

# КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

## НАУКА И ПРАКТИКА

АВГУСТ  
3|13|2015

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ ЖУРНАЛ

**АНГЛО-РУССКИЙ СЛОВАРЬ  
ПО ЗАЩИТЕ И КАРАНТИНУ РАСТЕНИЙ** стр. 4

**КОЛЬЦЕВАЯ ГНИЛЬ КАРТОФЕЛЯ —  
СКРЫТАЯ УГРОЗА УРОЖАЮ** стр. 6

**ЧЕРЕДА ДВАЖДЫПЕРИСТАЯ  
*BIDENS BIPINNATA* L. —  
ВИД КАРАНТИННОГО СОРНОГО РАСТЕНИЯ ИЗ НОВОГО  
ПЕРЕЧНЯ КАРАНТИННЫХ ОБЪЕКТОВ, ОТСУТСТВУЮЩИЙ  
НА ТЕРРИТОРИИ РФ** стр. 46

**ENGLISH-RUSSIAN DICTIONARY AND  
HANDBOOK ON PLANT PROTECTION** page 5

**RING ROT OF POTATO IS  
A HIDDEN THREAT TO HARVEST** page 9

**SPANISH NEEDLES *BIDENS BIPINNATA* L. —  
A QUARANTINE WEED SPECIES  
ON THE NEW LIST OF QUARANTINE PESTS ABSENT  
FROM THE RUSSIAN FEDERATION** page 49

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL

# PLANT HEALTH

## RESEARCH AND PRACTICE

AUGUST  
3|13|2015

# «КАРАНТИН РАСТЕНИЙ. НАУКА И ПРАКТИКА»

ДВУЯЗЫЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ №3 (13) 2015 Г.

## Главный редактор:

А.Я. Сапожников,  
директор ФГБУ «ВНИИКР»

## Шеф-редактор:

Светлана Зиновьева,  
помощник директора  
ФГБУ «ВНИИКР» по связям  
с общественностью и СМИ

## Выпускающие редакторы:

Ольга Лесных,  
Юлия Мелано,  
Юлиана Бададгулова  
e-mail: karantin.r@yandex.ru

## Редакционная коллегия

журнала «Карантин растений.  
Наука и практика»:

**Швабаускаене Ю.А.** — заместитель  
Руководителя Россельхознадзора

**Долженко В.И.** — академик  
РАН, заместитель директора  
Всероссийского НИИ  
защиты растений

**Надыкта В.Д.** — академик РАН,  
директор Всероссийского НИИ  
биологической защиты растений

**Павлюшин В.А.** — академик РАН,  
директор Всероссийского НИИ  
защиты растений

**Санин С.С.** — академик РАН,  
доктор биологических наук,  
профессор, заведующий  
отделом Всероссийского НИИ  
фитопатологии

**Мартин Уорд** —

Генеральный директор ЕОКЗР

**Рингольдс Арнитис** —

Президент ЕОКЗР

**Ханну Кукконен** — директор  
подразделения фитосанитарного  
надзора, EVIRA (Финляндия)

**Сагитов А.О.** — Генеральный  
директор ТОО «Казахский НИИ  
защиты и карантина растений»

**Сорока С.В.** — директор РУП  
«Институт защиты растений»  
НАН Республики Беларусь

**Джалилов Ф.С.** — доктор  
биологических наук,  
профессор, заведующий  
лабораторией защиты растений  
МСХА им. К.А. Тимирязева

**Абасов М.М.** — доктор  
биологических наук,  
заместитель директора  
ФГБУ «ВНИИКР»

**Яковлева В.А.** — кандидат  
биологических наук, заместитель  
директора ФГБУ «ВНИИКР»

**Шероколава Н.А.** — заместитель  
директора ФГБУ «ВНИИКР»,  
вице-президент ЕОКЗР

## РЕДАКЦИЯ:

**Волкова Е.М.** — заведующая  
лабораторией сорных растений

**Волков О.Г.** — начальник  
отдела биометода

**Кулинич О.А.** — доктор  
биологических наук,  
начальник отдела лесного  
карантина

**Приходