al. (2013), Jarausch et al. (1994), на основе изучения фрагментов генов 16S-23S рРНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали ДНК фитоплазм из различных коллекций: 1) *Candidatus Phytoplasma mali*; 2) *Candidatus Phytoplasma pyri*; 3) *Candidatus Phytoplasma prunorum*; 4) *Candidatus Phytoplasma solani*; 5) *Candidatus Phytoplasma asteris*; 6) *Candidatus Phytoplasma convolvuli*; 7) *Candidatus Phytoplasma rubi*.

Из зараженного растительного материала осуществляли экстракцию ДНК фитопатогенов *Candidatus Phytoplasma prunorum*, *Candidatus Phytoplasma solani*, *Candidatus Phytoplasma asteris*, *Candidatus Phytoplasma convolvuli* коммерческими наборами «ЦитоСорб/СytoSorb» и «Сорб-ГМО-Б» (ООО «Синтол», Россия).

Apple proliferation group were: *Candidatus Phytoplasma mali/Candidatus Phytoplasma pyri* – 1.0–1.1%; *Candidatus Phytoplasma mali/Candidatus Phytoplasma prunorum* – 1.3–1.5% and *Candidatus Phytoplasma pyri/Candidatus Phytoplasma prunorum* – 1.2–1.3% (Seemüller and Schneider, 2004; IRPCM, 2004). Compared to species of the genus *Bacillus*, phytoplasmas have a small genome: it consists of 680–1600 base pairs (Duduk, 2009).

Phytoplasmas are transmitted by insects from the order Homoptera, the suborders Psyllinea, Cicadinea, or Auchenorrhyncha. It has been proven that the spread of the causative agent of apple proliferation, *Candidatus Phytoplasma mali*, is carried out by the species *Cacopsylla picta* Foerster (synonym of *C. costalis*), *C. melanoneura* (Foerster, 1848), and *Fieberiella florii* (Stål, 1864) (Mehle et al., 2011). Insect vectors are common in the Republic of Crimea, in the North Caucasus, in the south of Irkutsk Oblast and in the CIS (Prikhodko and Matyashova, 2015). *Candidatus Phytoplasma pyri*, the causative agent of pear decline, is transmitted by *Cacopsylla pyri* (Linnaeus, 1758), *C. pyrisuga* (Foerster, 1848) and *Psylla pyricola* (Foerster, 1848). These species have been identified in the Far East, North Caucasus, and the CIS (Matyashova and Morozova, 2016; Bashkirova et al., 2018a). In natural conditions, the vector of European stone fruit yellows, *Candidatus Phytoplasma prunorum*, is *C. pruni* (Scopoli, 1763) (Weintraub, Beanland, 2006), which is spread in the Republic of Crimea and the South Caucasus (Shneyder et al., 2017). The characteristic symptoms of infection with phytoplasmas from the Apple proliferation group include: branching shoots of the “witch’s broom”, small leaves with enlarged stipules, yellowing and reddening of the leaves, twisting and chloritization of the leaves, and phloem necrosis (Fig. 1).

For the diagnosis and identification of pathogens of phytoplasmoses from the Apple proliferation group, modern molecular genetic methods are used (ISPM 27, 2018). In this work, the study of phytopathogens *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* was carried out using primers recommended in the publications of Nikolić et al. (2010), Mehle et al. (2013), Jarausch et al. (1994), based on the study of 16S-23S rRNA gene fragments.

MATERIALS AND METHODS

The experiments used phytoplasma DNA from different collections: 1) *Candidatus Phytoplasma mali*; 2) *Candidatus Phytoplasma pyri*; 3) *Candidatus Phytoplasma prunorum*; 4) *Candidatus Phytoplasma solani*; 5) *Candidatus Phytoplasma asteris*; 6) *Candidatus Phytoplasma convolvuli*; 7) *Candidatus Phytoplasma rubi*.

DNA of phytopathogens *Candidatus Phytoplasma prunorum*, *Candidatus Phytoplasma solani*, *Candidatus Phytoplasma asteris*, *Candidatus Phytoplasma convolvuli* was extracted from infected plant material with commercial kits CytoSorb and Sorb-GMO-B (Syntol, Russia).

To diagnose phytoplasmas from the Apple proliferation group by real-time PCR (RT-PCR), specific F/R



Рис. 1. Симптомы покраснения листьев груши, вызванные заражением *Candidatus Phytoplasma pyri* (фото И.Г. Башкировой)

Fig. 1. Symptoms of reddening of pear leaves caused by infection with *Candidatus Phytoplasma pyri* (photo by I.G. Bashkirova)

Для диагностики фитоплазм из группы Apple proliferation методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) использовали специфичные праймеры F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013):

прямой праймер (F):

5' -TGGTTAGAGCACACGCCTGAT-3' ,

обратный праймер (R):

5' -TCCACTGTGCGCCCTTAATT-3' .

Для проверки работы праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) использовали 2,5-кратную реакционную смесь для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green (ООО «Синтол»).

Для идентификации возбудителя пролиферации яблони – *Candidatus Phytoplasma mali* – методом классической ПЦР использовали пару праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994):

прямой праймер (AP5):

5' -TCTTTTAATCTTCAACCATGGC-3' ,

обратный праймер (AP4):

5' -CCAATGTGTGAAATCTGTAG-3' .

Величина продукта амплификации с праймерами AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) составляет около 483 пар нуклеотидов (п. н.). Использовали реакционную смесь (Mix) 5x Mas^{DD}Taq Mix-2025 (ЗАО «Диалат Лтд.», Россия).

Пары праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) и AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) синтезированы компанией ЗАО «Евроген» (Россия) и предоставлены в лиофилизированном виде. Рабочая концентрация для праймеров составила 10 пикомоль/мкл. Проводили анализ пар праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) и AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) с использованием онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), изучали их аналитические характеристики (специфичность и чувствительность).

Состав рабочей реакционной смеси для проведения метода ПЦР (табл. 1) рассчитывали на количество исследуемых образцов и на отрицательный

праймеры were used (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013):

forward primer (F):

5' -TGGTTAGAGCACACGCCTGAT-3' ,

reverse primer (R):

5' -TCCACTGTGCGCCCTTAATT-3' .

To test the performance of F/R primers (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013), a 2.5-fold reaction mixture was used for real-time PCR in the presence of EVA Green dye (Syntol).

To identify the causative agent of apple proliferation, *Candidatus Phytoplasma mali*, by classical PCR, a pair of primers AP5/AP4 was used (Jarausch et al., 1994):

forward primer (AP5):

5' -TCTTTTAATCTTCAACCATGGC-3' ,

reverse primer (AP4):

5' -CCAATGTGTGAAATCTGTAG-3' .

The size of the amplification product with primers AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) is about 483 base pairs (bp). The reaction mixture (Mix) 5x Mas^{DD}Taq Mix-2025 was used (Dialat Ltd., Russia).

Primer pairs F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) and AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) were synthesized by Evrogen (Russia) and provided in lyophilized form. The working concentration for the primers was 10 pmol/μl. F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) and AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) primer pairs were analyzed using the NCBI Primer-BLAST online service (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/), studied their analytical characteristics (specificity and sensitivity).

The composition of the working reaction mixture for the PCR method (Table 1) was calculated for the number of samples under study and for the negative

Таблица 1
Состав рабочей реакционной смеси для проведения ПЦР

№ п/п	Наименование реактива	F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013)	AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994)
1	Реакционная смесь (Mix)	10	5
2	Деионизированная вода	9,4	16,5
3	Прямой праймер	0,05	1
4	Обратный праймер	0,05	1
5	ДНК фитоплазм	2	1,5
6	SynTaq ДНК-полимераза	0,5	–
Общий объем смеси на 1 образец (мкл)		22	25

контрольный образец без добавления ДНК (К-). Амплификацию осуществляли на приборах CFX-96 (Bio-Rad, США) и Veriti (Applied Biosystems, США). Визуализацию результатов амплификации с праймерами AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) проводили с помощью гель-электрофореза в 1,5%-м агарозном геле.

Для осуществления процесса амплификации использовали программу для пары праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013), которая состояла из следующих этапов: 1) первичная денатурация при 95 °C – 5 мин; 2) повтор реакции в течение 49 циклов: 95 °C – 15 сек и 60 °C – 40 сек. Специфичная реакция проходит по каналу флуоресценции FAM, внутренний положительный контроль (ВПК) – по каналу флуоресценции HEX.

Программа амплификации для пары праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) следующая: 1) первичная денатурация при 95 °C – 5 мин; 2) циклическая реакция в течение 40 циклов: 95 °C – 10 сек, 58 °C – 15 сек, 72 °C – 45 сек; 3) финальная элонгация при 72 °C – 5 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе проведено изучение двух пар праймеров – F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) и AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) – для выявления фитоплазм из группы Apple proliferation и идентификации вида *Candidatus Phytoplasma mali* соответственно.

Авторы Nikolić et al. (2010) и Mehle et al. (2013) предлагают использовать для выявления фитоплазм из группы Apple proliferation видоспецифичные MGB-зонды (MGB – minor groove binder): AP-specific probe для идентификации вида *Candidatus Phytoplasma mali*; PD-specific probe – *Candidatus Phytoplasma pyri*; ESFY-specific probe – *Candidatus Phytoplasma prunorum*. Преимуществами MGB-зондов являются

control sample without the addition of DNA (K-). Amplification was carried out on CFX-96 (Bio-Rad, USA) and Veriti (Applied Biosystems, USA) devices. Visualization of the results of amplification with primers AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) was performed using gel electrophoresis in 1.5% agarose gel.

To implement the amplification process, we used the program for a pair of F/R primers (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013), which consisted of the following steps: 1) primary denaturation at 95 °C, 5 min; 2) repetition of the reaction for 49 cycles: 95 °C – 15 sec and 60 °C – 40 sec. Specific reaction passes through the FAM fluorescence channel,

internal positive control (IPC) – through the HEX fluorescence channel.

The amplification program for the AP5/AP4 primer pair (Jarausch et al., 1994) is as follows: 1) primary denaturation at 95 °C, 5 min; 2) cyclic reaction for 40 cycles: 95 °C – 10 sec, 58 °C – 15 sec, 72 °C – 45 sec; 3) final elongation at 72 °C – 5 min.

RESULTS AND DISCUSSION

We studied two pairs of primers – F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) and AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) – to identify phytoplasmas from the Apple proliferation group and identify the species *Candidatus Phytoplasma mali* respectively.

Nikolić et al. (2010) and Mehle et al. (2013) suggest using species-specific MGB-probes (MGB – minor groove binder) to identify phytoplasmas from the Apple proliferation group: AP-specific probe to identify the species *Candidatus Phytoplasma mali*; PD-specific probe – *Candidatus Phytoplasma pyri*; ESFY-specific probe – *Candidatus Phytoplasma prunorum*.

Table 1
The composition of the working reaction mixture for PCR

№	Reagent name	F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013)	AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994)
1	Reaction mixture (Mix)	10	5
2	Deionized water	9.4	16.5
3	Forward primer	0.05	1
4	Reverse primer	0.05	1
5	Phytoplasma DNA	2	1.5
6	SynTaq DNA polymerase	0.5	–
The total volume of the mixture per 1 sample (µl)		22	25

прочное связывание с мишенью, более короткая нуклеотидная последовательность, специфичность, однако такие зонды не синтезируют в России и использование таких зондов увеличивает стоимость проведения анализа (Башмакова, 2017; Елшин, Петров, 2017). В связи с этим в исследованиях использовали 2,5-кратную реакционную смесь с красителем EVA Green (ООО «Синтол»).

Для изучения специфичности пары праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) использовали ДНК фитоплазм из различных групп: *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* (группа Apple proliferation), *Candidatus Phytoplasma solani* (группа Stolbur), *Candidatus Phytoplasma asteris* (группа Foxtail palm yellow decline), *Candidatus Phytoplasma convolvuli* (группа Peanut witches' broom), *Candidatus Phytoplasma rubi* (группа Elm yellows). Результаты прохождения ПЦР со специфичными для группы Apple proliferation праймерами представлены на рисунках 2 и 3.

Результаты по изучению специфичности праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) показывают возможность их использования для диагностики фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation. Однако, помимо исследуемых видов фитоплазм из группы Apple proliferation, праймеры способны выявить ДНК других видов фитоплазм: *Candidatus Phytoplasma solani*, *Candidatus Phytoplasma convolvuli*, *Candidatus Phytoplasma asteris*. Ингибирование реакции не наблюдалось по результатам реакции с внутренним положительным контролем (рис. 3), который проходил по каналу флуоресценции HEX. В ходе исследований по проверке пары праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) с помощью онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) установлено, что эта пара праймеров может выявить штаммы следующих видов фитоплазм: *Candidatus Phytoplasma australiense*, *Candidatus Phytoplasma solani*, X-disease phytoplasma, *Candidatus Phytoplasma rubi*, *Candidatus Phytoplasma asteris*, Paulownia witches' broom phytoplasma, *Candidatus phytoplasma malaysianum* и других из разных групп.

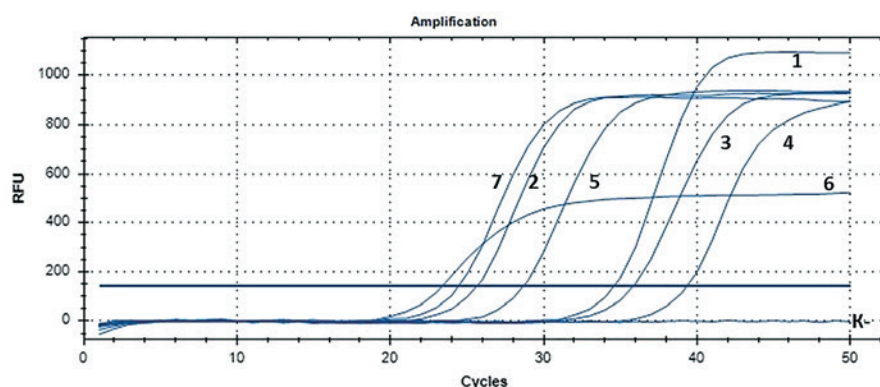


Рис. 2. Аналитическая специфичность праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013), канал флуоресценции FAM: 1 – *Candidatus Phytoplasma prunorum*; 2 – *Candidatus Phytoplasma mali*; 3 – *Candidatus Phytoplasma pyri*; 4 – *Candidatus Phytoplasma solani*; 5 – *Candidatus Phytoplasma rubi*; 6 – *Candidatus Phytoplasma convolvuli*; 7 – *Candidatus Phytoplasma asteris*; K – отрицательный контроль (H₂O) (интерфейс Bio-Rad CFX Manager 3.1: Amplification – амплификация; RFU – относительная единица флуоресценции; Cycles – циклы)

Fig. 2. Analytical specificity of F/R primers (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013), FAM fluorescence channel: 1 – *Candidatus Phytoplasma prunorum*; 2 – *Candidatus Phytoplasma mali*; 3 – *Candidatus Phytoplasma pyri*; 4 – *Candidatus Phytoplasma solani*; 5 – *Candidatus Phytoplasma rubi*; 6 – *Candidatus Phytoplasma convolvuli*; 7 – *Candidatus Phytoplasma asteris*; K – negative control (H₂O) (Bio-Rad CFX Manager 3.1 interface: Amplification; RFU – relative fluorescence unit; Cycles)

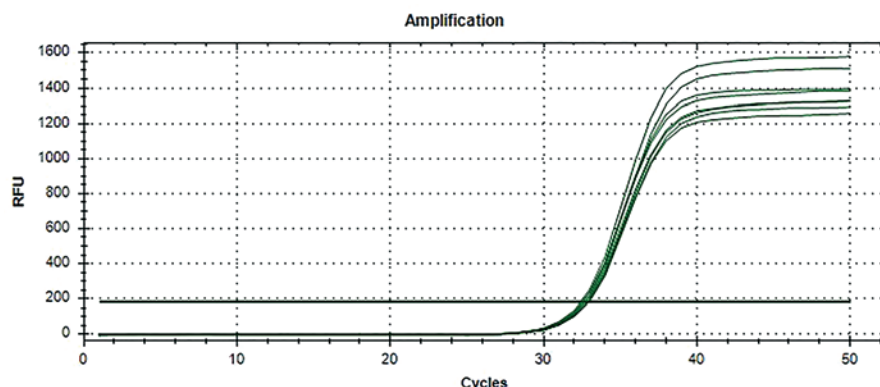


Рис. 3. Результаты прохождения внутреннего положительного контроля 2,5-кратной реакционной смеси с красителем EVA Green по каналу флуоресценции HEX (ООО «Синтол») (интерфейс Bio-Rad CFX Manager 3.1: Amplification – амплификация; RFU – относительная единица флуоресценции; Cycles – циклы)

Fig. 3. Results of passing the internal positive control of a 2.5-fold reaction mixture with EVA Green dye through the HEX fluorescence channel (Syntol) (Bio-Rad CFX Manager 3.1 interface: Amplification; RFU – relative fluorescence unit; Cycles)

The advantages of MGB probes are strong target binding, shorter nucleotide sequence, and specificity; however, such probes are not synthesized in Russia, and the use of such probes increases the cost of analysis (Bashmakova, 2017; Elshin and Petrov, 2017). In this regard, a 2.5-fold reaction mixture with the EVA Green dye (Syntol) was used in the studies.

To study the specificity of the F/R primer pair (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013), phytoplasma DNA from different groups was used: *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* (Apple proliferation group),

Проанализировав данные, можно сделать вывод, что пару праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) рекомендуется использовать в качестве универсального теста для диагностики фитоплазм группы Apple proliferation и ряда других видов фитоплазм методом ПЦР-РВ. В случае получения положительного результата ПЦР-РВ, необходимо провести видовую идентификацию фитоплазм методом классической ПЦР с помощью праймеров, рекомендуемых в диагностических протоколах МСФМ 27 (2018) и РМ 7/62 (3) (2020), с последующим секвенированием продуктов амплификации. Таким образом, применение указанных праймеров возможно только для выявления фитоплазм, включая виды *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* из группы Apple proliferation.

Следующим этапом исследований было проведение проверки пары праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) с использованием онлайн-сервиса NCBI Primer-BLAST (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). Исследование показало, что рассматриваемые праймеры могут выявить несколько изолятов фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma mali* из группы Apple proliferation, которые депонированы в базу данных NCBI.

Далее осуществляли исследования по изучению аналитических характеристик пары праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) для идентификации возбудителя пролиферации яблони – *Candidatus Phytoplasma mali*. Результаты изучения аналитической специфичности праймеров с использованием ДНК разных видов фитоплазм представлены на рисунке 4.



Рис. 4. Электрофореграмма аналитической специфичности праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994):
1 – *Candidatus Phytoplasma mali*;
2 – *Candidatus Phytoplasma pyri*;
3 – *Candidatus Phytoplasma prunorum*;
4 – *Candidatus Phytoplasma solani*;
5 – *Candidatus Phytoplasma rubi*;
K- – отрицательный контроль (H₂O);
M – маркер молекулярного веса 100–3000 п. н.

Fig. 4. Electrophoregram of the analytical specificity of AP5/AP4 primers (Jarausch et al., 1994):
1 – *Candidatus Phytoplasma mali*;
2 – *Candidatus Phytoplasma pyri*;
3 – *Candidatus Phytoplasma prunorum*;
4 – *Candidatus Phytoplasma solani*;
5 – *Candidatus Phytoplasma rubi*;
K- – negative control (H₂O);
M – molecular weight marker 100–3000 bp.

Candidatus Phytoplasma solani (Stolbur group), *Candidatus Phytoplasma asteris* (Foxtail palm yellow decline group), *Candidatus Phytoplasma convolvuli* (Peanut witches' broom group), *Candidatus Phytoplasma rubi* (Elm yellows group). The results of PCR with primers specific for the Apple proliferation group are shown in Figures 2 and 3.

The results of studying the specificity of F/R primers (Nicolic et al., 2010; Mehle et al., 2013) show the possibility of their use for the diagnosis of phytoplasmas *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* from the Apple proliferation group. However, in addition to the studied phytoplasma species from the Apple proliferation group, primers are able to detect DNA of other phytoplasma species: *Candidatus Phytoplasma solani*, *Candidatus Phytoplasma convolvuli*, *Candidatus Phytoplasma asteris*. Inhibition of the reaction was not observed as a result of the reaction with an internal positive control (Fig. 3), which passed through the HEX fluorescence channel. In studies testing the F/R primer pair (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) using the NCBI Primer-BLAST online service (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) it was found that this pair of primers can detect strains of the following phytoplasma species: *Candidatus Phytoplasma australiense*, *Candidatus Phytoplasma solani*, X-disease phytoplasma, *Candidatus Phytoplasma rubi*, *Candidatus Phytoplasma asteris*, Paulownia witches' broom phytoplasma, *Candidatus phytoplasma malaysianum* and others from different groups.

Having analyzed the data, it can be concluded that the primer pair F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) is recommended to be used as a universal test for diagnosing phytoplasmas of the Apple proliferation group and a number of other phytoplasma species by RT-PCR. If a positive RT-PCR result is obtained, it is necessary to carry out species identification of phytoplasmas by classical PCR using the primers recommended in the diagnostic protocols ISPM 27 (2018) and PM 7/62 (3) (2020), followed by sequencing of the amplification products. Thus, these primers can only be used to detect phytoplasmas, including *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* from the Apple proliferation group.

The next stage of the study was to test the AP5/AP4 primer pair (Jarausch et al., 1994) using the NCBI Primer-BLAST online service (ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/). The study showed that the primers under consideration can reveal several isolates of *Candidatus Phytoplasma mali* phytoplasma from the Apple proliferation group, which are deposited in the NCBI database.

Further studies were carried out to study the analytical characteristics of the AP5/AP4 primer pair (Jarausch et al., 1994) to identify the causative agent of apple proliferation, *Candidatus Phytoplasma mali*. The results of studying the analytical specificity of primers using DNA from different types of phytoplasmas are shown in Figure 4.

The desired amplification product of approximately 483 bp was obtained, sample 1 containing *Candidatus Phytoplasma mali* DNA (Fig. 4), which indicates

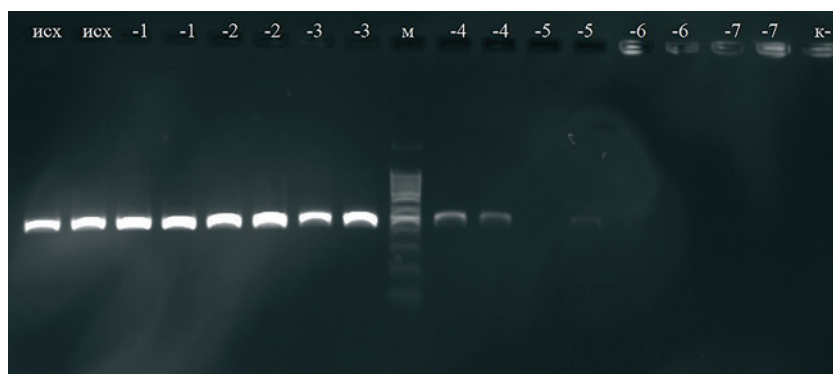


Рис. 5. Электрофореграмма аналитической чувствительности праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) с использованием разведения ДНК *Candidatus Phytoplasma mali*: исх – исходная концентрация ДНК фитоплазмы; -1 – 10^{-1} ; -2 – 10^{-2} ; -3 – 10^{-3} ; -4 – 10^{-4} ; -5 – 10^{-5} ; -6 – 10^{-6} ; -7 – 10^{-7} ; К- отрицательный контроль (H_2O); М – маркер молекулярного веса 100–3000 п. н.

Fig. 5. Electrophoregram of analytical sensitivity of AP5/AP4 primers (Jarausch et al., 1994) using DNA dilution of *Candidatus Phytoplasma mali*: initial concentration of phytoplasma DNA; -1 – 10^{-1} ; -2 – 10^{-2} ; -3 – 10^{-3} ; -4 – 10^{-4} ; -5 – 10^{-5} ; -6 – 10^{-6} ; -7 – 10^{-7} ; K- negative control (H_2O); M – molecular weight marker 100–3000 bp

Получен необходимый продукт амплификации, равный примерно 483 п. н. у образца под номером 1 – ДНК *Candidatus Phytoplasma mali* (рис. 4), что свидетельствует о специфичности пары праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994). ДНК других видов фитоплазм не была детектирована на электрофореграмме.

После изучения аналитической специфичности праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) приступили к изучению их аналитической чувствительности. Для этого проводили 10-кратное разведение ДНК фитопатогенного микроорганизма *Candidatus Phytoplasma mali*, исходная концентрация ДНК равна 30,8 нг/мкл. Результаты исследования аналитической чувствительности представлены на рисунке 5.

По результатам изучения аналитической чувствительности праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) видно, что более качественный продукт амплификации получен при разведении ДНК микроорганизма *Candidatus Phytoplasma mali* в 1000 раз (10^{-3}). Меньший продукт амплификации получен при разведении образца в 10 000 раз (10^{-4}). Реакция не стабильна при разведении ДНК фитоплазмы в 100 000 раз (10^{-5}). При дальнейших разведениях продукт амплификации отсутствовал, т. е. ДНК возбудителя пролиферации яблоны не была выявлена. Проведенный анализ праймеров показывает их высокую чувствительность, что важно при низкой концентрации ДНК фитоплазмы в зараженном материале.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для получения достоверных результатов при изучении фитоплазм важно использовать наиболее чувствительные и точные молекулярно-генетические методы. Проведенный анализ праймеров F/R (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) для выявления фитоплазм *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* показывает их низкую селективность в отношении исследуемых видов фитопатогенов. На основании полученных результатов данные праймеры

the specificity of the AP5/AP4 primer pair (Jarausch et al., 1994). DNA of other phytoplasma species was not detected on the electrophoregram.

Studying the analytical specificity of the AP5/AP4 primers (Jarausch et al., 1994) was followed by studying their analytical sensitivity. For this, a 10-fold dilution of the DNA of the phytopathogenic microorganism *Candidatus Phytoplasma mali* was carried out, the initial DNA concentration was 30.8 ng/μl. The results of the study of the analytical sensitivity are shown in Figure 5.

According to the results of the study of the analytical sensitivity of primers AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994), it can be seen that a better amplification product was obtained by diluting the DNA of the microorganism *Candidatus Phytoplasma mali* by 1000 times (10^{-3}). A smaller amplification product was obtained by diluting the sample by 10,000 times (10^{-4}).

The reaction is not stable when the phytoplasma DNA is diluted 100,000 times (10^{-5}). At further dilutions, the amplification product was absent, i. e., the DNA of the causative agent of apple proliferation was not detected. The performed analysis of primers shows their high sensitivity, which is important at a low concentration of phytoplasma DNA in the infected material.

CONCLUSION

To obtain reliable results in the study of phytoplasmas, it is important to use the most sensitive and accurate molecular genetic methods. The analysis of F/R primers (Nikolić et al., 2010; Mehle et al., 2013) for the detection of phytoplasmas *Candidatus Phytoplasma mali*, *Candidatus Phytoplasma pyri*, *Candidatus Phytoplasma prunorum* shows their low selectivity for the studied species of phytopathogens. Based on the results obtained, these primers are recommended to be used as a universal test for the diagnosis of phytoplasmas.

The species-specific primer pair AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) for identifying the causative agent of apple proliferation shows high specificity and sensitivity, which is important when studying phytoplasmas.

The data obtained can be used in further research to improve existing and develop new methods for diagnosing especially dangerous phytoplasmas from the Apple proliferation group.

Acknowledgement. The authors are grateful to PhD in Biology G.N. Bondarenko (FGBU “VNIIEK”), the Syntol team (Russia), the Valencian Institute for Agricultural Research (IVIA) team for providing materials for the study.

REFERENCES

1. Bashkirova I., Matyashova G., Gins M. Detection and identification of pathogens of phytoplasmoses of

рекомендуется использовать в качестве универсального теста для диагностики фитоплазм.

Видоспецифичная пара праймеров AP5/AP4 (Jarausch et al., 1994) для идентификации возбудителя пролиферации яблони показывает высокую специфичность и чувствительность, что важно при изучении фитоплазм.

Полученные данные могут быть использованы в дальнейших исследованиях для усовершенствования существующих и разработки новых методов для диагностики особо опасных фитоплазм из группы Apple proliferation.

Благодарность. Авторы благодарны кандидату биологических наук Г.Н. Бондаренко (ФГБУ «ВНИИР»), коллективу ООО «Синтол» (Россия), коллективу Института сельскохозяйственных исследований Валенсии (Institut Valencia d'Investigacions Agraries, IVIA) за предоставление материалов для исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Башкирова И., Матяшова Г., Гинс М., 2018a. Выявление и идентификация возбудителей фитоплазмозов группы Apple proliferation на плодовых культурах. – Российская сельскохозяйственная наука, № 3: 10–14.
2. Башкирова И., Матяшова Г., Завриев С., Рязанцев Д., Шнейдер Ю., 2018b. Апробация тест-систем для детекции фитоплазм яблони и груши. – Защита и карантин растений, № 7: 40–41.
3. Башмакова Е. Выявление однонуклеотидных полиморфизмов на основе производных Ca^{2+} -регулируемого фотопротейна обелина: автореф. дис.... канд. биол. наук: 03.01.06. – Красноярск, 2017, 22 с.
4. Гирсова Н., Кастальева Т., Можаяева К. Методика определения фитоплазм с использованием молекулярных методов диагностики: ПЦР и ПДРФ. – М.: Россельхозакадемия, 2013, 23 с.
5. Елшин Н., Петров А., 2017. Изучение возможности использования метода qPCR для контроля отсутствия микоплазменной контаминации в клеточных культурах. – БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 17 (3): 173–179.
6. Каримова Е., Приходько Ю., Шнейдер Ю., 2019. Фитоплазмы – возбудители болезней косточковых плодовых культур. – Защита и карантин растений, № 5: 35–39.
7. Матяшова Г., Морозова О. Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя истощения груши *Candidatus Phytoplasma pyri* (Pear decline). – М.: ВНИИР, 2016, 39 с.
8. МСФМ 27. Международные стандарты по фитосанитарным мерам. Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов. ДП 12: Фитоплазмы. – 2018, 18 с.
9. Приходько Ю., Матяшова Г. Методические рекомендации по выявлению и идентификации возбудителя пролиферации яблони *Candidatus Phytoplasma mali* (Apple proliferation). – М.: ВНИИР, 2015, 80 с.
10. Свиридова Л., Ванькова А., 2012. Микоплазмы – патогены растений. – Нива Поволжья, № 4 (25): 26–32.
11. Шнейдер Ю., Приходько Ю., Шнейдер Е., Кулешова Ю. Оценка фитосанитарных рисков the Apple proliferation group on fruit crops [Vyyavleniye i identifikatsiya vozbuditeley fitoplazmozov gruppy Apple proliferation na plodovykh kulturakh]. *Russian agricultural science*, 2018a; 3: 10–14 (in Russian).
12. Bashkirova I., Matyashova G., Zavriev S., Ryzantsev D., Shneyder Yu. Approval of the test systems for the detection of the apple and pear phytoplasma. *Plant protection and quarantine*, 2018b; 7: 40–41.
13. Bashmakova E. Detection of single nucleotide polymorphisms based on derivatives of the Ca^{2+} -regulated photoprotein obelin [Vyyavleniye odnonukleotidnykh polimorfizmov na osnove proizvodnykh Ca^{2+} -reguliruyemogo fotoproteina obelina]: extended abstract of Cand. Biol. Sci. Dissertation: 03.01.06. Krasnoyarsk, 2017, 22 p. (in Russian).
14. Girsova N., Kastalyova T., Mozhaeva K. Method for determining phytoplasmas using molecular diagnostic methods: PCR and RFLP [Metodika opredeleniya fitoplazm s ispol'zovaniyem molekulyarnykh metodov diagnostiki: PCR i RFLP]. M.: Rosselkhozakademiya, 2013, 23 p. (in Russian).
15. Elshin N., Petrov A. Possibilities of qPCR control of mycoplasma contamination of cell cultures [Izucheniye vozmozhnosti ispol'zovaniya metoda qPCR dlya kontrolya ot-sut'stviya mikoplazmennoy kontaminatsii v kletochnykh kulturakh]. – *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*, 2017; 17 (3): 173–179 (in Russian).
16. Karimova E., Prikhodko Yu., Shneyder Yu. Phytoplasma – pathogenic agents of stone fruit crops diseases [Fitoplazmy – vozbuditeli bolezney kostochkovykh plodovykh kultur]. *Plant Protection and Quarantine*, 2019; 5: 35–39 (in Russian).
17. Matyashova G., Morozova O. Guidelines for the detection and identification of the causative agent of pear depletion *Candidatus Phytoplasma pyri* (Pear decline) [Metodicheskiye rekomendatsii po vyyavleniyu i identifikatsii vozbuditelya istoshcheniya grushi *Candidatus Phytoplasma pyri* (Pear decline)]. M.: VNIIR, 2016, 39 p. (in Russian).
18. ISPM 27. International standards for phytosanitary measures. Diagnostic protocols for regulated pests. DP 12: Phytoplasmas. 2018, 18 p.
19. Prikhodko Yu., Matyashova G. Guidelines for the detection and identification of the causative agent of apple proliferation *Candidatus Phytoplasma mali* (Apple proliferation) [Metodicheskiye rekomendatsii po vyyavleniyu i identifikatsii vozbuditelya proliferatsii yablони *Candidatus Phytoplasma mali* (Apple proliferation)]. M.: VNIIR, 2015, 80 p.
20. Sviridova L., Vankova A. Mycoplasmas are plant pathogens [Mikoplazmy – patogeny rasteniy]. *Niva Povolzhya*, 2012; 4 (25): 26–32 (in Russian).
21. Shneyder Yu., Prikhodko Yu., Shneyder E., Kuleshova Yu. Assessment of pest risk analysis associated with import, export and movement of seedlings, rootstocks and cuttings of stone fruit crops [Otsenka fitosanitarnykh riskov vrednykh organizmov, svyazannykh s importirovaniyem, eksportirovaniyem i peremeshcheniyem sazhentsev, podvoyev i cherenkov kostochkovykh plodovykh kultur] (ed. by T.V. Artemyeva). M.: VNIIR, 2017, 503 p.

вредных организмов, связанных с импортированием, экспортированием и перемещением саженцев, подвоев и черенков косточковых плодовых культур (под ред. Т.В. Артемьевой). – М.: ВНИИКР, 2017, 503 с.

12. Bashkirova I., Bondarenko G., Kornev K., 2019. Study of methods for detecting quarantine phytoplasma's from the apple proliferation group on the territory of Russia. – *Phytopathogenic Mollicutes*, 9 (1): 211–212. URL: <https://doi.org/10.5958/2249-4677.2019.00106.3>.

13. Duduk B. Molecular characterization of phytoplasmas detected in agronomically relevant crops in Serbia. – 2009, 127 p.

14. IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group, 2004. Correspondence G. Firrao. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, № 54: 1243–1255. URL: <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02854-0>.

15. Jarausch W., Saillard C., Dosba F., Bové J.M., 1994. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. – *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (8): 2916–2923. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.60.8.2916-2923.1994>.

16. Jomantiene R., Davis R.E., Valiunas D., Alminaitė A., 2002. New group 16SrIII phytoplasma lineages in Lithuania exhibit interoperon sequence heterogeneity. – *European Journal of Plant Pathology*, 108 (6): 507–517. URL: <https://doi.org/10.1023/A:1019982418063>.

17. Lee I.-M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E., 2000. Phytoplasma, phytopathogenic mollicutes. – *Annual Review of Microbiology*, 54 (1): 221–255. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.221>.

18. Mehle N., Nikolić P., Gruden K., Ravnikar M., Dermastia M., 2013. Real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from apple proliferation group. – *Phytoplasma: Methods and Protocols, Methods in molecular biology*, Vol. 938: 269–281. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_23.

19. Mehle N., Ravnikar M., Seljak G., Knapic V., Dermastia M., 2011. The most widespread phytoplasmas, vectors and measures for disease control in Slovenia. – *Phytopathogenic Mollicutes*, 1 (2): 65–76. URL: <https://doi.org/10.5958/j.2249-4669.1.2.012>.

20. Nikolić P., Mehle N., Gruden K., Ravnikar R., Dermastia M., 2010. A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. – *Molecular and Cellular Probes*, 24 (5): 303–309. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.06.005>.

21. Picard C., Afonso T., Benko-Beloglavec A., Karadjova O., Matthews-Berry S., Paunovic S.A., Pietsch M., Reed P., van der Gaag D.J., Ward M., 2018. Recommended regulated non-quarantine pests (RNQPs), associated thresholds and risk management measures in the European and Mediterranean region. – *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 48 (3): 552–568. URL: <https://doi.org/10.1111/epp.12500>.

22. PM 7/62 (3), 2020. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Ca. P. pyri' and 'Ca. P. prunorum'. – *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 50 (1): 69–85.

23. Seemüller E., Schneider B., 2004. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and

12. Bashkirova I., Bondarenko G., Kornev K. Study of methods for detecting quarantine phytoplasma's from the apple proliferation group on the territory of Russia. *Phytopathogenic Mollicutes*, 2019; 9 (1): 211–212. URL: <https://doi.org/10.5958/2249-4677.2019.00106.3>.

13. Duduk B. Molecular characterization of phytoplasmas detected in agronomically relevant crops in Serbia. 2009, 127 p.

14. IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma Taxonomy Group. Correspondence G. Firrao. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004; No. 54: 1243–1255. URL: <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02854-0>.

15. Jarausch W., Saillard C., Dosba F., Bové J.M. Differentiation of mycoplasma-like organisms (MLOs) in European fruit trees by PCR using specific primers derived from the sequence of a chromosomal fragment of the apple proliferation MLO. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994; 60 (8): 2916–2923. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.60.8.2916-2923.1994>.

16. Jomantiene R., Davis R.E., Valiunas D., Alminaitė A. New group 16SrIII phytoplasma lineages in Lithuania exhibit interoperon sequence heterogeneity. *European Journal of Plant Pathology*, 2002; 108 (6): 507–517. URL: <https://doi.org/10.1023/A:1019982418063>.

17. Lee I.-M., Davis R.E., Gundersen-Rindal D.E. Phytoplasma, phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 2000; 54 (1): 221–255. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.221>.

18. Mehle N., Nikolić P., Gruden K., Ravnikar M., Dermastia M. Real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from apple proliferation group. *Phytoplasma: Methods and Protocols, Methods in molecular biology*, 2013; Vol. 938: 269–281. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-089-2_23.

19. Mehle N., Ravnikar M., Seljak G., Knapic V., Dermastia M. The most widespread phytoplasmas, vectors and measures for disease control in Slovenia. *Phytopathogenic Mollicutes*, 2011; 1 (2): 65–76. URL: <https://doi.org/10.5958/j.2249-4669.1.2.012>.

20. Nikolić P., Mehle N., Gruden K., Ravnikar R., Dermastia M. A panel of real-time PCR assays for specific detection of three phytoplasmas from the apple proliferation group. *Molecular and Cellular Probes*, 2010; 24 (5): 303–309. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.06.005>.

21. Picard C., Afonso T., Benko-Beloglavec A., Karadjova O., Matthews-Berry S., Paunovic S.A., Pietsch M., Reed P., van der Gaag D.J., Ward M. Recommended regulated non-quarantine pests (RNQPs), associated thresholds and risk management measures in the European and Mediterranean region. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 2018; 48 (3): 552–568. URL: <https://doi.org/10.1111/epp.12500>.

22. PM 7/62 (3). 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Ca. P. pyri' and 'Ca. P. prunorum'. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 2020; 50 (1): 69–85.

23. Seemüller E., Schneider B. 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' and

'*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 54: 1217–1226. URL: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02823-0>.

24. Wei W., Lee I.-M., Davis R.E., Suo X., Zhao Y., 2008. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 58: 2368–2377. URL: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65868-0>.

25. Weintraub P.G., Beanland L., 2006. Insect vectors of phytoplasmas. – *Annual Review of Entomology*, Vol. 51: 91–111. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039>.

26. Woese C., 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. – *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, Vol. 97: 8392–8396. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8392>.

27. EPPO Global Database. – URL: <https://gd.eppo.int> (дата обращения: 19.05.2022).

28. The National Center for Biotechnology Information. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (дата обращения: 21.04.2022).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Башкирова Ида Геннадьевна, младший научный сотрудник – и. о. начальника научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; аспирант ФGAOU BO «РУДН», г. Москва, Россия; ORCID 0000-0001-9014-4179, e-mail: bashkirovaaid@mail.ru.

Каримова Елена Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник – начальник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru.

Смирнова Ирина Павловна, доктор биологических наук, заслуженный профессор ФGAOU BO «РУДН», г. Москва, Россия; ORCID 0000-0002-3584-9130, e-mail: smir-ip@yandex.ru.

'*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004; Vol. 54: 1217–1226. URL: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02823-0>.

24. Wei W., Lee I.-M., Davis R.E., Suo X., Zhao Y., 2008. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008; Vol. 58: 2368–2377. URL: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65868-0>.

25. Weintraub P.G., Beanland L. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 2006; Vol. 51: 91–111. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039>.

26. Woese C. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2000; Vol. 97: 8392–8396. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8392>.

27. EPPO Global Database. URL: <https://gd.eppo.int> (last accessed: 19.05.2022).

28. The National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (last accessed: 21.04.2022).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ida Bashkirova, Junior Researcher, Acting Head of Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; postgraduate student of FGAOU VO “RUDN University”, Moscow, Russia; ORCID 0000-0001-9014-4179, e-mail: bashkirovaaid@mail.ru.

Elena Karimova, PhD in Biology, Senior Researcher, Head of Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0001-6474-8913, e-mail: elenavkar@mail.ru.

Irina Smirnova, Advanced Doctor in Biology, Honored Professor of FGAOU VO “RUDN University”, Moscow, Russia; ORCID 0000-0002-3584-9130, e-mail: smir-ip@yandex.ru.

Испытание тест-системы для диагностики *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*

И.Н. ПИСАРЕВА¹, А.Б. ЯРЕМКО²,
С.И. ПРИХОДЬКО³, Е.Ю. ШНЕЙДЕР⁴

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»
(ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское,
Московская обл., Россия

¹ ORCID 0000-0002-3084-0591, e-mail: iruru@yandex.ru

² ORCID 0000-0003-3295-8080, e-mail: an_ya94@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-1281-4410,
e-mail: svetlana.prik@yandex.ru

⁴ ORCID 0000-0002-8198-363X, e-mail: seunch@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Черная бактериальная пятнистость томата широко распространена в мире и наносит значительный экономический ущерб при выращивании томата и перца. Диагностика осложнена тем, что заболевание вызывается четырьмя видами бактерий рода *Xanthomonas*. Основным путем распространения бактериоза на дальние расстояния являются семена. Европейская и Средиземноморская организация по карантину и защите растений (ЕОКЗР) включила группу возбудителей черной бактериальной пятнистости в Список А2 перечня карантинных объектов. Выявление и идентификация фитопатогенов на всех этапах производства томата и перца позволят вовремя принять меры по защите растений, что в значительной степени снизит потери урожая и повысит экономическую эффективность производства отечественных овощей. Существующие схемы диагностики болезни подразумевают большие трудозатраты и длительный срок проведения исследований, что неприемлемо в рутинной лабораторной диагностике. В статье представлены результаты исследований диагностики одного из возбудителей черной бактериальной пятнистости (*X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*). Для установления степени влияния растительной матрицы на конечные результаты исследований образцов нами был проведен ряд опытов по искусственному заражению *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* экстрактов вегетативных частей и семян томата. В ходе испытания методики подготовки проб с дальнейшим выделением ДНК и ПЦР-анализом искусственно зараженных образцов установлено, что ингибирования ПЦР не происходит. Аналитическая чувствительность тест-системы для диагностики *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* производства ООО «АгроДиагностика» составила 10³ КОЕ/мл. Исследования проведены на базе ФГБУ «ВНИИКР».

Ключевые слова. Черная бактериальная пятнистость томата, фитопатоген, выявление и идентификация, ПЦР, аналитическая чувствительность, ингибиторы.

Testing a test system for the diagnosis of *Xanthomonas euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*

I.N. PISAREVA¹, A.B. YAREMKO²,
S.I. PRIKHODKO³, E.YU. SHNEYDER⁴

FGBU "All-Russian Plant Quarantine Center"
(FGBU "VNIICR"), Bykovo, Ramenskoye,
Moscow Oblast, Russia

¹ ORCID 0000-0002-3084-0591, e-mail: iruru@yandex.ru

² ORCID 0000-0003-3295-8080, e-mail: an_ya94@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-1281-4410,
e-mail: svetlana.prik@yandex.ru

⁴ ORCID 0000-0002-8198-363X, e-mail: seunch@mail.ru

ABSTRACT

Bacterial spot of tomato is worldwide spread and causes significant economic damage in tomato and pepper cultivation. Diagnosis is complicated by the fact that the disease is caused by four types of bacteria of the genus *Xanthomonas*. Seeds are the main pathway for bacteriosis over long distances. The European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) has included a group of causative agents of black bacterial spot in List A2 of the List of Quarantine Objects. Detection and identification of phytopathogens at all stages of tomato and pepper cultivation will allow taking timely measures to protect plants, which will significantly reduce crop losses and increase the economic efficiency of domestic vegetable production. Existing schemes for diagnosing the disease imply large labor costs and a long period of research, which is unacceptable in routine laboratory diagnosis. The article presents the results of studies on the diagnosis of one of the pathogens of black bacterial spot (*X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*). To establish the degree of influence of the plant matrix on the final results of the samples study, we conducted a series of experiments on artificial infection with *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* of extracts of tomato vegetative parts and seeds. In the course of testing the sample preparation technique with further DNA isolation and PCR analysis of artificially infected samples, it was found that PCR inhibition does not occur. Analytical sensitivity of the diagnostic test system for *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* produced by AgroDiagnostics was 10³ cfu/ml. The studies were carried out on the basis of FGBU "VNIICR".

Key words. Bacterial spot of tomato, phytopathogen, detection and identification, PCR, analytical sensitivity, inhibitors.

ВВЕДЕНИЕ



условиях активной поддержки хозяйствующих субъектов государством, в последние годы происходит наращивание объемов производства томатов, что в первую очередь связано с политикой импортозамещения. Так, в Российской Федерации в 2016–2019 гг. валовой

сбор томатов, выращенных в открытом грунте, увеличился на 20,2% (с 1,73 до 2,08 млн т), в закрытом грунте – на 56,7% (с 0,60 до 0,94 млн т). На фоне пандемии коронавируса в 2020 г. валовой сбор томатов открытого и закрытого грунта относительно 2019 г. снизился на 3,3% и составил 2,92 млн т (Анализ рынка, 2021). Это произошло по причине ухудшения финансового положения овощеводческих компаний, поскольку себестоимость продукции выросла, а спрос на томаты сократился.

Однако российские производители овощей до сих пор находятся в зависимости от иностранного семенного материала. Семена томата ввозятся из Китая, Таиланда, США, Франции, Индии, Перу, Италии, Германии, Бразилии, Чехии и других стран (Шнейдер, 2020).

Томаты открытого грунта выращивают в регионах с теплым и влажным климатом, что является благоприятным условием для развития не только растений, но и фитопатогенных микроорганизмов. В данных условиях повышенную вредоносность проявляют бактериальные болезни, в частности черная бактериальная пятнистость томата. Пораженность рассады томатов достигает 80–100%, потери плодов – 70% (Ахатов, 2016; Иванцова, 2017).

Черная бактериальная пятнистость томата – заболевание пасленовых культур, которое встречается во всем мире (Roach et al., 2018; www.cabi.org/isc). Возбудителями болезни являются *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. hortorum* pv. *gardneri* и *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xanthomonas* spp.) (gd.eppo.int). Основными растениями-хозяевами считаются томат *Solanum lycopersicum* и перец *Capsicum annuum* (Potnis et al., 2015). Симптомы проявляются на всех надземных частях растения: семядолях, листьях, черешках, стеблях и плодах томата и перца. На листьях сеянцев и молодых растений сначала появляются точечные водянистые пятна, которые со временем увеличиваются до 2 мм, центр пятен становится почти черным с желтым ореолом. Пятна на листьях взрослых растений располагаются по краям листовой пластинки. На черешках и стеблях пятна удлиненной формы, черного цвета. На зеленых плодах появляются темные выпуклые точки с водянистой каймой, позже пятна увеличиваются до 6–8 мм, западают и образуют язвочки. Ткань под пятнами у зрелых плодов загнивает (Белошапкина и др., 2017; Иванцова, 2017).

Бактериоз передается семенами в виде поверхностной инфекции. Латентно зараженная рассада также является причиной распространения патогена (EPPO, 2013). Основная и эффективная мера борьбы – использование семян и рассады томатов, свободных от возбудителей болезни (Fatmi et al., 2017). Таким образом, своевременная и качественная диагностика возбудителей бактериальной пятнистости томата в семенах и рассаде может

INTRODUCTION

In the context of active support of economic entities by the state, in recent years there has been an increase in tomato production, which is primarily due to the policy of import substitution.

So, in 2016–2019, in the Russian Federation the gross harvest of tomatoes grown in open ground increased by 20.2% (from 1.73 to 2.08 million tons), in protected ground – by 56.7% (from 0.60 to 0.94 million tons). Against the backdrop of the coronavirus pandemic in 2020, the gross harvest of open and protected ground tomatoes decreased by 3.3% compared to 2019 and amounted to 2.92 million tons (Market analysis, 2021). This happened due to the deterioration of the financial situation of vegetable growing companies, as the cost of production increased, and the demand for tomatoes decreased.

However, Russian vegetable producers are still dependent on foreign seed material. Tomato seeds are imported from China, Thailand, USA, France, India, Peru, Italy, Germany, Brazil, Czech Republic and other countries (Shneyder, 2020).

Open ground tomatoes are grown in regions with a warm and humid climate, which is a favorable condition for the development of not only plants, but also phytopathogenic microorganisms. Under these conditions, bacterial diseases, in particular bacterial spot of tomato, show increased harmfulness. Infection of tomato seedlings reaches 80–100%, fruit loss – 70% (Akhatov, 2016; Ivantsova, 2017).

Black spot of tomato is a disease of Solanaceae crops that occurs throughout the world (Roach et al., 2018; www.cabi.org/isc). The causative agents of the disease are *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. hortorum* pv. *gardneri* and *X. euvesicatoria* pv. *perforans* (*Xanthomonas* spp.) (gd.eppo.int). The main host plants are considered to be tomatoes *Solanum lycopersicum* and peppers *Capsicum annuum* (Potnis et al., 2015). Symptoms appear on all above-ground parts of the plant: cotyledons, leaves, petioles, stems and fruits of tomato and pepper. On the leaves of seedlings and young plants, dotted watery spots first appear, which eventually increase to 2 mm, the center of the spots becomes almost black with a yellow halo. Spots on the leaves of adult plants are located along the edges of the leaf blade. On petioles and stems spots are elongated, black. Dark convex dots with a watery border appear on green fruits, later the spots increase to 6–8 mm, sink down and form ulcers. The tissue under spots in mature fruits rots (Beloshapkina et al., 2017; Ivantsova, 2017).

The bacteriosis is transmitted by seeds as a surface infection. Latently infected seedlings are also responsible for the spread of the pathogen (EPPO, 2013). The main and effective control measure is the use of pathogen-free tomato seeds and seedlings (Fatmi et al., 2017). Thus, timely and high-quality diagnostics of tomato bacterial spot pathogens in seeds and seedlings can help reduce crop losses and increase the economic efficiency of domestic vegetable production.

To date, in the international practice of diagnosing *Xanthomonas* spp. the following documents are applied:

способствовать снижению потерь урожая и повышению экономической эффективности производства отечественных овощей.

На сегодняшний день в международной практике диагностики *Xanthomonas* spp. применяются следующие документы: региональный стандарт ЕОКЗР РМ 7/110 (1) (EPPO, 2013), протокол испытаний Международной федерации по семеноводству (ISF) («Метод обнаружения *Xanthomonas* spp. в семенах томатов») (ISF, 2017).

В РМ 7/110 (1) предложена схема диагностики *Xanthomonas* spp. в вегетативных частях растений с симптомами заболевания и семенном материале томата. Стоит отметить, что данный подход недопустимо применять для диагностики скрытой формы заражения. В протоколе ISF предложена схема для выявления патогена только из семян. При этом обе лабораторные схемы предусматривают обязательную предварительную изоляцию бактерии на полуселективные питательные среды с последующим скринингом и идентификацией подозрительных колоний с помощью молекулярных методов.

Таким образом, главным недостатком предложенных схем выявления и идентификации *Xanthomonas* spp. является длительность проведения исследований: от момента получения растительных экстрактов до появления типичных колоний на питательных средах проходит около 5–10 дней.

С целью изучения возможности сокращения времени выявления и идентификации изучаемого бактериоза за счет прямого выделения ДНК из растительных образцов с последующей постановкой ПЦР (полимеразной цепной реакции), проведен опыт искусственного заражения экстрактов вегетативных частей и семян томата одним из возбудителей болезни.

Результаты опыта оценивали с помощью тест-системы для диагностики черной бактериальной пятнистости томата (*X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*) производства ООО «АгроДиагностика» (Россия). В состав коммерческого набора входит внутренний положительный контроль (ВПК), позволяющий оценить как работоспособность всех компонентов реакционной смеси, так и влияние растительной матрицы (т. е. находящихся в ней ингибиторов) на прохождение ПЦР. Поскольку тест-система разработана только для диагностики одного из четырех возбудителей болезни – *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, именно этот штамм использовали для искусственного заражения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка аналитических проб из вегетативных частей томата. Для приготовления смешанного образца использовали сорта томатов Бейсужек и Вишня красная. Листья и стебли мелко нарезали кусочками (примерно 0,5 см). Готовили по 8 навесок двух вариантов – размером 1 г и 2 г. Навески помещали в стерильные пластиковые емкости объемом 120 мл и заливали 30 мл стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS) (рис. 1).

Затем емкости переносили на орбитальный шейкер Unimax 2010 (Heidolph, Германия) на 1 час (режим – 200 об/мин) при комнатной температуре. Далее проводили фильтрацию через бумажный фильтр в центрифужные пробирки типа Oak Ridge (Nalgene, Thermo Fisher Scientific, США)

EPPO regional standard PM 7/110 (1) (EPPO, 2013), International Seed Federation (ISF) Test Report (Method for the detection of *Xanthomonas* spp. in tomato seed) (ISF, 2017).

PM 7/110 (1) suggests a diagnosis scheme for *Xanthomonas* spp. in vegetative parts of plants with symptoms of the disease and tomato seeds. It should be noted that this approach cannot be used to diagnose a latent form of infection. The ISF protocol proposes a scheme for pathogen detection from seeds only. At the same time, both laboratory schemes provide for mandatory preliminary isolation of the bacterium on semi-selective nutrient media, followed by screening and identification of suspicious colonies using molecular methods.

Thus, the main disadvantage of the proposed schemes for the detection and identification of *Xanthomonas* spp. is the duration of the research: from the moment of obtaining plant extracts to the appearance of typical colonies on nutrient media, it takes about 5–10 days.

In order to study the possibility of reducing the time of detection and identification of the studied bacteriosis due to direct isolation of DNA from plant samples with subsequent PCR (polymerase chain reaction), an experiment was carried out on artificial infection of extracts of tomato vegetative parts and seeds with one of the pathogens.

The results of the experiment were evaluated using a test system for the diagnosis of bacterial spot of tomato (*X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*) produced by AgroDiagnostica (Russia). The commercial kit includes an internal positive control (IPC), which allows to evaluate both the performance of all components of the reaction mixture and the effect of the plant matrix (i. e., the inhibitors contained in it) on the PCR. Since the test system is designed only for the diagnosis of one of the four pathogens – *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, this particular strain was used for artificial infection.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of analytical samples from tomato vegetative parts. To prepare a mixed sample, the Beysuzhek and Red Cherry tomato varieties were used. The leaves and stems were finely chopped into pieces (about 0.5 cm). We prepared 8 weightings of two variants, 1 g and 2 g in size. The weighed portions were placed in sterile plastic containers with a volume of 120 ml and filled with 30 ml of sterile phosphate-buffered saline (PBS) (Fig. 1).

Then the containers were transferred to a Unimax 2010 orbital shaker (Heidolph, Germany) for 1 hour (200 rpm) at room temperature. Then, filtration was carried out through a paper filter into Oak Ridge centrifuge tubes (Nalgene, Thermo Fisher Scientific, USA) and centrifuged on an Allegra X-30 device (Beckman Coulter, USA) for 10 min at a speed of 10,000 rpm at 10 °C. The supernatant was carefully discarded. The precipitate was dissolved in 1 ml of sterile PBS by thorough vortexing. Thus, 8 ml of each extract variant was obtained.

Artificial infection of tomato vegetative parts. Artificial infection of pre-prepared extracts was carried out

и центрифугировали на приборе Allegra X-30 (Beckman Coulter, США) 10 мин со скоростью 10 000 об/мин при 10 °С. Супернатант аккуратно сливали. Осадок растворяли в 1 мл стерильного PBS путем тщательного встряхивания на vortexe. Таким образом получили по 8 мл каждого варианта экстракта.

Искусственное заражение вегетативных частей томата. Искусственное заражение заранее подготовленных экстрактов проводили бактериальной суспензией чистой культуры типового штамма *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (DSM 19128) (рис. 2) из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (The Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). Готовили 8 последовательных 10-кратных разведений в двух вариантах экстракта и в стерильном фосфатно-солевом буфере.

Последовательное разведение в PBS использовали для количественного учета микроорганизмов. На плотную питательную среду – декстрозно-дрожжевой карбонатный агар (YDC) – высевали 5, 6 и 7-е разведения культуры в 2-кратной повторности по 100 мкл. После 72 часов инкубирования проводили подсчет колоний на чашках и определяли количество КОЕ/мл в нулевом и последующих разведениях по формуле:

$$M = \frac{a \cdot 10^n}{V},$$

где M – количество клеток в 1 мл, а – среднее количество колоний, выросших после посева из данного разведения, 10^n – коэффициент разведения, V – объем суспензии, использованной для посева (Нетрусов, 2005).

Искусственное заражение семян. Для приготовления смешанного образца семян использовали более 10 сортов (Пиноккио, Бычье сердце, Оранжевый Балконное чудо, Волгоградский и др.). Навеску семян размером 10 г помещали в пакет для гомогенизации, заливали 20 мл суспензии бактерий *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* в стерильном PBS ($\approx 10^6$ КОЕ/мл) и размещали в шейкере-инкубаторе INNOVA 43 (New Brunswick, США) на 4 часа при 10 °С и режиме вращения 90 об/мин. Затем излишки суспензии сливали через бумажный фильтр и просушивали семена при комнатной температуре в течение 20 часов. Семена смешивали в соотношении зараженных семян к здоровым: 1 : 10, 1 : 20, 1 : 100. В итоге получили 5 вариантов семян с разным уровнем зараженности: 100%, 10%, 5%, 1% и незараженные семена (отрицательный контроль).

Подготовка аналитических проб из семян. Подготовку проб пяти вариантов опыта проводили методом гомогенизации (EPPO, 2013).

Выделение ДНК. Зараженные экстракты в объеме 200 мкл использовали для выделения ДНК с помощью коммерческого набора «Проба-ГС»



Рис. 1. Подготовка аналитических проб из вегетативных частей томата (фото А.Б. Яремко)

Fig. 1. Preparation of analytical samples from tomato vegetative parts (photo by A.B. Yaremko)

with a bacterial suspension of a pure culture of the typical strain *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* (DSM 19128) (Fig. 2) from The Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. There were 8 consecutive 10-fold dilutions in two versions of the extract and in sterile phosphate-buffered saline.

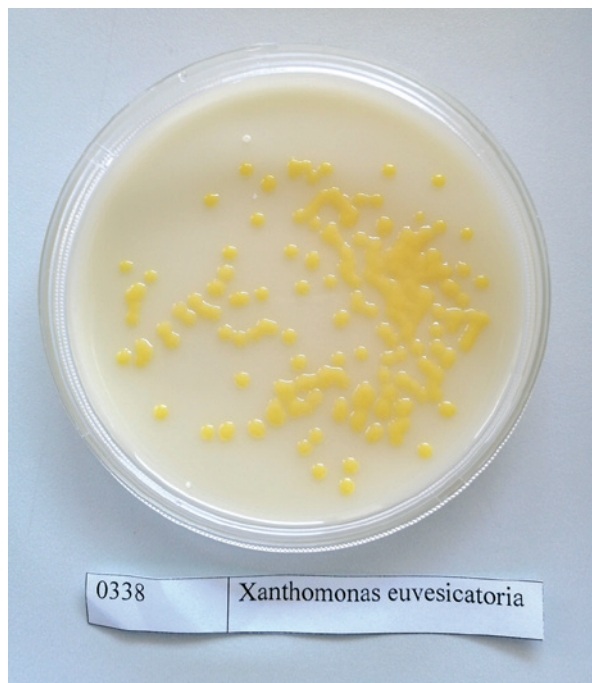


Рис. 2. Чистая культура *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* на среде YDC после 72 часов инкубации (фото И.Н. Писаревой)

Fig. 2. Pure culture of *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* on YDC medium after 72 hours of incubation (photo by I.N. Pisareva)

(ООО «АгроДиагностика»). Метод основан на принципе лизиса тканей в растворе гуанидинтиоцианата (GuSCN) с адсорбцией тотальной ДНК на поверхности сорбента (диоксид кремния) и дальнейших 3-кратных промывок соответствующими растворами. Проводится согласно инструкции фирмы-производителя.

ПЦР-анализ. Для выявления и идентификации ДНК *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* использовали тест-систему в формате ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) производства ООО «АгроДиагностика». Условия ПЦР использовали согласно инструкции производителя.

Для постановки ПЦР-РВ использовали термоджиклер CFX96 C1000 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Специфичную реакцию оценивали по каналу флуоресценции FAM, внутренний положительный контроль (ВПК) – по каналу HEX. При постановке ПЦР использовали 3-кратную повторность.

Serial dilution in PBS was used to quantify microorganisms. The 5th, 6th, and 7th dilutions of the culture were sown on a dense nutrient medium, yeast dextrose carbonate agar (YDC), in 2-fold replication, 100 µl each. After 72 hours of incubation, colonies were counted on plates and the number of CFU/ml was determined in zero and subsequent dilutions according to the formula:

$$M = \frac{a \cdot 10^n}{V},$$

where M is the number of cells in 1 ml, a – average number of colonies that grew after inoculation from a given dilution, 10ⁿ – dilution factor, V is the volume of the suspension used for sowing (Netrusov, 2005).

Artificial infection of seeds. For the preparation of a mixed seed sample, more than 10 varieties were used (Pinocchio, Bychye serdtse, Orange, Balkonnoe chudo, Volgogradsky, etc.). A 10 g sample of seeds was placed in a bag for homogenization, poured 20 ml of

Таблица 1

Результаты испытания тест-системы на искусственно зараженных экстрактах вегетативных частей томата

Table 1

Examine results of the test system on artificially infected extracts of tomato vegetative parts

Разведения Dilutions	Повторности Repetitions	Количество клеток Number of cells	Навеска 1 г Sample 1 g		Навеска 2 г Sample 2 g	
			Канал детекции, значение порогового цикла, Ct Detection channel, cycle threshold value, Ct			
			FAM	HEX	FAM	HEX
1	1	2,6 x 10 ⁷	22,73	29,07	22,81	29,16
	2		22,88	28,63	22,86	28,85
	3		22,57	29,12	22,76	29,32
2	1	2,6 x 10 ⁶	26,47	29,23	26,24	28,97
	2		26,33	29,45	26,16	29,42
	3		26,61	29,35	26,31	29,47
3	1	2,6 x 10 ⁵	29,61	29,41	29,95	29,36
	2		29,94	29,92	29,77	29,77
	3		29,74	29,78	30,12	29,87
4	1	2,6 x 10 ⁴	33,19	29,65	32,96	29,54
	2		33,10	29,83	32,97	30,01
	3		33,28	29,45	32,95	29,56
5	1	2,6 x 10 ³	36,54	29,64	35,75	29,08
	2		36,19	29,33	36,03	29,69
	3		36,88	29,47	35,47	29,54
6	1	2,6 x 10 ²	–	29,44	40,23	29,33
	2		39,66	29,67	–	29,03
	3		–	29,89	–	29,55
7	1	2,6 x 10 ¹	–	29,91	–	29,13
	2		–	29,78	–	29,08
	3		–	29,57	–	29,27
8	1	2,6 x 10 ⁰	–	29,31	–	29,23
	2		–	29,73	–	29,30
	3		–	29,72	–	29,29

Таблица 2
Результаты испытания тест-системы
при разных уровнях зараженности семян
томата

Table 2
Examine results of the test system
at different infection levels of tomato seeds

Зараженность, % Infection, %	Повторности Repetitions	Канал детекции, значение порого- вого цикла, Ct Detection channel, cycle threshold value, Ct	
		FAM	HEX
100	1	17,39	29,36
	2	17,12	29,27
	3	17,34	29,32
10	1	22,81	28,55
	2	22,98	28,68
	3	22,75	28,47
5	1	23,72	28,54
	2	24,03	28,14
	3	23,94	28,27
1	1	26,84	29,13
	2	26,97	29,22
	3	27,02	29,24
Отрицательный контроль Negative control	1	–	28,56
	2	–	28,48
	3	–	28,52

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе проведено испытание произведенной ООО «АгроДиагностика» тест-системы для диагностики одного из возбудителей черной бактериальной пятнистости томата – *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. Данный комплект реагентов предназначен для постановки ПЦР-РВ. В реакционную смесь входит внутренний положительный контроль, что позволяет оценивать ингибирование ПЦР при прямом выделении ДНК бактерий из растительных экстрактов.

Для оценки чувствительности тест-системы был проведен количественный учет бактерий, используемых для заражения экстрактов вегетативных частей томата. Количество КОЕ в 1 мл нулевого разведения равно $2,6 \times 10^8$.

Результаты испытаний тест-системы производства ООО «АгроДиагностика» для выявления и идентификации ДНК *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*, выделенной из искусственно зараженных экстрактов вегетативных частей и семян томата, представлены в таблицах 1–2.

Стабильные результаты детекции целевой ДНК (FAM) в обоих вариантах отмечены с 1-го по 5-е разведение. Таким образом, аналитическая чувствительность составила $2,6 \times 10^3$. Также отмечено, что ВПК (HEX) сработал во всех разведениях, что

а suspension of bacteria *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* in sterile PBS ($\approx 10^6$ CFU/ml) and placed in an INNOVA 43 shaker-incubator (New Brunswick, USA) for 4 hours at 10 °C and a rotation mode of 90 rpm. Then, the excess suspension was poured through a paper filter and the seeds were dried at room temperature for 20 hours. The seeds were mixed in the ratio of infected seeds to healthy ones: 1 : 10, 1 : 20, 1 : 100. As a result, 5 variants of seeds with different levels of infection were obtained: 100%, 10%, 5%, 1% and uninfected seeds (negative control).

Preparation of analytical samples from seeds. Preparation of samples of five variants of the experiment was carried out by the homogenization method (EPPO, 2013).

DNA isolation. Infected extracts in a volume of 200 µl were used for DNA isolation using the Proba-GS commercial kit (AgroDiagnostica, Russia). The method is based on the principle of tissue lysis in a guanidinium thiocyanate solution (GuSCN) with the adsorption of total DNA on the surface of the sorbent (silicon dioxide) and subsequent 3-fold washing with appropriate solutions. Carried out according to the manufacturer's instructions.

PCR analysis. For *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* DNA detection and identification, we used Real-Time PCR test system (RT-PCR) by AgroDiagnostica. PCR conditions were used according to the manufacturer's instructions.

Real-time PCR was performed using a CFX96 C1000 Touch thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). The specific reaction was assessed by the FAM fluorescence channel, and the internal positive control (IPC) was assessed by the HEX channel. When setting up PCR, a 3-fold repetition was used.

RESULTS AND DISCUSSION

In this work, an AgroDiagnostica test system was examined for the diagnosis of one of the pathogens of bacterial spot of tomato – *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. This set of reagents is intended for RT-PCR. The reaction mixture includes an internal positive control, which makes it possible to evaluate PCR inhibition during direct isolation of bacterial DNA from plant extracts.

To assess the sensitivity of the test system, a quantitative account of the bacteria used to infect extracts of tomato vegetative parts was carried out. The number of CFU in 1 ml of zero dilution is 2.6×10^8 .

Examine results of the AgroDiagnostica test system to detect and identify *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* DNA isolated from artificially infected extracts of tomato vegetative parts and seeds are presented in Tables 1–2.

Stable results of detection of the target DNA (FAM) in both variants were noted from the 1st to the 5th dilution. Thus, the analytical sensitivity was 2.6×10^3 . It was also noted that HEX worked in all dilutions, indicating no PCR inhibition. At the same time, the value of the threshold cycle through the HPC channel (HEX) in both variants is approximately the same, which indicates the absence of the influence of the sample size on the PCR.

указывает на отсутствие ингибирования ПЦР. При этом значение порогового цикла по каналу ВПК (HEX) в обоих вариантах примерно одинаковое, что свидетельствует об отсутствии влияния размера навески на прохождение ПЦР.

Из таблицы 2 видно, что выявление *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* отмечено при всех уровнях зараженности семян. Внутренний контроль сработал во всех реакциях, что указывает на отсутствие ингибирования ПЦР.

Предварительно для выявления *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* в растительных экстрактах вегетативных частей и семян можно рекомендовать тест-системы производства ООО «АгроДиагностика» для диагностики этой бактерии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для сокращения времени диагностики *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* и установления степени влияния растительной матрицы на конечные результаты исследований образцов растений и семян томата нами были проведены опыты по искусственному заражению *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* экстрактов вегетативных частей и семян томата. В ходе испытания методики подготовки проб с дальнейшим выделением ДНК и ПЦР-анализом искусственно зараженных образцов установлено, что ингибирования ПЦР не происходит.

Проведенные исследования показали возможность использования тест-системы в формате ПЦР-РВ производства ООО «АгроДиагностика» для прямого выявления *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* из растительных экстрактов, однако, очевидным недостатком тест-системы является возможность диагностики только одного из четырех возбудителей болезни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахатов А. Мир томата глазами фитопатолога. 3-е изд., испр. и доп. – М.: Тов-во науч. изданий «КМК», 2016, 292 с.
2. Белошапкина О. и др. Защита растений: фитопатология и энтомология. – Ростов н/Д: Феникс, 2017, 478 с.
3. Иванцова Е., 2017. Болезни томата в Нижневолжском регионе. – Фермер. Поволжье, № 2: 80–82.
4. Нетрусов А. и др. Практикум по микробиологии. – М.: Академия, 2005, 571 с.
5. Шнейдер Е., Шнейдер Ю., 2020. Систематизация перечня и категоризация вредных организмов, связанных с импортированием, экспортированием и перемещением семян пасленовых культур. – НИР, ФГБУ «ВНИИКР», 147 с.
6. EPPO, 2013. PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. – Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 43 (1): 7–20.
7. Fatmi M., Walcott R., Schaad N. Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material, Second Edition. – Minnesota: The American Phytopathological Society (APS), 2017, 360 p.
8. ISF, 2017. Method for the detection of *Xanthomonas* spp. in Tomato seed. – URL: https://worldseed.org/wp-content/uploads/2022/01/2017_Protocol_Tomato_Xanthomonas_spp_v5.pdf (дата обращения: 30.06.2022).

Table 2 shows that the detection of *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* was noted at all levels of seed infection. The internal control worked in all reactions, indicating no PCR inhibition.

Preliminary for detection of *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* in plant extracts of vegetative parts and seeds, AgroDiagnostica test systems can be recommended for the diagnosis of this bacterium.

CONCLUSION

To reduce the diagnostic time for *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* and establishing the degree of influence of the plant matrix on the final results of studies of plant samples and tomato seeds, we conducted experiments on artificial infection of extracts of tomato vegetative parts and seeds with *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria*. In the course of testing the sample preparation technique with further DNA isolation and PCR analysis of artificially infected samples, it was found that PCR inhibition does not occur.

The conducted studies have shown the possibility of using the AgroDiagnostica test system in the PCR-RT format for direct detection of *X. euvesicatoria* pv. *euvesicatoria* from plant extracts, however, the obvious disadvantage of the test system is the ability to diagnose only one of the four pathogens.

REFERENCES

1. Akhatov A. The world of tomato through the eyes of a phytopathologist [Mir tomata glazami fitopatologa]. 3rd ed., rev. and additional. M.: Tov-in scientific. editions of KMK, 2016, 292 p. (in Russian).
2. Beloshapkina O. et al. Plant protection: phytopathology and entomology [Zashchita rasteniy: fitopatologiya i entomologiya]. Rostov n/a: Phoenix, 2017, 478 p. (in Russian).
3. Ivantsova E. Tomato diseases in the Lower Volga region [Bolezni tomata v Nizhnevolzhskom regione]. Farmer. Volga Region, 2017; 2: 80–82 (in Russian).
4. Netrusov A. et al. Workshop on microbiology [Praktikum po mikrobiologii]. M.: Academy, 2005, 571 p. (in Russian).
5. Shneyder E., Shneyder Yu. Systematization of the list and categorization of pests associated with the import, export and movement of seeds of Solanaceae crops [Sistematizatsiya perechnya i kategorizatsiya vrednykh organizmov, svyazannykh s importirovaniyem, eksportirovaniyem i peremeshcheniyem semyan paslenovykh kultur]. Research, FGBU «VNIIR», 2020, 147 p.
6. EPPO. PM 7/110 (1) *Xanthomonas* spp. (*Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas vesicatoria*) causing bacterial spot of tomato and sweet pepper. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 2013; 43 (1): 7–20.
7. Fatmi M., Walcott R., Schaad N. Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material, Second Edition. Minnesota: The American Phytopathological Society (APS), 2017, 360 p.
8. ISF, 2017. Method for the detection of *Xanthomonas* spp. in Tomato seed. URL: https://worldseed.org/wp-content/uploads/2022/01/2017_Protocol_Tomato_Xanthomonas_spp_v5.pdf (last accessed: 30.06.2022).

9. Potnis N., Timilsina S., Strayer A., Shantharaj D., Barak J., Paret M., Vallad G., Jones J., 2015. Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. – *Molecular Plant Pathology*, 16 (9): 907–920.

10. Roach R., Mann R., Gambley C., Shivas R., Rodoni B., 2018. Identification of *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli crops in eastern Australia. – *European Journal of Plant Pathology*, 150 (3): 595–608.

11. Анализ рынка томатов в России в 2016–2020 гг. Оценка влияния коронавируса и прогноз на 2021–2025 гг. [Электронный ресурс]. – URL: <https://businessstat.ru/catalog/id8248> (дата обращения: 30.09.2021).

12. CABI. Invasive Species Compendium. – URL: <https://www.cabi.org/isc> (дата обращения: 30.06.2022).

13. EPPO Global Database. – URL: <https://gd.eppo.int> (дата обращения: 30.06.2022).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Писарева Ирина Николаевна, научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0002-3084-0591, e-mail: iruru@yandex.ru.

Яремко Анастасия Богдановна, младший научный сотрудник научного отдела молекулярно-генетических методов диагностики ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0003-3295-8080, e-mail: an_ya94@mail.ru.

Приходько Светлана Игоревна, научный сотрудник, заведующая лабораторией бактериологии и анализа ГМО ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0002-1281-4410, e-mail: svetlana.prik@yandex.ru.

Шнейдер Елена Юрьевна, старший научный сотрудник научно-методического отдела вирусологии и бактериологии ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0002-8198-363X, e-mail: seunch94@mail.ru.

9. Potnis N., Timilsina S., Strayer A., Shantharaj D., Barak J., Paret M., Vallad G., Jones J. Bacterial spot of tomato and pepper: diverse *Xanthomonas* species with a wide variety of virulence factors posing a worldwide challenge. *Molecular Plant Pathology*, 2015; 16 (9): 907–920.

10. Roach R., Mann R., Gambley C., Shivas R., Rodoni B. Identification of *Xanthomonas* species associated with bacterial leaf spot of tomato, capsicum and chilli crops in eastern Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 2018; 150 (3): 595–608.

11. Analysis of the tomato market in Russia in 2016–2020. Coronavirus impact assessment and forecast for 2021–2025 [Electronic resource]. URL: <https://businessstat.ru/catalog/id8248> (last accessed: 30.09.2021).

12. CABI. Invasive Species Compendium. URL: <https://www.cabi.org/isc> (last accessed: 30.06.2022).

13. EPPO Global Database. URL: <https://gd.eppo.int> (last accessed: 30.06.2022).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Irina Pisareva, Researcher, Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0002-3084-0591, e-mail: iruru@yandex.ru.

Anastasia Yaremko, Junior Researcher, Research Department of Molecular and Genetic Diagnosis Methods, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0003-3295-8080, e-mail: an_ya94@mail.ru.

Svetlana Prihodko, Researcher, Head of Laboratory of Bacteriology and GMO Analysis, Testing Laboratory Center, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0002-1281-4410, e-mail: svetlana.prik@yandex.ru.

Elena Shneyder, Senior Researcher, Research and Methodology Department of Virology and Bacteriology, FGBU “VNIKR”, Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0002-8198-363X, e-mail: seunch94@mail.ru.

Изучение видового состава цикадовых (Auchenorrhyncha) в ампелоценозах Республики Крым

Б.Б. ХАМАЕВА¹, Г.Н. БОНДАРЕНКО^{1, 2},
Я.Э. РАДИОНОВСКАЯ³

¹ ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»), р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (ФГАОУ ВО «РУДН»), г. Москва, Россия

³ ФГБУН «Всероссийский национальный научно-исследовательский институт виноградарства и виноделия «Магарах» РАН», (ФГБУН «ВНИИВиВ «Магарах» РАН»), г. Ялта, Республика Крым, Россия

¹ ORCID 0000-0003-2923-5762, e-mail: airta@mail.ru

² ORCID 0000-0002-1635-2508, e-mail: reseachergm@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-9124-8436, e-mail: vovkayalta@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Все виды Auchenorrhyncha являются облигатными фитофагами и наносят вред растениям. Некоторые из этих видов – серьезные вредители сельскохозяйственных культур, негативно влияющие на их продуктивный потенциал, а многие – переносчики инфекционных заболеваний растений. Семейства, которые имеют хозяйственное значение, – это циклиды (Cixiidae), дельфациды (Delphacidae), певчие цикады (Cicadidae), пенницы (Cercopidae), горбатки (Membracidae) и цикадки (настоящие) (Cicadellidae) (Гнездилов, 2000).

В статье представлены данные видового состава цикадовых в ампелоценозах Республики Крым за 2019–2020 гг.; также была проведена идентификация инвазионного, агрессивно распространяющегося по территории вида – цикадки белой *Metcalfa pruinosa* (Say, 1830). Сбор имаго осуществляли с июня по сентябрь с использованием желтых клеевых ловушек. Идентификация насекомых была проведена морфологическим и молекулярно-генетическим методами. Были выявлены 12 видов цикадовых, два из которых представляют опасность в качестве переносчиков заболеваний. Это инвазионный вид цикадка североамериканская *Scaphoideus titanus* Ball, 1932 и цикадка вьюнковая *Hyalesthes obsoletus* Signoret, 1865, борьбу с которыми необходимо организовывать в ампелоценозах республики. Еще 2 вида, выявленные на Крымском полуострове, – цикадка японская виноградная *Arboridia kakogawana* (Matsumura, 1932) и цикадка белая *Metcalfa pruinosa* Say, 1830 – могут быть потенциальными векторами возбудителей болезней винограда. Следует отметить, что инвазивные насекомые в новых условиях могут принять функцию вектора, в связи с чем их изучение является актуальной задачей для специалистов направления защиты растений.

Study of the species composition of Auchenorrhyncha in ampelocenoses of the Republic of Crimea

B.B. KHAMAEVA¹, G.N. BONDARENKO^{1, 2},
YA.E. RADIONOVSKAYA³

¹ FGBU "All-Russian Plant Quarantine Center" (FGBU "VNIICR"), Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia

² FGAOU VO "Peoples' Friendship University of Russia" (FGAOU VO "RUDN University"), Moscow, Russia

³ All-Russian National Research Institute of Viticulture and Winemaking "Magarach" RAS (FGBUN "VNNIIViV "Magarach" RAS"), Yalta, Republic of Crimea, Russia

¹ ORCID 0000-0003-2923-5762, e-mail: airta@mail.ru

² ORCID 0000-0002-1635-2508, e-mail: reseachergm@mail.ru

³ ORCID 0000-0002-9124-8436, e-mail: vovkayalta@mail.ru

ABSTRACT

All Auchenorrhyncha species are obligate phytophages and are harmful to plants. Some of these species are serious pests of crops that negatively affect their productive potential, and many are vectors of infectious plant diseases. Families that are of economic importance are Cixiidae, Delphacidae, Cicadidae, Cercopidae, Membracidae and Cicadellidae (Gnezdilov, 2000).

The article presents data on the species composition of Auchenorrhyncha in ampelocenoses of the Republic of Crimea for 2019–2020; the identification of an invasive species aggressively spreading over the territory was also carried out – *Metcalfa pruinosa* (Say, 1830). Imagoes were collected from June to September using yellow sticky traps. The identification of insects was carried out by morphological and molecular genetic methods. 12 Auchenorrhyncha species were identified, two of which are dangerous as disease vectors. This is the invasive species *Scaphoideus titanus* Ball, 1932 and *Hyalesthes obsoletus* Signoret, 1865, the control of which must be organized in the ampelocenoses of the republic. 2 more species detected on the Crimean Peninsula – *Arboridia kakogawana* (Matsumura, 1932) and *Metcalfa pruinosa* Say, 1830 – can be potential vectors of causative agents of grape diseases. It should be noted that invasive insects in the new conditions can take on the function of a vector, and therefore their study is an urgent task for plant protection specialists.

Ключевые слова. Виноградники, подотряд Цикадовые, инвазионные виды, аборигенные виды, переносчики инфекции.

ВВЕДЕНИЕ

Виноградарство имеет немаловажное значение в экономике южных регионов РФ и является существенной частью российского агропромышленного комплекса. Площадь виноградных плантаций в России (на фермах всех категорий) в 2018 г. составила 93,5 тыс. га (в том числе плодоносящих – 75,1 тыс. га), в 2017 г. – 91,5 тыс. га (74,8 тыс. га) (Раджабов и др., 2019).

Большой мировой рынок виноградарства – одна из причин интродукции фитопатогенов с помощью посадочного материала. Инфекционные заболевания виноградной лозы приводят к значительным потерям урожая, сокращению производства и снижению долговечности виноградных лоз.

Промышленное виноградарство все чаще сталкивается с проблемой распространения инвазионных инфекций, распространяемых насекомыми подотряда Цикадовые (Auchenorrhyncha). В настоящее время большинство трансмиссивных инфекций регулируются с помощью выведения устойчивых сортов и борьбы с переносчиками. В случае болезней, переносимых вредителями сельскохозяйственных культур, альтернативой инсектицидам выступает разработка методов комплексной борьбы с переносчиками инфекции. В связи с этим важно изучить видовой состав насекомых – потенциальных векторов инфекции.

Auchenorrhyncha – это богатый видами подотряд в пределах разнообразного отряда Hemiptera, включающий 2 крупных инфраотряда: Cicadomorpha и Fulgoromorpha. В мировой фауне насчитывается около 30 семейств и 43 тыс. видов. Фауна цикадовых России и сопредельных стран насчитывает около 2 тыс. видов, относящихся к 21 семейству (Бригадиренко, 2003; Гнездилов, 2000; Остапенко, 2010); фауна цикадовых Южного федерального округа – около 490 видов из 13 семейств (Масляков, Ижевский, 2011).

Взрослые особи цикадовых ведут открытый, подвижный образ жизни. Личинки ведут такой же образ жизни, как имаго, или подземный – на корнях растений; некоторые виды развиваются на растениях в комке специально выделяемой пены, свободно или внутри известковых трубчатых домиков. В году обычно 1 поколение, однако бывает как многолетняя генерация, так и много поколений в течение года (до 6–7). Зимует чаще всего яйцо, реже имаго или личинки старших возрастов (Гнездилов, 2000; Масляков, Ижевский, 2011; Лер, 1988).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор имаго Auchenorrhyncha проводили с июня по сентябрь на территории Республики Крым с использованием желтых клеевых ловушек (рис. 1), площадь которых – 20 x 10 см². Плотность

Key words. Vineyards, Auchenorrhyncha, invasive species, native species, vectors.

INTRODUCTION

Viticulture is of no small importance in the economy of the southern regions of the Russian Federation and is an essential part of the Russian agro-industrial complex. The area of vineyards in Russia (on farms of all categories) in 2018 amounted to 93.5 thousand hectares (including fruit-bearing – 75.1 thousand hectares), in 2017 – 91.5 thousand hectares (74.8 thousand ha) (Radjabov et al., 2019).

The large world viticulture market is one of the reasons for the introduction of phytopathogens through planting material. Infectious diseases of the vine lead to significant yield losses, reduced production and reduced longevity of the vines.

Industrial viticulture is increasingly faced with the problem of the spread of parasitic infections transmitted by Auchenorrhyncha. Currently, most vector-borne infections are controlled through breeding of resistant varieties and vector control. In the case of crop-borne diseases, the development of integrated vector control methods is an alternative to insecticides. In this regard, it is important to study the species composition of potential insect vectors of infection.

Auchenorrhyncha is a species-rich suborder within the diverse order Hemiptera, comprising 2 large infraorders: Cicadomorpha and Fulgoromorpha. There are about 30 families and 43 thousand species in the world fauna. The fauna of cicadas in Russia and neighboring countries includes about 2000 species belonging to 21 families (Brigadirenko, 2003; Gnezdilov, 2000; Ostapenko, 2010); fauna of cycads of the Southern Federal District – about 490 species from 13 families (Maslyakov, Izhevsky, 2011).



Рис. 1. Желтая клеевая ловушка с имаго цикадовых (фото Я.Э. Радионовской)

Fig. 1. Yellow sticky trap with adult Auchenorrhyncha (photo by Ya.E. Radionovskaya)

размещения ловушек на маршрутах для исследований и опытов – 1 желтая клеевая ловушка на 0,01–0,02 га виноградника. Взрослые особи цикадки белой были собраны методом кошения в парковой зоне п. г. т. Аграрное. Собранный материал хранили в засушенном виде в морозильнике при –25 °С.

Всего было собрано и проанализировано: в 2019 г. – 18 образцов (11 видов) (табл. 1); в 2020 г. – 6 образцов (табл. 2).

Таблица 1
Образцы цикадовых (сбор 2019 г.)

№	Семей- ство	Название	Дата сбора насекомых	Место сбора насекомых
1	Cicadel- lidae	<i>Aphrodes makarovi</i> Zachvatkin, 1948	июнь	Бахчисарай- ский р-н
2		цикадка японская виноградная <i>Arboridia kakogawana</i> (Matsumura)	август	г. Ялта
3		цикадка японская виноградная <i>Arboridia kakogawana</i> (Matsumura)	сентябрь	г. Балаклава
4		Cicadellidae sp.	август	г. Ялта
5		<i>Fieberiella florii</i> (Stål, 1864)	сентябрь	г. Балаклава
6		<i>Psammotettix confinis</i> (Dahlbom, 1850)	август	г. Ялта
7		цикадка северо- американская <i>Scaphoideus titanus</i> Ball	август	г. Балаклава
8		цикадка северо- американская <i>Scaphoideus titanus</i> Ball	сентябрь	г. Балаклава
9		<i>Synophropsis lauri</i> (Horváth, 1897)	август	г. Ялта
10	Cixiidae	<i>Hyalesthes</i> sp.	июнь	г. Ялта
11		<i>Hyalesthes</i> sp.	август	г. Ялта
12		Cixiidae spp.	август	г. Ялта
13		рептал черноволосистый <i>Reptalus melanochaetus</i> (Fieber, 1876)	июнь	Бахчисарай- ский р-н
14		рептал черноволосистый <i>Reptalus melanochaetus</i> (Fieb.)	август	г. Ялта
15	Issidae	агалматийум двухлопастный <i>Agalmatium bilobum</i> (Fieber, 1877)	июнь	г. Ялта
16		агалматийум двухло- пастный <i>Agalmatium</i> <i>bilobum</i> (Fieb.)	июнь	Бахчисарай- ский р-н
17		агалматийум двухло- пастный <i>Agalmatium</i> <i>bilobum</i> (Fieb.)	июнь	Судакский р-н
18		агалматийум двухло- пастный <i>Agalmatium</i> <i>bilobum</i> (Fieb.)	август	г. Ялта

Adult Auchenorrhyncha lead an open, mobile life-style. The larvae lead the same way of life as adults, or underground – on the roots of plants; some species develop on plants in a lump of specially released foam, freely or inside calcareous tubular houses. There is usually 1 generation per year, however, there is both a multi-year generation and many generations during the year (up to 6–7). The egg overwinters most often, less often adults or older larvae (Gnezdilov, 2000; Maslyakov and Izhevsky, 2011; Ler, 1988).

Table 1
Auchenorrhyncha samples (2019 collection)

№	Family	Name	Date of insect collection	Place of insect collection
1	Cicadel- lidae	<i>Aphrodes makarovi</i> Zachvatkin, 1948	June	Bakhchisarai district
2		<i>Arboridia kakogawana</i> (Matsumura)	August	Yalta
3		<i>Arboridia kakogawana</i> (Matsumura)	September	Balaklava
4		Cicadellidae sp.	August	Yalta
5		<i>Fieberiella florii</i> (Stål, 1864)	September	Balaklava
6		<i>Psammotettix confinis</i> (Dahlbom, 1850)	August	Yalta
7		<i>Scaphoideus titanus</i> Ball	August	Balaklava
8		<i>Scaphoideus titanus</i> Ball	September	Balaklava
9		<i>Synophropsis lauri</i> (Horváth, 1897)	August	Yalta
10	Cixiidae	<i>Hyalesthes</i> sp.	June	Yalta
11		<i>Hyalesthes</i> sp.	August	Yalta
12		Cixiidae spp.	August	Yalta
13		<i>Reptalus melanochaetus</i> (Fieber, 1876)	June	Bakhchisarai district
14		<i>Reptalus melanochaetus</i> (Fieb.)	August	Yalta
15	Issidae	<i>Agalmatium bilobum</i> (Fieber, 1877)	June	Yalta
16		<i>Agalmatium bilobum</i> (Fieb.)	June	Bakhchisarai district
17		<i>Agalmatium bilobum</i> (Fieb.)	June	Sudak district
18		<i>Agalmatium bilobum</i> (Fieb.)	August	Yalta

Таблица 2
Образцы цикадовых (сбор 2020 г.)

№ Семейство	Название	Дата сбора насекомых	Место сбора насекомых
1 Cicadellidae	зеленая вино-градная цикадка <i>Empoasca vitis</i> (Göthe, 1875)	июнь	г. Ялта
2	цикадка северо-американская <i>Scaphoideus titanus</i> Ball	сентябрь	г. Балаклава
3 Cixiidae	цикадка вьюн-ковая <i>Hyalesthes obsoletus</i> Sign.	июнь	г. Ялта
4 Flatidae	цикадка белая <i>Metcalfa pruinosa</i> (Say)	август	п. г. т. Аграрное
5 Issidae	агальматий <i>Agalmatium bilobum</i> (Fieb.)	июнь	г. Ялта
6 Tettigometridae	теттигометра ко-лючая <i>Tettigometra hexaspina</i> Kolenati, 1857	июль	Бахчи-сарай-ский р-н

Цикадка белая *M. pruinosa* на виноградниках полуострова не была выявлена, однако, учитывая достаточно быстрое распространение и питание на многочисленной растительности, ожидается ее выявление и на винограде.

Выделение нуклеиновых кислот из насекомых проводили с использованием набора «ДНК-Экстрат – 2» (ООО «Синтол», Россия), согласно инструкциям производителя. Для изучения генетических свойств насекомых использовали универсальную для насекомых праймерную систему LCO1490/HCO2198 (Folmer et al., 1994).

При получении единичных продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) образцы анализировали методом секвенирования. Проверку, выравнивание и редактирование последовательностей проводили с помощью программы-редактора BioEdit v. 7.0.5.3. Сравнительный анализ полученных последовательностей проводили с последовательностями базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно идентификации по морфологическим признакам цикадовых, собранных в 2019 г., были выявлены следующие виды: *Agalmatium bilobum* (Fieb.), *Reptalus melanochaetus* (Fieb.), *Scaphoideus titanus* Ball, *Synophropsis lauri* (Horv.), *Arboridia kakogawana* (Matsumura), *Hyalesthes* sp., *Aphrodes* sp., 4 образца неидентифицированных видов семейства Cicadellidae spp. и 1 образец семейства Cixiidae spp.

В 2020 г. с желтых клеевых ловушек был собран и исследован 51 образец имаго цикадовых, принадлежащих к 6 видам.

Молекулярно-генетический анализ по гену субъединицы цитохромоксидазы 1 (COI) насекомых подтвердил наличие девяти видов: *Empoasca vitis* (Göthe), *Arboridia kakogawana* (Matsumura), *Scaphoideus*

Table 2
Auchenorrhyncha samples (2020 collection)

№ Family	Name	Date of insect collection	Place of insect collection
1 Cicadellidae	<i>Empoasca vitis</i> (Göthe, 1875)	June	Yalta
2	<i>Scaphoideus titanus</i> Ball	September	Balaklava
3 Cixiidae	<i>Hyalesthes obsoletus</i> Sign.	June	Yalta
4 Flatidae	<i>Metcalfa pruinosa</i> (Say)	August	Agrarnoe
5 Issidae	<i>Agalmatium bilobum</i> (Fieb.)	June	Yalta
6 Tettigometridae	<i>Tettigometra hexaspina</i> Kolenati, 1857	June	Bakhchisarai district

MATERIALS AND METHODS

Auchenorrhyncha adults were collected from June to September on the territory of the Republic of Crimea using yellow sticky traps (Fig. 1), the area of which was 20 x 10 cm². The density of placement of traps on the routes for research and experiments is 1 yellow sticky trap per 0.01–0.02 ha of vineyard. Adult individuals of *Metcalfa pruinosa* were collected by mowing in the park area of the village of Agrarnoe. The collected material was stored dried in a freezer at –25 °C.

In total, the following were collected and analyzed: in 2019 – 18 samples (11 species) (Table 1); in 2020 – 6 samples (Table 2).

M. pruinosa was not detected in the vineyards of the peninsula, however, given the fairly rapid spread and feeding on numerous vegetation, it is expected to be detected in grapes.

Isolation of nucleic acids from insects was carried out using the DNA-Extran-2 kit (Syntol, Russia) according to the manufacturer's instructions. To study the genetic properties of insects, the LCO1490/HCO2198 primer system universal for insects was used (Folmer et al., 1994).

Upon receipt of single products of the polymerase chain reaction (PCR), the samples were analyzed by sequencing. The sequences were checked, aligned, and edited using the BioEdit v. 7.0.5.3. Comparative analysis of the obtained sequences was carried out with the NCBI database sequences (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

RESULTS AND DISCUSSION

According to the identification by morphological characters of the Auchenorrhyncha collected in 2019, the following species were identified: *Agalmatium bilobum* (Fieb.), *Reptalus melanochaetus* (Fieb.), *Scaphoideus titanus* Ball, *Synophropsis lauri* (Horv.), *Arboridia kakogawana* (Matsumura), *Hyalesthes* sp., *Aphrodes* sp., 4 samples of unidentified species of the family Cicadellidae spp. and 1 specimen of the family Cixiidae spp.

In 2020, 51 specimens of adult cycads belonging to 6 species were collected and studied from yellow sticky traps.

titanus Ball, *Synophropsis lauri* (Horv.), *Aphrodes makarovi* Zachvatkin, *Psammotettix confinis* (Dhlb.), *Fieberiella florii* (Stål), *Metcalfa pruinosa* (Say), *Agalmatium bilobum* (Fieb.) (табл. 3). Молекулярно-генетическим методом была подтверждена идентификация по морфологическим признакам цикадки белой *Metcalfa pruinosa* (Say).

Из проанализированных образцов, вероятно, наибольшую опасность представляют: *Scaphoideus titanus* Ball, поскольку является переносчиком возбудителя заболевания «золотистое пожелтение винограда», *Hyalesthes obsoletus* Sign. и *Reptalus melanochaetus* (Fieb.) – потенциальные векторы фитоплазмы *Candidatus Phytoplasma solani*, вызывающей заболевание «почернение древесины винограда», а также *Arboridia kakogawana* (Matsumura), которая сегодня стабильно и массово развивается на виноградниках полуострова.

Таблица 3
Результаты изучения видового состава подотряда Цикадовые в ампелоценозах Республики Крым

№ Семейство	Название	Примечание
ИНФРАОТРЯД CICADOMORPHA		
1 Cicadellidae	зеленая виноградная цикадка <i>Empoasca vitis</i> (Göthe)	подтвержден молекулярно-генетическим методом
2	цикадка японская виноградная <i>Arboridia kakogawana</i> (Matsumura)	подтвержден молекулярно-генетическим методом
3	цикадка североамериканская <i>Scaphoideus titanus</i> Ball	подтвержден молекулярно-генетическим методом
4	<i>Synophropsis lauri</i> (Horv.)	подтвержден молекулярно-генетическим методом
5	<i>Aphrodes makarovi</i> Zachvatkin	подтвержден молекулярно-генетическим методом
6	<i>Psammotettix confinis</i> (Dhlb.)	подтвержден молекулярно-генетическим методом
7	<i>Fieberiella florii</i> (Stål)	подтвержден молекулярно-генетическим методом
ИНФРАОТРЯД FULGOROMORPHA		
8 Cixiidae	цикадка вьюнковая <i>Hyalesthes obsoletus</i> Sign.	требуется дополнительные молекулярно-генетические исследования
9	рептал чернолопастный <i>Reptalus melanochaetus</i> (Fieb.)	требуется дополнительные молекулярно-генетические исследования
10 Issidae	агальматий двухлопастный <i>Agalmatium bilobum</i> (Fieb.)	подтвержден молекулярно-генетическим методом
11 Tettigometridae	теттигометра колючая <i>Tettigometra hexaspina</i> Kol.	требуется дополнительные молекулярно-генетические исследования

Molecular genetic analysis of the cytochrome oxidase 1 (COI) subunit gene of insects confirmed the presence of nine species: *Empoasca vitis* (Göthe), *Arboridia kakogawana* (Matsumura), *Scaphoideus titanus* Ball, *Synophropsis lauri* (Horv.), *Aphrodes makarovi* Zachvatkin, *Psammotettix confinis* (Dhlb.), *Fieberiella florii* (Stål), *Metcalfa pruinosa* (Say), *Agalmatium bilobum* (Fieb.) (Table 3). Identification of *Metcalfa pruinosa* (Say) by morphological characters was confirmed by the molecular genetic method.

Of the analyzed samples, probably the most dangerous are: *Scaphoideus titanus* Ball, as it is a vector of the agent of flavescence dorée, *Hyalesthes obsoletus* Sign. and *Reptalus melanochaetus* (Fieb.) – potential vectors of *Candidatus Phytoplasma solani*, agent of the black wood of grapevine, as well as *Arboridia kakogawana* (Matsumura), which today is steadily and massively developing in the vineyards of the peninsula.

Table 3
The results of the study of the species composition of the suborder Auchenorrhyncha in the ampelocenoses of the Republic of Crimea

№ Family	Name	Comment
INFRA ORDER CICADOMORPHA		
1 Cicadellidae	<i>Empoasca vitis</i> (Göthe)	confirmed by molecular genetic method
2	<i>Arboridia kakogawana</i> (Matsumura)	confirmed by molecular genetic method
3	<i>Scaphoideus titanus</i> Ball	confirmed by molecular genetic method
4	<i>Synophropsis lauri</i> (Horv.)	confirmed by molecular genetic method
5	<i>Aphrodes makarovi</i> Zachvatkin	confirmed by molecular genetic method
6	<i>Psammotettix confinis</i> (Dhlb.)	confirmed by molecular genetic method
7	<i>Fieberiella florii</i> (Stål)	confirmed by molecular genetic method
INFRA ORDER FULGOROMORPHA		
8 Cixiidae	<i>Hyalesthes obsoletus</i> Sign.	additional molecular genetic studies are required
9	<i>Reptalus melanochaetus</i> (Fieb.)	additional molecular genetic studies are required
10 Issidae	<i>Agalmatium bilobum</i> (Fieb.)	confirmed by molecular genetic method
11 Tettigometridae	<i>Tettigometra hexaspina</i> Kol.	additional molecular genetic studies are required



Рис. 2. Имаго *Scaphoideus titanus* на винограде, Респ. Крым (фото Я.Э. Радионовской)

Fig. 2. *Scaphoideus titanus* imago on grapes, Rep. Crimea (photo by Ya.E. Radionovskaya)

Ниже приведена краткая справка по некоторым выявленным видам.

Цикадка североамериканская (*Scaphoideus titanus* Ball) (рис. 2) – инвазионный вид, впервые был обнаружен на территории Республики Крым в 2012 г. (Радионовская, Диденко, 2015). Можно предполагать, что этот развивающийся только на винограде вид был завезен в Европу с посадочным материалом в стадии зимующих под корой саженцев яиц, и сейчас происходит процесс его распространения по виноградникам. Этот достаточно мобильный и агрессивный вектор является причиной эпидемий фитоплазмы золотистого пожелтения винограда (Grapevine flavescentia dorée phytoplasma) в Европе (Duduk et al., 2008).

Цикадка выюноквая (*Hyalesthes obsoletus* Signoret) (рис. 3) – потенциальный вектор фитоплазмоза «почернение древесины винограда» (Bois noir). Основными кормовыми растениями являются травянистые сорняки, реже – древесные породы, что может привести к созданию резервации заболевания в естественных биотопах (Johannesen et al., 2012). Потенциальным вектором Bois noir также предположительно может являться *Reptalus melanochaetus* Fieb., однако это требует дальнейших исследований.

Цикадка японская виноградная (*Arboridia kakogawana* (Matsumura)) (рис. 4) – инвазивный для полуострова вид. Первоначально интенсивное развитие данного вида на новых территориях отмечали на виноградных растениях приусадебных участков, а после достижения популяцией вредителя высокой численности наблюдали его расселение на близко расположенные к населенным пунктам промышленные виноградники (Радионовская, Диденко, 2015).

Цикадка белая (*Metcalfa pruinosa* Say) (рис. 5) является полифагом. Было отмечено питание на травянистой, кустарниковой и древесной растительности, всего более 200 видов (Орлов, 2012; Girolami et al., 1996). Плотные популяции нимф вызывают задержку роста побегов, в то время как взрослые особи производят большое количество медвяной росы, на которой развивается сажистая плесень. Впервые на территории нашей страны *M. pruinosa* была обнаружена в конце июля 2009 г. Тогда она была выявлена на стеблях подсолнечника на юге России в п. г. т. Лазаревское, куда, вероятно, была завезена через морские порты (Gnezdilov, Sugonyaev, 2009). На Черноморском побережье Республики Крым впервые была обнаружена, по данным



Рис. 3. Имаго *Hyalesthes obsoletus* на винограде, Респ. Крым (фото Я.Э. Радионовской)

Fig. 3. *Hyalesthes obsoletus* imago on grapes, Rep. Crimea (photo by Ya.E. Radionovskaya)

Below is a summary of some of the identified species.

***Scaphoideus titanus* Ball** (Fig. 2) – invasive species, was first detected on the territory of the Republic of Crimea in 2012 (Radionovskaya and Didenko, 2015). It can be assumed that this species, which develops only on grapes, was brought to Europe with planting material in the stage of eggs hibernating under the bark, and now it is spreading through vineyards. This rather mobile and aggressive vector is the cause of epidemics of grapevine flavescentia dorée phytoplasma in Europe (Duduk et al., 2008).

***Hyalesthes obsoletus* Signoret** (Fig. 3) – potential vector of Bois noir. The main host plants are herbaceous weeds, less often tree species, which can lead to the creation of a reservation of the disease in natural biotopes (Johannesen et al., 2012). A potential vector for Bois noir could also presumably be *Reptalus melanochaetus* Fieb., however, this requires further research.

***Arboridia kakogawana* (Matsumura)** (Fig. 4) – invasive species for the peninsula. Initially, the intensive development of this species in new territories was reported on vineyards of household plots, and after the pest population reached a high abundance, it was observed to spread to industrial vineyards close to settlements (Radionovskaya, Didenko, 2015).

***Metcalfa pruinosa* Say** (Fig. 5) is a polyphage. Feeding on herbaceous, shrubs, and tree vegetation was noted, more than 200 species in total (Orlov, 2012; Girolami et al., 1996). Dense populations of nymphs cause stunting of shoots while adults produce large amounts of honeydew on which sooty mold develops. *M. pruinosa* was first detected in Russia at the end of July 2009. At that time, it was reported on sunflower stems in the south of Russia in the village of Lazarevskoe, where it was probably brought through seaports (Gnezdilov and Sugonyaev, 2009). On the Black Sea coast of the Republic of Crimea, it was first detected, according to different authors, in 2010–2015, where, most likely, it got through the seaports from Turkey and Bulgaria, and possibly from the territory of Romania. It is known from literary sources that *M. pruinosa* is passively spread by land and sea transport, egg-laying is transported with infected plant material, sometimes deliberately imported by beekeepers in order to obtain honeydew (Baranets, 2016).



Рис. 4. Имаго *Arboridia kakogawana* на винограде, Респ. Крым (фото Я.Э. Радионовской)

Fig. 4. *Arboridia kakogawana* imago on grapes, Rep. Crimea (photo by Ya.E. Radionovskaya)

разных авторов, в 2010–2015 гг., куда, скорее всего, попала через морские порты из Турции и Болгарии, а возможно, с территории Румынии. Из литературных источников известно, что *M. pruinosa* пассивно распространяется наземным и морским транспортом, яйцекладки перевозятся с зараженным растительным материалом, иногда намеренно завозятся пчеловодами с целью получения медвяной росы (Баранец, 2016).

Видимых повреждений виноградной лозы такими видами цикадовых, как агалматий двухлопастный *Agalmatium bilobum* (Fieb.), зеленая виноградная цикадка *Empoasca vitis* (Göthe), теттигометра колючая *Tettigometra hexaspina* Kol., *Fieberiella florii* (Stål), установлено не было.

Присутствие на виноградных насаждениях цикадок *Synophropsis lauri* (Horv.), *Psammotettix confinis* (Dhlb.), *Aphrodes makarovi* Zachvatkin, вероятнее всего, является случайным, так как виноград не относится к их кормовым растениям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках проведенного исследования удалось установить ряд представителей цикадовых (Auchenorrhyncha): тех, которые могут быть потенциальными векторами возбудителей болезней винограда, и тех, которые уже являются достоверно отмеченными насекомыми – переносчиками инфекций (к последним относятся *Scaphoideus titanus* Ball и *Hyalesthes obsoletus* Sign.). Кроме того, насекомые, имеющие инвазивный характер, могут в новых климатических и географических условиях принять функцию вектора, в связи с чем их изучение является актуальной задачей для специалистов направления защиты растений.

Результаты сравнения полученных последовательностей с NCBI показали, что в этой базе отсутствуют данные о нуклеотидных последовательностях *Arboridia kakogawana* (Matsumura) и в нее загружена только одна последовательность гена субъединицы 1 цитохромоксидазы *Reptalus melanochaetus* (Fieb.), поэтому в дальнейшем наши исследования могут иметь научную значимость и новизну.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баранец Л., 2016. Сисні шкідники. – Садівництво по-українськи, 15 (3): 68–71.
2. Бригадиренко В. Основы систематики комаров: навч. посібник. – Д.: РВВ ДНУ, 2003, 204 с.
3. Гнездилов В.М. Цикадовые (Homoptera, Cicadina) Северо-Западного Кавказа; автореф. дис.



Рис. 5. Имаго *Metcalfa pruinosa* (фото Б.Б. Хамаевой)

Fig. 5. *Metcalfa pruinosa* imago (photo by B.B. Khamaeva)

No visible damage was found to the vine by such Auchenorrhyncha species as *Agalmatium bilobum* (Fieb.), *Empoasca vitis* (Göthe), *Tettigometra hexaspina* Kol., *Fieberiella florii* (Stål).

Presence in vineyards of *Synophropsis lauri* (Horv.), *Psammotettix confinis* (Dhlb.), *Aphrodes makarovi* Zachvatkin, is most likely accidental, as grapes are not their host plants.

CONCLUSION

As part of the study, it was possible to identify a number of representatives of cycads (Auchenorrhyncha): those that can be potential vectors of pathogens of grapes, and those that are already reliably reported insects – vectors of infections (the latter include *Scaphoideus titanus* Ball and *Hyalesthes obsoletus* Sign.). In addition, invasive insects can take on the function of a vector in new climatic and geographical conditions, and therefore their study is an urgent task for plant protection specialists.

The results of comparing the obtained sequences with NCBI showed that this database does not contain data on nucleotide sequences of *Arboridia kakogawana* (Matsumura) and only one cytochrome oxidase subunit 1 gene sequence of *Reptalus melanochaetus* (Fieb.) is loaded into it, therefore, our research may have scientific significance and novelty in the future.

REFERENCES

1. Baranets L. Sucking pests [Sysni shkidnyky]. *Gardening in Ukrainian*, 2016; 15 (3): 68–71 (in Ukrainian).
2. Brygadyrenko V. Basics of insect taxonomy: teaching. manual [Osnovy systematyky komakh: navch. posibnyk]. D.: RVV DNU, 2003, 204 p. (in Russian).
3. Gnezdylov V.M. Cycads (Homoptera, Cicadina) of the North-Western Caucasus; extended abstract of dissertation PhD in Biology: 03.00.09 / Vladimir Mykhailovych Gnezdylov. Spb., 2000, 9 p. (in Russian).
4. Ler P.A. (ed.). Key to insects of the Far East of the USSR. Homoptera and Hemiptera [Opredelitel nasekomykh Dalnego Vostoka SSSR. Ravnokrylyye i poluzhestkokrylyye]. Lipetsk: Nauka, 1988, Vol. 2, 972 p. (in Russian).

на получение ученой степени к. б. н: 03.00.09 / Гнездилов Владимир Михайлович. – СПб., 2000, 9 с.

4. Лер П.А. (ред.). Определитель насекомых Дальнего Востока СССР. Равнокрылые и полужесткокрылые. – Липецк: Наука, 1988, Т. 2, 972 с.

5. Масляков В., Ижевский С. Инвазии растительноядных насекомых в европейскую часть России. – М.: ИГРАН, 2011, 289 с.

6. Орлов В., 2012. Новые инвазивные виды на Западном Кавказе. – Защита и карантин растений, № 3: 39.

7. Остапенко К.А. Экология и география цикадовых (Homoptera, Cicadina) юга Приморского края; автореф. дис. на получение ученой степени к. б. н: 03.02.08 / Остапенко Кирилл Анатольевич. – Владивосток, 2010, 23 с.

8. Радионовская Я., Диденко Л. Методические рекомендации по фитосанитарному мониторингу комплекса цикадовых на виноградных насаждениях Крыма. – Ялта: ВНИИВиВ «Магарач», 2015, 24 с.

9. Раджабов А., Мишулов Н., Щеголихина Т. Состояние и перспективы развития виноградарства, включая питомниководство: науч. аналит. обзор. – М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2019, 92 с.

10. Duduk B., Ivanović M., Paltrinieri S., Bertaccini A., 2008. Phytoplasmas infecting fruit trees in Serbia. – Acta Horticulturae, № 781: 351–358.

11. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. – Molecular Marine Biology and Biotechnology, 3 (5): 294–299.

12. Girolami V., Conte L., Camporese P., Benuzzi M., Martir G.R., Dradi D., 1996. Possibilita di controllo biologico della *Metcalfa pruinosa*. – Informatore Agrario, № 55: 61–65.

13. Gnezdilov V., Sugonyaev E., 2009. First record of *Metcalfa pruinosa* (Homoptera: Fulgoroidea: Flatidae) from Russia. – Zoosystematica Rossica, 18 (2): 260–261.

14. Johannesen J., Foissac X., Kehrli P., Maixner M., 2012. Impact of vector dispersal and host-plant fidelity on the dissemination of an emerging plant pathogen. – PLoS ONE, 7 (12): 7.

15. NCBI. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата обращения: 25.05.2022).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Хамаева Баирта Борисовна, заведующая лабораторией энтомологии ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; ORCID 0000-0003-2923-5762, e-mail: airta@mail.ru.

Бондаренко Галина Николаевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник – начальник ИЛЦ ФГБУ «ВНИИКР», р. п. Быково, г. Раменское, Московская обл., Россия; старший преподаватель Аграрно-технологического института ФGAOU VO «РУДН», г. Москва, Россия; ORCID 0000-0002-1635-2508, e-mail: reseachergm@mail.ru.

Радионовская Яна Эдуардовна, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории защиты растений ФГБНУ «ВНИИВиВ «Магарач» РАН», г. Ялта, Республика Крым, Россия; ORCID 0000-0002-9124-8436, e-mail: vovkayalta@mail.ru.

5. Maslyakov V., Izhevsky S. Invasions of herbivorous insects in the European part of Russia [Invazii rastitel'noyadnykh nasekomykh v yevropeyskuyu chast' Rossii]. M.: IGRAN, 2011, 289 p. (in Russian).

6. Orlov V. New invasive species in the Western Caucas [Novyye invazivnyye vidy na Zapadnom Kavkaze]. Plant Protection and Quarantine, 2012; 3: 39 (in Russian).

7. Ostapenko K.A. Ecology and geography of cicadas (Homoptera, Cicadina) of the south of Primorsky Krai; extended abstract of dissertation PhD in Biology: 03.02.08 / Ostapenko Kirill Anatolyevich. Vladivostok: 2010. 23 p. (in Russian).

8. Radionovskaya Ya., Didenko L. Guidelines for phytosanitary monitoring of the cicada complex on vine plantations of the Crimea [Metodicheskiye rekomendatsii po fitosanitarnomu monitoringu kompleksa tsikadovykh na vinogradnykh nasazhdeniyakh Kryma]. Yalta: VNNIIViV "Magarach", 2015, 24 p. (in Russian).

9. Radjabov A., Mishurov N., Shchegolihina T. Status and prospects for the development of viticulture, including nursery: scientific analytical review [Sostoyaniye i perspektivy razvitiya vinogradarstva, vkluyuchaya pitomnikovodstvo: nauch. analit. Obzor]. M.: FGBNU "Rosinformagrotech", 2019, 92 p. (in Russian).

10. Duduk B., Ivanović M., Paltrinieri S., Bertaccini A. Phytoplasmas infecting fruit trees in Serbia. Acta Horticulturae, 2008; No. 781: 351–358.

11. Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994; 3 (5): 294–299.

12. Girolami V., Conte L., Camporese P., Benuzzi M., Martir G.R., Dradi D. Possibilita di controllo biologico della *Metcalfa pruinosa*. Informatore Agrario, 1996; No. 55: 61–65.

13. Gnezdilov V., Sugonyaev E. First record of *Metcalfa pruinosa* (Homoptera: Fulgoroidea: Flatidae) from Russia. Zoosystematica Rossica, 2009; 18 (2): 260–261.

14. Johannesen J., Foissac X., Kehrli P., Maixner M. Impact of vector dispersal and host-plant fidelity on the dissemination of an emerging plant pathogen. PLoS ONE, 2012; 7 (12): 7.

15. NCBI. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (last accessed: 25.05.2022).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Bairta Khamaeva, Head of Entomology Laboratory of Testing Laboratory Center, FGBU "VNIICR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; ORCID 0000-0003-2923-5762, e-mail: airta@mail.ru.

Galina Bondarenko, PhD in Biology, Senior Researcher, Head of Testing Laboratory Center, FGBU "VNIICR", Bykovo, Ramenskoye, Moscow Oblast, Russia; Senior Lecturer of the Agrarian and Technological Institute of FGAOU VO "RUDN University", Moscow, Russia; ORCID 0000-0002-1635-2508, e-mail: reseachergm@mail.ru.

Yana Radionovskaya, PhD in Agriculture, Leading Researcher, Plant Protection Laboratory, FGBUN "VNNIIViV "Magarach" RAS", Yalta, Republic of Crimea, Russia; ORCID 0000-0002-9124-8436, e-mail: vovkayalta@mail.ru.

Основные грибные болезни роз в Абхазии и защитные мероприятия

М.Ш. ШИНКУБА¹, Х.К. ВАРДАНИЯ²

Государственная инспекция Республики Абхазия по карантину растений, г. Сухум, Абхазия

¹ ORCID 0000-0001-8488-1607,
e-mail: sinkubamaja@gmail.com

² ORCID 0000-0001-5873-6246,
e-mail: alaudifem@gmail.com

АННОТАЦИЯ

Род *Rosa* объединяет более 250 дикорастущих видов и разновидностей и множество культурных сортов и гибридов, сгруппированных в несколько классов. Родиной розы считается Персия (современный Иран).

Роза является представителем рода *Rosa* (Шиповник). Это один из самых популярных листопадных и вечнозеленых кустарников, используемых для декоративных целей повсеместно: в городском озеленении, парках, садах, на частных приусадебных участках. Розы обладают полезными свойствами благодаря высокой концентрации эфирных масел, что обуславливает использование данного растения в парфюмерии, косметологии, медицине и даже пищевой промышленности. В настоящее время розы культивируют практически во всех странах мира. На территории Абхазии выращивают около 10 различных видов роз. Влажный климат региона способствует развитию инфекционных болезней, в первую очередь грибных, в связи с чем розы достаточно часто поражаются различными микозами. Важным условием для успешного культивирования роз является раннее выявление фитопатогенов и своевременная борьба с ними. В статье кратко представлена обзорная информация по биологическим особенностям фитопатогенов, данные по распространению и вредоносности основных грибных заболеваний роз в Абхазии. Черная пятнистость, ржавчина, мучнистая роса – самые опасные и наиболее распространенные инфекционные заболевания роз в этом регионе. В статье подчеркнута необходимость проведения обработок фунгицидами в защите кустов роз в отношении рассматриваемых болезней и эффективность обрезки, сбора и уничтожения пораженных растительных остатков.

Ключевые слова. Роза, грибные болезни, распространение, вредоносность, фунгициды, эффективность.

The main fungal diseases of roses in Abkhazia and protective measures

M.SH. SHINKUBA¹, H.K. VARDANIYA²

State Inspectorate of the Republic of Abkhazia for Plant Protection, Sukhum, Abkhazia

¹ ORCID 0000-0001-8488-1607,
e-mail: sinkubamaja@gmail.com

² ORCID 0000-0001-5873-6246,
e-mail: alaudifem@gmail.com

ABSTRACT

The genus *Rosa* includes more than 250 wild species and varieties and many cultivars and hybrids grouped into several classes. Persia (modern Iran) is considered the birthplace of the rose.

Rose is a member of the genus *Rosa* (Rosehip). This is one of the most popular deciduous and evergreen shrubs used for decorative purposes everywhere: in urban landscaping, in parks, gardens, in private gardens. Roses have beneficial properties due to the high concentration of essential oils, which leads to the use of this plant in perfumery, cosmetology, medicine and even the food industry. Currently, roses are cultivated in almost all countries of the world. About 10 different rose species are grown in Abkhazia. The humid climate of the region contributes to the development of infectious diseases, primarily fungal ones, and therefore roses are quite often affected by various mycoses. An important condition for the successful cultivation of roses is the early detection of phytopathogens and timely control of them. The article briefly provides an overview of the biological characteristics of phytopathogens, data on the distribution and severity of the main fungal diseases of roses in Abkhazia. Black spot, rust, powdery mildew are the most dangerous and most common infectious diseases of roses in this region. The article emphasizes the need for fungicide treatments in protecting rose bushes against the diseases in question and the effectiveness of pruning, collecting and destroying affected plant residues.

Key words. Rose, fungal diseases, spreading, harmfulness, fungicides, efficiency.

ВВЕДЕНИЕ

Роза (*Rosa*) – род листопадных и вечнозеленых кустарников семейства розовых, эфиромасличное и декоративное растение. Эфиромасличные розы возделывали более 2 тыс. лет назад в странах Востока (центр возделывания культуры – Иран), откуда они в начале XX века были завезены в Европу. В России первые попытки их разведения относятся к 1811 г., промышленные плантации появились в бывшем СССР в начале 30-х гг.

Садовые и парковые розы с цветками разнообразной окраски широко используют в озеленении.

Климат Абхазии обусловлен ее прибрежным положением и наличием высокогорных хребтов. На побережье климат влажный субтропический. Количество осадков составляет 1300–2400 мм в год. Среднегодовая температура составляет +15 °С. Продолжительность безморозного периода на побережье – 250–300 дней. Температура в регионе и его влажный климат способствуют развитию инфекционных болезней, в первую очередь грибных.

ОБЗОРНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

На территории Абхазии культивируется около десятка видов и сортов роз.

Самое опасное и распространенное заболевание роз, впервые отмеченное на Черноморском побережье Кавказа еще Н.Н. Воронихиным в 1912 г. (Воронихин, 1914), – черная пятнистость.

В условиях Абхазии к числу наиболее распространенных грибных болезней роз относятся черная пятнистость, ржавчина и мучнистая роса.

Черная пятнистость, или марсонина роз (возбудитель – *Diplocarpon rosae* F.A. Wolf, анаморфа – *Marssonina rosae* (Lib.) Died.)

Гриб поражает все известные группы роз, но особенно сильно чайно-гибридные. Симптомы

INTRODUCTION

Rose (*Rosa*) – genus of deciduous and evergreen shrubs of the rose family, essential oil and ornamental plant. Essential oil roses were cultivated more than 2 thousand years ago in the countries of the East (the center of cultivation is Iran), from where they were brought to Europe at the beginning of the 20th century. In Russia, the first attempts to breed them date back to 1811; industrial plantations appeared in the former USSR in the early 1930s.

Garden and park roses with flowers of various colors are widely used in landscaping.

The climate of Abkhazia is determined by its coastal position and the presence of high mountain ranges. On the coast, the climate is humid subtropical. The amount of precipitation is 1300–2400 mm per year. The average annual temperature is +15 °C. The duration of the frost-free period on the coast is 250–300 days. The temperature in the region and its humid climate contribute to the development of infectious diseases, primarily fungal.

OVERVIEW

About a dozen species and varieties of roses are cultivated on the territory of Abkhazia.

The most dangerous and widespread disease of roses, first noted on the Black Sea coast of the Caucasus by N.N. Voronikhin in 1912 (Voronikhin, 1914) is black spot.

In the conditions of Abkhazia, the most common fungal diseases of roses include black spot, rust and powdery mildew.

Black spot of roses

(agent – *Diplocarpon rosae* F.A. Wolf, anamorph – *Marssonina rosae* (Lib.) Died.)

The fungus infects all known groups of roses, but especially tea-hybrid ones. Symptoms of the disease appear on the leaves in the form of black spots

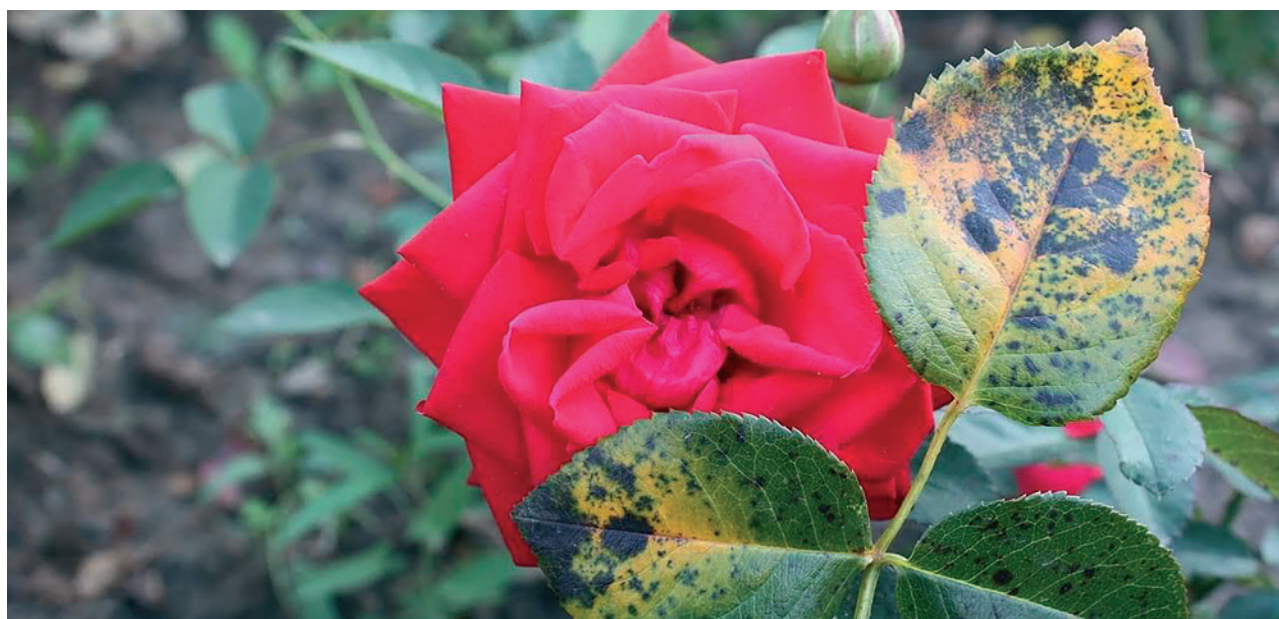


Рис. 1. Черная пятнистость на листьях роз (фото М.Ш. Шинкубы, Х.К. Вардании)

Fig. 1. Black spot on rose leaves (photo by M.Sh. Shinkuba, H.K. Vardaniya)

болезни проявляются на листьях в виде черных пятен округлой формы. На пятнах развивается конидиальное спороношение гриба. Конидии бесцветные, продолговатые, слегка булабовидные, иногда неправильной формы, большей частью перешнурованные, размером 16–25 x 5–7 мкм. Пораженные листья, как правило, опадают, в связи с чем растения теряют способность к нормальному развитию.

Возбудитель болезни способен развиваться при широком температурном диапазоне. В условиях влажных субтропиков Абхазии температуры, благоприятно влияющие на рост и развитие гриба, наблюдаются практически в течение всего вегетационного периода, а капельно-жидкой влаги в виде осадков ночных или утренних рос бывает почти всегда достаточно для заражения. Первые пятна на листьях появляются в первой декаде июня. Зимует гриб на опавших листьях в виде округлых плодовых тел (сумчатая стадия) с многочисленными бесцветными сумками.

Черная пятнистость – широко распространенное и весьма вредоносное заболевание. Особенно сильно болезнь развивается в условиях повышенной влажности. Пораженное растение теряет декоративность из-за черных пятен на листьях (рис. 1).

Заболевание приводит к ослаблению растений, которые плохо зимуют и на следующий год слабо цветут (Миско, 1981).

Ржавчина роз (возбудитель – *Phragmidium mucronatum* (Pers.) Schltdl.)

Первым признаком заболевания является появление на верхней стороне листовой пластинки отдельных желто-оранжевых бугорков (рис. 2).

На побегах и листьях роз весной образуются округлые или продолговатые порошистые оранжевые подушечки – эцидиальное спороношение ржавчинного гриба. Позднее, в конце июня – начале июля, развиваются уредо- и телейтоспоры. В стадии уредоспор образуются мелкие оранжевые

of a rounded shape. Conidial sporulation of the fungus develops on the spots. Conidia are colorless, oblong, slightly club-shaped, sometimes irregularly shaped, mostly ligated, 16–25 x 5–7 µm in size. Affected leaves, as a rule, fall off, and therefore the plants lose the ability to develop normally.

The causative agent of the disease is able to develop in a wide temperature range. In the conditions of the humid subtropics of Abkhazia, temperatures that favorably affect the growth and development of the fungus are observed almost throughout the growing season, and drop-liquid moisture in the form of precipitation at night or morning dew is almost always sufficient for infection. The first spots on the leaves appear in the first decade of June. The fungus overwinters on fallen leaves in the form of rounded fruiting bodies (marsupial stage) with numerous colorless bags.

Black spot is a widespread and very harmful disease. It develops especially strongly in conditions of high humidity. The affected plant loses its decorative effect due to black spots on the leaves (Fig. 1).

The disease leads to the weakening of plants that winter poorly and bloom poorly the next year (Misko, 1981).

Rust of rose (agent – *Phragmidium mucronatum* (Pers.) Schltdl.)

The first sign of the disease is the appearance of individual yellow-orange tubercles on the upper side of the leaf blade (Fig. 2).

On the shoots and leaves of roses in the spring, rounded or oblong powdery orange pads are formed – aecidial sporulation of a rust fungus. Later, in late June – early July, uredo- and teliospores develop. In the uredospore stage, small orange clusters are formed, called uredinia; in the teliospore stage, black pads form on the underside of the leaf – telia.

On plants affected by rust, rose leaves turn yellow, curl, the disease leads to premature drying and leaf fall.

According to our observations, from year to year, in the conditions of the humid subtropics of Abkhazia, rust does not appear on all growing species and varieties of roses.

Powdery mildew of rose (agent – *Podosphaera pannosa* (Wallr.) de Bary, anamorph – *Oidium leucoconium* Desm.)

The fungus infects leaves, shoots, sepals, buds and flowers. Symptoms of the development of powdery mildew are characterized by the formation of cobweb plaque. The plaque is whitish at the beginning, and later brownish-gray, representing mycelium and conidial sporulation.



Рис. 2. Телии и урединии ржавчины на листьях роз (фото М.Ш. Шинкубы, Х.К. Врдании)

Fig. 2. Telia and uredinia rust on rose leaves (photo by M.Sh. Shinkuba, H.K. Vardaniya)

скопления, называемые урединиями; в стадии телейтоспор формируются черные подушечки с нижней стороны листа – телии.

На пораженных ржавчиной растениях листья роз желтеют, скручиваются, заболевание приводит к преждевременному усыханию и опадению листьев.

По данным наших наблюдений, из года в год в условиях влажных субтропиков Абхазии ржавчина проявляется не на всех произрастающих видах и сортах роз.

Мучнистая роса роз (возбудитель – *Podosphaera pannosa* (Wallr.) de Bary, анаморфа – *Oidium leucosonium* Desm.)

Гриб поражает листья, побеги, чашелистики, бутоны и цветки. Симптомы развития мучнистой росы характеризуются образованием паутинистого налета. Налет в начале беловатый, а в дальнейшем буровато-серый, представляющий собой мицелий и конидиальное спороношение. Болезнь с мая по сентябрь распространяется конидиоспорами, особенно сильно поражаются молодые побеги и листочки (рис. 3).

Большая или меньшая «мучнистость» налета связана с условиями образования конидиальных спор, что в значительной степени зависит от особенностей сорта розы и климатических факторов (Синадский, 1990).

Широкому распространению заболевания в основном способствует теплая и влажная погода. При сильном развитии заболевания побеги перестают расти и постепенно отмирают, в результате листья скручиваются и преждевременно опадают, цветки деформируются.

Эффективными способами защиты роз от черной пятнистости, ржавчины, мучнистой росы являются обрезка пораженных стеблей, сбор и уничтожение пораженных листьев; перекопка почвы осенью или весной до набухания почек с использованием фосфорно-калийных удобрений; обработка растений фунгицидами.

Рекомендуется обработка зараженных растений роз от черной пятнистости препаратами «Строби», «Топаз», «Поликарбацин», «Фундазол». Неоднократно было показано, что при опрыскивании через каждые две недели поражаемость растений черной пятнистостью снижается. Немаловажно осенью перед окучиванием проводить опрыскивание роз 3%-м раствором медного или железного купороса.

Также была показана высокая эффективность применения фунгицида «Абига-пик» против черной пятнистости розы в условиях влажных субтропиков России. При 3-кратной обработке этим препаратом в концентрации 0,4% биологическая эффективность составляет 78,5–39,1% (Карпун, Салов, 2013).



Рис. 3. Мучнистая роса розы
(фото М.Ш. Шинкубы, Х.К. Вардани)

Fig. 3. Powdery mildew of rose
(photo by M.Sh. Shinkuba, H.K. Vardaniya)

The disease is spread by conidiospores from May to September, young shoots and leaves are especially affected (Fig. 3).

A greater or lesser “powdery” plaque is associated with the conditions for the formation of conidial spores, which largely depends on the characteristics of the rose variety and climatic factors (Sinadsky, 1990).

Warm and humid weather favors the widespread spread of the disease. With a strong development of the disease, the shoots stop growing and gradually die off, as a result, the leaves curl and fall prematurely, the flowers are deformed.

Effective ways to protect roses from black spot, rust, powdery mildew are pruning the affected stems, collecting and destroying the affected leaves; digging the soil in autumn or spring before the buds swell using phosphorus-potassium fertilizers; treating plants with fungicides.

It is recommended that infected rose plants be treated for black spotting with Strobi, Topaz, Polycarbacin, Fundazol preparations. It has been repeatedly shown that when spraying every two weeks, the susceptibility of plants to black spot is reduced. It is important in the fall before hilling to spray roses with a 3% solution of copper or iron sulphate.

Also, the high efficiency of the use of the Abiga-peak fungicide against the black spot of the rose in the conditions of the humid subtropics of Russia was shown. With a triple treatment with this drug at a concentration of 0.4%, the biological efficiency is 78.5–39.1% (Karpun, Salov, 2013).

According to the results of our observations, the most effective treatments for affected rose bushes are

По результатам наших наблюдений, в борьбе с мучнистой росой и ржавчиной наиболее эффективны обработки пораженных кустов роз 1%-й бордоской смесью, «Строби», «Топазом».

Таким образом, обработка роз фунгицидами снижает степень развития и распространения болезней – черной пятнистости, ржавчины и мучнистой росы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Влажный субтропический климат Республики Абхазии способствует развитию и распространению грибных болезней на розах. Ежегодно вредоносность данных заболеваний способна проявляться в значительной степени. Для успешного культивирования роз решающее значение имеет соблюдение основ агротехники, раннее выявление возбудителей болезней, своевременное применение эффективных средств защиты растений, в частности фунгицидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воронихин Н. Материалы к микологической флоре Сочинского округа. – СПб.: тип. С.Л. Кинда, 1914, 74 с. [Главное управление землеустройства и земледелия. Департамент земледелия. Труды Сочинской садовой и сельскохозяйственной опытной станции, вып. 1].
2. Карпун Н., Салов С., 2013. Эффективность абига-пик против черной пятнистости розы. – Защита и карантин растений, № 4: 37–38.
3. Миско Л. Рекомендации по защите роз от болезней. – М.: Наука, 1981, 40 с.
4. Синадский Ю. Болезни и вредители растений-интродуцентов. – М.: Наука, 1990, 259 с.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Шинкуба Майя Швараховна, кандидат биологических наук, заведующая карантинной фитосанитарной лабораторией Государственной инспекции Республики Абхазия по карантину растений; доцент Абхазского государственного университета; старший научный сотрудник ГНУ «Институт сельского хозяйства Академии наук Абхазии»; заведующая отделом защиты растений Института ботаники Академии наук Абхазии, г. Сухум, Республика Абхазия; ORCID 0000-0001-8488-1607, e-mail: sinkubamaja@gmail.com.

Вардания Хава Кемаловна, агроном-фитопатолог карантинной фитосанитарной лаборатории Государственной инспекции Республики Абхазия по карантину растений; младший научный сотрудник ГНУ «Институт сельского хозяйства Академии наук Абхазии»; младший научный сотрудник отдела защиты растений Института ботаники Академии наук Абхазии, г. Сухум, Республика Абхазия; ORCID 0000-0001-5873-6246, e-mail: alaudifem@gmail.com.

1% Bordeaux mixture, Strobe, Topaz to control powdery mildew and rust.

Thus, the treatment of roses with fungicides reduces the degree of development and spread of diseases – black spot, rust and powdery mildew.

CONCLUSION

The humid subtropical climate of the Republic of Abkhazia contributes to the development and spread of fungal diseases on roses. Every year, the harmfulness of these diseases can manifest itself to a large extent. For the successful cultivation of roses, the observance of the basics of agricultural technology, the early detection of pathogens, the timely use of effective plant protection products, in particular fungicides, are of paramount importance.

REFERENCES

1. Voronikhin N. Materials for the mycological flora of the Sochi region. St. Petersburg: type. S.L. Kinda, 1914, 74 p. [Main Department of Land Management and Agriculture. Department of agriculture. Proceedings of the Sochi Garden and Agricultural Experimental Station, № 1] (in Russian).
2. Karpun N., Salov S. Efficiency of Abiga-Peak against rose black spot [Effektivnost abiga-pik protiv chernoy pyatnistosti rozy]. *Plant protection and quarantine*. 2013; 4: 37–38 (in Russian).
3. Misko L. Recommendations for the protection of roses from diseases [Rekomendatsii po zashchite roz ot bolezney]. M.: Nauka, 1981, 40 p. (in Russian).
4. Sinadsky Yu. Diseases and pests of introduced plants [Bolezni i vrediteli rasteniy-introdutsentov]. M.: Nauka, 1990, 259 p. (in Russian).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Maya Shinkuba, PhD in Biology, Head of the Quarantine Phytosanitary Laboratory of the State Inspectorate of the Republic of Abkhazia for Plant Protection; Associate Professor of the Abkhaz State University; senior researcher of the State Scientific Institution “Institute of Agriculture of the Academy of Sciences of Abkhazia”; Head of the Department of Plant Protection, Institute of Botany, Academy of Sciences of Abkhazia, Sukhum, Republic of Abkhazia; ORCID 0000-0001-8488-1607, e-mail: sinkubamaja@gmail.com.

Hava Vardaniya, Agronomist-phytopathologist of the quarantine phytosanitary laboratory of the State Inspectorate of the Republic of Abkhazia for Plant Quarantine; Junior Researcher of the State Scientific Institution “Institute of Agriculture of the Academy of Sciences of Abkhazia”; Junior Researcher, Department of Plant Protection, Institute of Botany, Academy of Sciences of Abkhazia, Sukhum, Republic of Abkhazia; ORCID 0000-0001-5873-6246, e-mail: alaudifem@gmail.com.

Методика ламинирования гербария: наш опыт изготовления демонстрационных гербариев карантинных сорных растений

Н.В. ЦИНКЕВИЧ

Южный филиал ФГБУ «Всероссийский центр
карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»),
г. Симферополь, Республика Крым, Россия
ORCID 0000-0003-3774-3548, e-mail: duna8888@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Представлены материалы и методы, которые применяются нами на протяжении шести лет (с 2017 г.) для заготовки и монтирования гербарных материалов карантинных сорных растений. Сбор и заготовка материалов карантинных растений родов *Cenchrus*, *Bidens*, *Solanum*, *Ambrosia* и *Ipomoea* осуществлялись в карантинном интродукционном участке Южного филиала ФГБУ «ВНИИКР»; виды рода *Cuscuta* заготавливались в полевых условиях. Описаны преимущества применения гофрокартона в процессе сушки растений, позволяющие увеличить объемы заготавливаемых в филиале гербарных материалов с привлечением меньшего количества специалистов. Благодаря внедрению гофрокартона необходимость периодического перекалывания растений бумажными «рубашками» отпала, за исключением растений рода *Ipomoea*, у которых нежные и сочные стебли и листья в процессе прессовки и сушки травмировались, отвод влаги был недостаточный. Рассмотрены гербарные коллекции с точки зрения биобезопасности и предпринята попытка снижения вероятности возможных просыпей жизнеспособных семян и плодов из коллекционного материала, а именно – изложена методика монтирования гербарных образцов карантинных сорных растений посредством ламинирования. Описаны положительные аспекты предложенного метода: увеличение длительности хранения; возможность монтирования гербарных образцов на прозрачной основе, что позволяет лучше изучить растение; защита гербарных материалов от насекомых; исключение вероятности обламывания частей растений и осыпания семян из коллекции и т. д. Освещены возможные варианты использования заламинированных гербарных материалов в образовательных и демонстрационных целях, в том числе инспекторами Россельхознадзора при выполнении обследований подкарантинных объектов на наличие карантинных растений.

Herbarium lamination technique: our experience in manufacturing demonstration herbariums of quarantine weeds

N.V. TSINKEVICH

Southern Branch of FGBU "All-Russian Plant
Quarantine Center" (FGBU "VNIICR"),
Simferopol, Republic of Crimea, Russia
ORCID 0000-0003-3774-3548, e-mail: duna8888@mail.ru

ABSTRACT

The materials and methods that have been used for six years (since 2017) for the preparation and installation of herbarium materials of quarantine weeds are presented. The collection and preparation of quarantine weed materials of the genera *Cenchrus*, *Bidens*, *Solanum*, *Ambrosia* and *Ipomoea* were carried out in the quarantine introduction site of the Southern Branch of FGBU "VNIICR"; the species of the genus *Cuscuta* were prepared in field conditions. The advantages of using corrugated cardboard in the process of drying plants are described, which makes it possible to increase the volume of harvested herbarium materials in the branch with the involvement of a smaller number of specialists. Thanks to the introduction of corrugated cardboard, the need for periodically shifting plants with paper "shirts" has disappeared, with the exception of the genus *Ipomoea* plants, in which tender and juicy stems and leaves were injured during pressing and drying, moisture removal was insufficient. Herbarium collections are considered from the point of view of biosafety and an attempt is made to reduce the possible spillage of viable seeds and fruits from the collection material, namely, a method for mounting herbarium specimens of quarantine weeds by lamination is outlined. The positive aspects of the proposed method are described: an increase in the storage duration; the possibility of mounting herbarium samples on a transparent basis, which allows to better study the plant; protection of herbarium materials from insects; exclusion of the possible breaking off parts of plants and shedding of seeds from the collection, etc. Possible options for using laminated herbarium materials for educational and demonstration purposes, including by Rosselkhozнадзор inspectors when performing inspections of regulated objects for the presence of quarantine plants, are highlighted.

Ключевые слова. Дегидратация растений, гофрокартон, карантинные виды, биобезопасность, монтирование, гербарное дело.

ВВЕДЕНИЕ



Сбор растений для изготовления гербария является обязательным условием проведения ботанических исследований. Гербарий (лат. *herbarium*, от *herba* – трава) – это коллекция засушенных растений, изготовленных в соответствии с определенными правилами. Также этим термином обозначают научные учреждения или отделы, где хранятся гербарные образцы засушенных растений, предназначенные для научных исследований по систематике, флористике, карантину растений, генетике и селекции, растениеводству, географии растений (Павлова, Сурков, 2008; Дмитриев, Ластухин, 2020).

Правила заготовки растений и последующая работа с ними для изготовления гербария были изобретены в XVI веке профессором Пизанского университета Лукой Гини. Карл Линней определил технологию сбора: он писал, что собираемые растения не должны быть влажными; процесс сушки должен проходить между листами сухой бумаги, все органы растения должны быть в сохранности, расправлены, аккуратно уложены и должны хорошо просматриваться (Демина и др., 2015; Павлова, Сурков, 2008).

На протяжении нескольких столетий технология изготовления гербария оставалась фактически неизменной.

С начала XX века для сушки растений А.А. Хорошков предложил использовать ватные матрасики, изготавливаемые из папиросной бумаги и тонкого слоя ваты (Алехин, Сырейщиков, 1926). Этот способ стал широко использоваться русскими ботаниками.

В конце XX века в качестве одного из элементов усовершенствованного способа сушки растений (Скворцов, 1977; Willing, 2010) в США и Канаде начал применяться гофрокартон. По своей сути это более современная замена ватным матрасикам, ставшим классическими.

В наше время благодаря изобретению новых материалов химической промышленностью, а также совершенствованию теоретической и технической базы все чаще появляются новые технологии. Возможно их применение в гербарном деле, например:

- Скотч-гербарии, принцип которых заключается в использовании клейкой ленты из полимерных материалов для крепления гербарных материалов к листу. Авторы относят такие гербарии к прикладным и временным гербариям, используемым для прикладных исследований и учебных целей (Дмитриев, Ластухин, 2020).

- Гербарий в полипропиленовых файлах: практикуется хранение гербарных образцов на листах плотной бумаги, вставленных в стандартные

Key words. Plant dehydration, corrugated board, quarantine species, biosafety, mounting, herbarium.

INTRODUCTION

The collection of plants for an herbarium is a prerequisite for conducting botanical research. Herbarium (lat. *herbarium*, from *herba* – herb) is a collection of dried plants made according to certain rules. Also, this term refers to scientific institutions or departments where herbarium specimens of dried plants are stored, intended for scientific research on taxonomy, floristry, plant quarantine, genetics and breeding, crop production, plant geography (Pavlova, Surkov, 2008; Dimitriev, Lastukhin, 2020).

The rules for preparing plants and subsequent work with them for the herbarium were invented in the 16th century by Luca Ghini, a professor at the University of Pisa. Carl Linnaeus defined the collection technology: he wrote that the plants to be harvested should not be wet; the drying process should take place between sheets of dry paper, all organs of the plant should be intact, straightened, neatly stacked and clearly visible (Demina et al., 2015; Pavlova, Surkov, 2008).

For several centuries, herbarium manufacturing technology remained unchanged.

Since the beginning of the 20th century, A.A. Khoshkov proposed the use of wadded mattresses made from tissue paper and a thin layer of cotton wool (Alekhin, Syreyshchikov, 1926). This method has become widely used by Russian botanists.

At the end of the 20th century, corrugated cardboard began to be used as one of the elements of an improved method for drying plants (Skvortsov, 1977; Willing, 2010). In fact, this is a more modern replacement for wadded mattresses that have become classic.

Nowadays, thanks to the invention of new materials by the chemical industry, as well as the improvement of the theoretical and technical base, new technologies are increasingly emerging. It is possible to use them in herbarium area, for example:

- Scotch herbaria, the principle of which is to use an adhesive tape made of polymeric materials to attach herbarium materials to the sheet. The authors classify such herbariums as applied and temporary herbariums used for applied research and educational purposes (Dimitriyev, Lastukhin, 2020).

- Herbarium in polypropylene files: it is practiced to store herbarium samples on sheets of thick paper inserted into standard plastic (polypropylene) files for A3 papers. This method of storage has stood the test of time. Thus, the scientific herbarium, stored in self-made polyethylene files, sealed with an iron in 1974–1978, retained the original color of leaves and flowers (Ena, 2011).

пластиковые (полипропиленовые) файлы для бумаг размера А3. Этот способ хранения прошел испытание временем. Так, научный гербарий, хранящийся в самодельных полиэтиленовых файлах, запаянных утюгом в 1974–1978 гг., сохранил первоначальную окраску листьев и цветков (Ена, 2011).

- Гербарий, содержащий полимерные прокладки, между которыми располагаются растения и которые склеиваются при нагревании; при этом в полимерных прокладках выполнены вентиляционные отверстия для устранения конденсата из гербария (Иванова, 2017b).

- Гербарий содержит как минимум одну полимерную прокладку и подложку, выполненную из пористого материала, на которую укладывается растение. Подложка пропитывается антимикробными препаратами, что впоследствии приводит к гибели мицелия грибов и их спор, бактерий. Полимерные прокладки склеиваются при нагревании (Иванова, 2017a).

В 2017 г. на базе Южного филиала ФГБУ «ВНИИКР» был построен карантинный интродукционный участок для изучения адаптационного потенциала, возможной акклиматизации карантинных и инвазивных видов растений, а также заготовки гербарных и семенных материалов (Вандышева и др., 2018). В связи с этим была поставлена задача из всего имеющегося мирового опыта создания гербарных коллекций выбрать и адаптировать наиболее подходящие способы гербаризации растений в аспекте биобезопасности создаваемых образцов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы некоторые способы заготовки и гербаризации растений, предложенные А.В. Щербатовым и С.Р. Майоровым (2006); М.Е. Павловой и В.А. Сурковым (2008); М.И. Деминой и др. (2009, 2012); О.Н. Деминой и др. (2015); А.Ю. Тептиной и А.Г. Пауковым (2013); В.В. Бялтом и др. (2015); А.В. Дмитриевым и А.А. Ластухиным (2020) и др.

В процессе сушки применялся гофрокартон 3-слойный, профиль А и В и газетная бумага.

Для фиксирования гербарного образца использовалась пленка пакетная для ламинирования А4 (размер 216 x 303 мм, толщина 100 мкм) и ламинатор PDA4-230CN.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изготовления гербарных коллекций карантинных растений, в том числе отсутствующих на территории Евразийского экономического союза (ЕАЭС), необходима качественная сушка растений и их частей, с использованием минимального количества времени и рабочей силы, сохранением диагностически значимых морфологических признаков у получаемого гербарного материала и его последующим монтированием.

Для совершенствования и ускорения процесса сушки в дополнение к бумажным «рубашкам» использовался гофрированный картон, который способствовал отводу лишней влаги из растений.

Растения родов *Cenchrus*, *Cuscuta*, *Bidens*, *Solanum*, *Ambrosia*, *Ipomoea* собирались в утренние часы при сухой погоде, затем аккуратно и тщательно раскладывались на газетной бумаге, расположенной

- Herbarium containing polymer pads between which plants are located and which stick together when heated; at the same time, ventilation holes are made in the polymer gaskets to eliminate condensate from the herbarium (Ivanova, 2017b).

- The herbarium contains at least one polymeric spacer and a substrate made of porous material on which the plant is placed. The substrate is impregnated with antimicrobial agents, which subsequently leads to the death of fungal mycelium and their spores, bacteria. Polymer spacers stick together when heated (Ivanova, 2017a).

In 2017, a quarantine introduction site was built on the basis of the Southern Branch of FGBU “VNIICR” to study the adaptive potential, possible adaptation of quarantine and invasive plant species, as well as the procurement of herbarium and seed materials (Vandyшева et al., 2018). In this regard, the task was set to select and adapt the most appropriate methods of plant herbarization from all the existing world experience in creating herbarium collections in terms of the biosafety of the created samples.

MATERIALS AND METHODS

The work uses some methods of harvesting and herbarization of plants proposed by A.V. Shcherbakov and S.R. Mayorov (2006); M.E. Pavlova and V.A. Surkov (2008); M.I. Demina et al. (2009, 2012); O.N. Demina et al. (2015); A.Yu. Teptina and A.G. Paukov (2013); V.V. Byalt et al. (2015); A.V. Dimitriev and A.A. Lastukhin (2020) et al.

In the drying process, 3-layer corrugated cardboard, profile A and B and newsprint were used.

To fix the herbarium sample, we used an A4 laminating film (size 216 x 303 mm, thickness 100 µm) and a PDA4-230CN laminator.

RESULTS AND DISCUSSION

To make herbarium collections of quarantine plants, including those absent on the territory of the Eurasian Economic Union (EAEU), high-quality drying of plants and their parts is necessary, using a minimum amount of time and labor, maintaining diagnostically significant morphological features in the resulting herbarium material and its subsequent mounting.

To improve and speed up the drying process, in addition to paper “shirts”, corrugated cardboard was used, which contributed to the removal of excess moisture from plants.

Plants of the genera *Cenchrus*, *Cuscuta*, *Bidens*, *Solanum*, *Ambrosia*, *Ipomoea* were collected in the morning hours and dry weather, then neatly and carefully laid out on newsprint, located on corrugated cardboard. After the plants are laid down, the newsprint is closed and pressed against the top with a sheet of corrugated cardboard, then the next sheet of newsprint is placed on top, and the process is repeated. Bundles with laid plants are placed in a press and pulled together with a rope, cord or belt.

By using corrugated cardboard, the issue of the laboriousness of shifting herbariums with paper “shirts” was solved, during which injuries of parts of

на гофрокартоне. После того как растения уложены, газетная бумага закрывается и прижимается сверху листом гофрокартона, далее сверху размещается следующий лист газетной бумаги, и процесс повторяется. Пачки с уложенными растениями закладываются в пресс и стягиваются веревкой, шнуром или ремнем.

Посредством применения гофрированного картона был решен вопрос трудоемкости перекладывания гербариев бумажными «рубашками», в процессе которого неоднократно отмечалось травмирование частей растений, в частности цветков, а также ввиду недостаточного отвода влаги отмечалось побурение и почернение растений, разрастание плесневых грибов, что приводило гербарные образцы в негодность. Такая технология сушки гербарных образцов отличается от традиционной и проходит в более короткие сроки без перекладывания и замены бумажных «рубашек», что положительно сказывается на качестве получаемого материала.

Процесс сушки должен проходить в спрессованном состоянии в проветриваемом затененном месте (под деревом или в помещении). В случае нахождения гербарной сетки на солнце происходит разрушение хлорофилла, что приводит к пожелтению растений, а также разрушению ДНК под воздействием высоких температур.

Данный способ сушки не всегда удобен, поскольку картон занимает много места.

В ходе работ, проводимых в 2017–2021 гг., отмечаются стабильные качественные показатели дегидратации растений данным способом: многие виды засушенных растений сохраняют исходный цвет. Были определены трудности с растениями рода *Ipomoea* L.: в процессе прессовки и сушки сочные листья и стебли травмировались, отвод влаги был недостаточный даже при условии смены бумажных «рубашек», повышенной температуры воздуха (около 40 °C в дневное время) и активной вентиляции помещения. Создавались условия для загнивания образцов.

Важно понимать, что гербарные коллекции могут быть источником распространения семян и плодов инвазивных и карантинных видов растений, причем некоторые из них являются отсутствующими на территории ЕАЭС. Это может привести к образованию устойчивых популяций сорных растений, опасных для жизни и здоровья людей и животных, к большим экономическим потерям в сельскохозяйственной отрасли. Для снижения такой вероятности была впервые разработана и применена технология фиксирования гербарных образцов карантинных видов растений посредством ламинирования (рис. 1, 2).

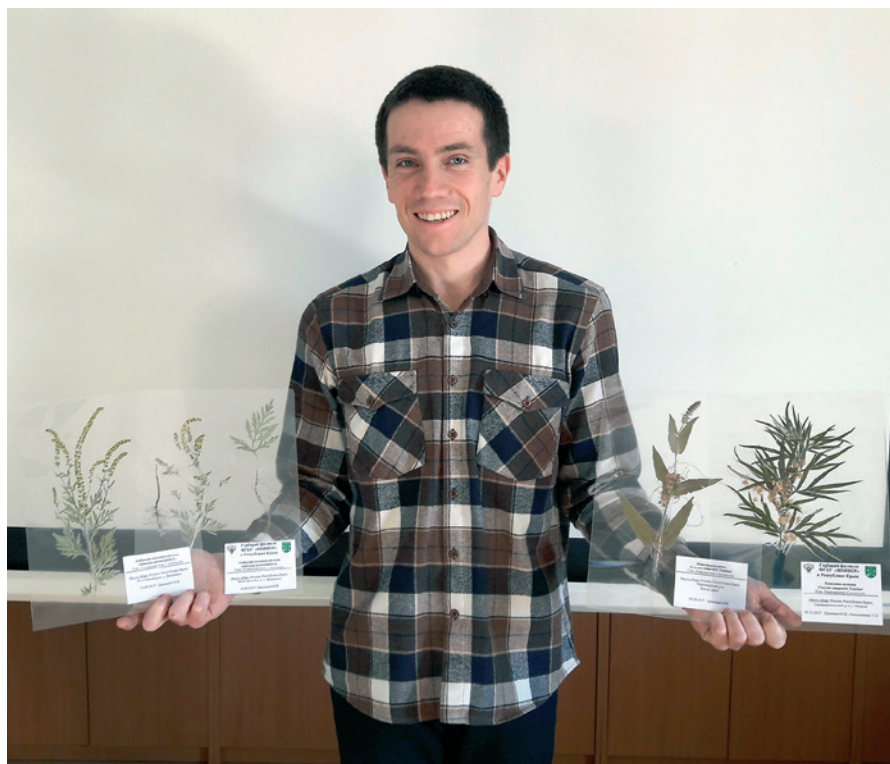


Рис. 1. Н.В. Цинкевич с гербарными листами, смонтированными посредством ламинирования (фото Т.З. Омеляненко)

Fig. 1. N.V. Tsinkevich with herbarium sheets mounted by lamination (photo by T.Z. Omelyanenko)

plants, in particular flowers, were repeatedly noted, and due to insufficient moisture removal, browning and blackening of plants, growth of mold fungi was noted, which made herbarium specimens unusable. This technology of drying herbarium samples differs from the traditional one and takes place in a shorter time without shifting and replacing paper “shirts”, which has a positive effect on the quality of the material obtained.

The drying process should take place in a compressed state in a ventilated shaded place (under a tree or indoors). If the herbarium grid is exposed to the sun, chlorophyll is destroyed, which leads to yellowing of plants, as well as DNA destruction under the influence of high temperatures.

This drying method is not always convenient, since the cardboard takes up a lot of space.

In the course of work carried out in 2017–2021, stable qualitative indicators of plant dehydration by this method are noted: many dried plant species retain their original color. There were certain difficulties with plants of the genus *Ipomoea* L.: in the process of pressing and drying, succulent leaves and stems were injured, moisture removal was insufficient even if the paper “shirts” were changed, the air temperature was elevated (about 40 °C in the daytime) and the room was actively ventilated. Conditions were created for samples to rot.

It is important to understand that herbarium collections can be a source of distribution of seeds and fruits of invasive and quarantine plant species, some

Растения при такой технологии должны быть предварительно хорошо запрессованы и полностью высушены (ломкий лист). В случае если растения будут недостаточно высушены, под пленкой начнется процесс загнивания, и гербарий придет в негодность. В случае неправильного прессования растения будут деформированы, их трудно будет исследовать в дальнейшем.

Мы предпочитаем монтирование на прозрачной основе ввиду возможности более детального изучения гербарного материала со всех сторон без нарушения целостности. Для этого высушенные растения или все составляющие части растения от цветка до корня равномерно размещаются на пленке, отступая со всех сторон не менее одного сантиметра. В правый нижний угол пленки вкладывается заблаговременно подготовленная этикетка, содержащая следующие сведения о растении: латинское и русское название семейства, латинское название вида с указанием автора латинского названия, русское название вида, краткое описание места сбора с указанием географических координат, дата сбора, а также фамилия и инициалы того, кем растение собрано и определено. Пленка аккуратно закрывается и направляется в ламинатор, где гербарий надежно запечатывается.

Не рекомендуется ламинирование засушенных растений с крупными семенами (плодами), а также толстостебельных растений, которые не смогут пройти между валами ламинатора,

of which are absent in the territory of the EAEU. This can lead to the formation of stable populations of weeds that are dangerous to the life and health of people and animals, to large economic losses in the agricultural industry. To reduce this probability, the technology of fixing herbarium samples of quarantine plant species by lamination has been developed and applied for the first time (Fig. 1, 2).

Plants with this technology must be pre-pressed well and completely dried (fragile leaf). If the plants are not dried enough, the process of decay will begin under the film, and the herbarium will become unusable. In case of improper pressing, the plants will be deformed, it will be difficult to study them in the future.

We prefer mounting on a transparent basis due to the possibility of a more detailed study of the herbarium material from all sides without compromising integrity. To do this, dried plants or all constituent parts of the plant from the flower to the root are evenly placed on the film, retreating from all sides at least one centimeter. A pre-prepared label containing the following information about the plant is inserted into the lower right corner of the film: the Latin and Russian family name, the Latin name of the species with the author of the Latin name, the Russian name of the species, a brief description of the place of collection with indication of geographical coordinates, the date of collection, and also the surname and the initials of who collected and identified the plant. The film is carefully closed and sent to the laminator, where the herbarium is securely sealed.

It is not recommended to laminate dried plants with large seeds (fruits), as well as thick-stemmed plants that cannot pass between the laminator shafts, as this may cause damage to the equipment and not ensure a quality sample.

It is important to note that when mounting with the help of lamination, the plant is placed in anaerobic conditions, where oxidative processes will be absent or take place at a minimum rate. Presumably, this method of mounting will extend the suitability of the herbarium collection for use – when stored in a dry room with diffused light and moderate temperatures.

Some positive aspects of the application of technology for fixing herbarium specimens of quarantine weeds by means of lamination are noted:

- there is no direct access to the plant, which ensures reliable fixation of ripe seeds of quarantine plant species and prevents their undesirable spread;
- it is possible to mount herbarium samples with and without a substrate – on a transparent basis;
- in the case of mounting on a transparent basis, it is possible to study the herbarium specimen from all sides (Fig. 2);
- the pubescence of plants is preserved, which can be easily seen through binoculars (Fig. 3);
- the storage duration of herbarium materials increases;
- breakage, crumbling and loss of parts of dry plants during shifting and transportation are excluded;
- the issue of pest control of herbariums is solved.



Рис. 2. Гербарный лист *Bidens pilosa* var. *radiata* (Sch. Bip.) J.A. Schmidt, монтированный на прозрачной основе (фото Н.В. Цинкевича)

Fig. 2. Herbarium leaf of *Bidens pilosa* var. *radiata* (Sch. Bip.) J.A. Schmidt, mounted on a transparent basis (photo by N.V. Tsinkevich)

поскольку это может стать причиной поломки техники и не обеспечить получение качественного образца.

Важно отметить, что при монтировании с помощью ламинирования растение заключается в анаэробные условия, где окислительные процессы будут отсутствовать или проходить с минимальной скоростью. Предположительно, такой способ монтирования позволит продлить пригодность гербарной коллекции к использованию – при хранении в условиях сухого помещения с рассеянным светом и умеренными температурами.

Отмечены некоторые положительные аспекты применения технологии фиксирования гербарных образцов карантинных сорных растений посредством ламинирования:

- отсутствует прямой доступ к растению, что обеспечивает надежную фиксацию созревших семян карантинных видов растений и предотвращает их нежелательное распространение;
- возможно монтирование гербарных образцов с подложкой и без нее – на прозрачной основе;
- в случае монтирования на прозрачной основе есть возможность изучения гербарного образца со всех сторон (рис. 2);
- сохраняется опушение растений, которое с легкостью можно рассмотреть в бинокляр (рис. 3);
- увеличивается длительность хранения гербарных материалов;
- исключается обламывание, крошение и потери частей сухих растений при перекладывании и транспортировке;
- решается вопрос борьбы с вредителями гербариев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный вид монтирования гербарных образцов посредством ламинирования отвечает требованиям биобезопасности и может использоваться как для изготовления демонстрационных гербариев и ведения образовательного процесса, так и в практической деятельности инспекторов территориальных управлений Россельхознадзора в ходе выполнения обследований подкарантинных объектов на наличие карантинных растений без опасений, что гербарный материал послужит источником формирования очага из-за осыпания жизнеспособных семян.

Рассмотренные положительные стороны данной технологии позволяют применять ее не только для монтирования карантинных видов растений, но и для фиксирования поврежденных вредителями, а также пораженных вирусными, грибными и бактериальными заболеваниями растений и их частей. Такие гербарии могут использоваться в ходе образовательного и демонстрационного процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алехин В., Сырейщиков Д. Методика полевых ботанических исследований. Вологда: АО Северный печатник, 1926.
2. Бялт В., Орлова Л., Потокин А., Складневская Н. Ботаника. Руководство по гербарному делу. – СПб.: Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, 2015, 72 с.



Рис. 3. Лист *Solanum sisymbriifolium* Lam., монтированный на прозрачной основе, под увеличением (фото Н.В. Цинкевича)

Fig. 3. Leaf of *Solanum sisymbriifolium* Lam., mounted on a transparent basis, under magnification (photo by N.V. Tsinevich)

CONCLUSION

The proposed type of mounting herbarium specimens by lamination meets the requirements of biosafety and can be used both for the manufacture of demonstration herbariums and the educational process, and in the practical activities of inspectors of the Rosselkhoz nadzor territorial departments during the inspection of regulated objects for the presence of quarantine plants without fear that herbarium material will serve as a source formation of a focus due to shedding of viable seeds.

The considered positive aspects of this technology make it possible to use it not only for mounting quarantine plant species, but also for fixing plants and their parts damaged by pests, as well as those affected by viral, fungal and bacterial diseases. Such herbaria can be used during the educational and demonstration process.

REFERENCES

1. Alekhin V., Syreyshchikov D. Methods of field botanical research [Metodika polevykh botanicheskikh issledovaniy]. Vologda: AO Northern Printer, 1926 (in Russian).
2. Byalt V., Orlova L., Potokin A., Sklyarevskaya N. Botany. Guide to herbarium [Botanika. Rukovodstvo po gerbarnomu delu]. St. Petersburg: St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, 2015, 72 p. (in Russian).
3. Vandyshcheva N., Tsinevich N., Omelyanenko T., Kulakov V., Kulakova Yu., Mazurin E. Quarantine Introduction Site in Crimea – Scientific Base of the Country's Phytosanitary Security. *Plant quarantine. Science and Practice*, 2018; 1 (23): 24–28.
4. Demina M., Solovyov A., Chechetkina N. Herbarization of plant material. Textbook. M.: RGAZU, 2009, 56 p. (in Russian).

3. Вандышева Н., Цинкевич Н., Омеляненко Т., Кулаков В., Кулакова Ю., Мазурин Е., 2018. Карантинный интродукционный участок в Крыму – научная база фитосанитарной безопасности страны. – Карантин растений. Наука и практика, 1 (23): 24–28.

4. Демина М., Соловьев А., Чечеткина Н. Гербаризация растительного материала / Учебное пособие. – М.: РГАЗУ, 2009, 56 с.

5. Дмитриев А., Ластухин А., 2020. Гербарное дело, учение о гербариях, гербарнология и методика скотч-гербария. – Научные труды Чебоксарского филиала Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН, № 16: 9–24.

6. Ена А., 2011. Гербарий в полипропиленовых файлах. О новом способе хранения гербарных образцов. – Укр. ботан. журн., 68 (3): 394–398.

7. Иванова И.И., 2017а. Патент РФ на изобретение № 2642330 «Гербарий» 30.01.2017, бюл. № 3 от 24.01.2018.

8. Иванова И.И., 2017b. Патент РФ на изобретение № 2656570 «Гербарий» 30.01.2017, бюл. № 16 от 05.06.2018.

9. Павлова М., Сурков В. Учебное пособие по изготовлению гербария. – М.: РУДН, 2008, 32 с.

10. Скворцов А.К. Гербарий. Пособие по методике и технике. – М.: Наука, 1977, 199 с.

11. Тептина А., Пауков А. Ботанические коллекции и техника гербаризации растений, грибов и водорослей. – Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2013, 100 с.

12. Щербakov А., Майоров С. Полевое изучение флоры и гербаризация растений. Летняя учебно-производственная практика по ботанике. Часть 1. – М.: Изд. каф. высших растений биол. ф-та Моск. ун-та, 2006, 84 с.

13. Willing E., 2010. Eine verbesserte Methode zum Trocknen von Pflanzen für Herbarien. – Naturw. Beiträge Museum Dessau, Heft 22: 39–48.

14. Демина М., Соловьев А., Чечеткина Н., 2012. Гербаризация растений (сбор, техника и методика заготовки растительного материала): учебное пособие [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.iprbookshop.ru/20644.html> (дата обращения: 20.01.2022).

15. Демина О., Майоров С., Щербakov А., Рогаль Л., Дмитриев П., Петров Д., 2015. Флора степной части бассейна Дона. Атлас-определитель [Электронный ресурс]. – URL: http://flora-don.sfedu.ru/book/book/1_1.html (дата обращения: 20.01.2022).

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

Цинкевич Николай Владимирович, младший научный сотрудник научно-методического отдела Южного филиала ФГБУ «ВНИИКР», г. Симферополь, Республика Крым, Россия; ORCID 0000-0003-3774-3548, e-mail: duna8888@mail.ru.

5. Dimitriev A., Lastukhin A. Herbarium case, doctrine of herbariums, herbariology and the scotch-herbaria method [Gerbarnoye delo, ucheniye o gerbariyakh, gerbariologiya i metodika skotch-gerbariya]. Scientific works of the Cheboksary branch of the Main Botanical Garden. N.V. Tsitsina RAS, 2020; 16: 9–24 (in Russian).

6. Yena A. Herbarium in polypropylene files. On a new approach to storage of herbarium specimens. *Ukr. bot. jour.*, 2011; 68 (3): 394–398 (in Russian).

7. Ivanova I.I., 2017a. RF patent for the invention No. 2642330 “Herbarium” 01/30/2017, bul. No. 3 dated 01/24/2018.

8. Ivanova I.I., 2017b. RF patent for the invention No. 2656570 “Herbarium” 30.01.2017, bul. No. 16 dated 06/05/2018.

9. Pavlova M., Surkov V. Tutorial for making herbarium [Uchebnoye posobiye po izgotovleniyu gerbariya]. M.: RUDN University, 2008, 32 p. (in Russian).

10. Skvortsov A.K. Herbarium. A guide to methodology and technology [Gerbariy. Posobiye po metodike i tekhnike]. M.: Nauka, 1977, 199 p. (in Russian).

11. Teptina A., Paukov A. Botanical collections and techniques of herbarization of plants, fungi and algae [Botanicheskiye kollektsii i tekhnika gerbarizatsii rasteniy, gribov i vodorosley]. Ekaterinburg: Ural University Press, 2013, 100 p. (in Russian).

12. Shcherbakov A., Mayorov S. Field study of flora and herbarization of plants. Summer training and production practice in botany [Polevoye izucheniye flory i gerbarizatsiya rasteniy. Letnyaya uchebno-proizvodstvennaya praktika po botanike]. Part 1. M.: Ed. Department of higher plants. Faculty of Biology, Moscow State University, 2006, 84 p. (in Russian).

13. Willing E. Eine verbesserte Methode zum Trocknen von Pflanzen für Herbarien. *Naturw. Beiträge Museum Dessau*, 2010; Heft 22: 39–48.

14. Demina M., Solovyov A., Chechetkina N., 2012. Herbarization of plants (collection, technique and method of harvesting plant material): textbook [Gerbarizatsiya rasteniy (sbor, tekhnika i metodika zagotovki rastitel'nogo materiala): uchebnoye posobiye] [Electronic resource]. URL: <http://www.iprbookshop.ru/20644.html> (last accessed: 20.01.2022).

15. Demina O., Mayorov S., Shcherbakov A., Rogal L., Dmitriev P., Petrov D., 2015. Flora of the steppe part of the Don basin. Identification atlas [Flora stepnoy chasti basseyna Dona. Atlas-opredelitel] [Electronic resource]. URL: http://flora-don.sfedu.ru/book/book/1_1.html (last accessed: 20.01.2022).

INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Nikolai Tsinkevich, Junior Researcher, Research and Methodology Department, Southern Branch of FGBU “VNIICR”, Simferopol, Republic of Crimea, Russia; ORCID 0000-0003-3774-3548, e-mail: duna8888@mail.ru.

Здесь может быть ваша статья!

Журнал «Фитосанитария. Карантин растений» приглашает авторов для публикации своих научных работ

Редакция журнала «Фитосанитария. Карантин растений» рада предложить вам возможность публикации ваших статей на страницах журнала. Наша цель – привлечение внимания к наиболее актуальным проблемам карантина растений специалистов сельского хозяйства и всех заинтересованных в этом людей.

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

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

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

ЗАДАЧИ ЖУРНАЛА

- Изучение основных тенденций развития науки в области карантина растений
- Анализ широкого круга передовых технологий в области мониторинга и лабораторных исследований по карантину растений
- Обсуждение актуальных вопросов карантина растений

ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРЕДОСТАВЛЯЕМЫМ СТАТЬЯМ

К публикации принимаются статьи на двух языках: русском и английском, содержащие результаты собственных научных исследований, объемом до 15 страниц, но не менее 3 (при одинарном интервале и размере шрифта 12). Оптимальный объем статьи – от 1500 слов. Статьи большего объема могут быть приняты по согласованию с редакцией журнала.

СТРУКТУРА ПРЕДОСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ*

1. УДК, название статьи.
2. Инициалы, фамилия автора.
3. Место работы автора, город, страна, ORCID ID, адрес электронной почты.
4. Аннотация (краткое точное изложение содержания статьи, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): 200–250 слов, но не более 2000 знаков с пробелами.
5. Ключевые слова (5–10 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи.
6. Введение.
7. Материалы и методы.
8. Результаты и обсуждения.
9. Выводы/заключение.
10. Список литературы (т. е. список всей использованной литературы, ссылки на которую даются в самом тексте статьи): правила составления направляются автору по запросу.
11. Информация об авторах: приводится полная информация о каждом из авторов (место работы, город, страна, ORCID ID, адрес электронной почты).
12. Иллюстративные материалы (фотографии, рисунки) допускаются хорошей контрастности, с разрешением не ниже 300 точек на дюйм (300 dpi), оригиналы прикладываются к статье отдельными файлами в формате .tiff или .jpeg (иллюстрации, не соответствующие требованиям, будут исключены из статей, поскольку достоверное их воспроизведение типографским способом невозможно). Необходимо указать авторство каждой фотографии (Ф. И. О. фотографа или ссылку).
13. В редакцию необходимо предоставить две рецензии на статью («внешнюю» и «внутреннюю»).

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

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

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

Адрес: 140150, Россия, Московская область, г. Раменское, р. п. Быково, ул. Пограничная, д. 32
Контактное лицо: Зиновьева Светлана Георгиевна
Телефон: 8 (499) 707-22-27, e-mail: zinoveva-s@mail.ru

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ «ВНИИКР»)



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

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

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

- Ведущее учреждение в Российской Федерации по синтезу и применению феромонов для выявления карантинных и некарантинных вредителей и борьбы с ними
- ФГБУ «ВНИИКР» – партнер международной программы по координации научных исследований в области карантина растений EUPHRESKO II (European PHYtosanitary RESearch COordination)
- В ФГБУ «ВНИИКР» создан и действует Технический комитет по стандартизации ТК 42 «Карантин и защита растений»
- Ведущее научно-методическое учреждение в составе Координационного совета по карантину растений государств – участников СНГ
- 19 филиалов на территории Российской Федерации
- Головное научно-методическое учреждение по реализации Плана первоочередных мероприятий, направленных на гармонизацию карантинных фитосанитарных мер государств – членов Таможенного союза

140150, Россия,
Московская область,
г. Раменское, р. п. Быково,
ул. Пограничная, д. 32

Тел./факс:
8 (499) 707-22-27

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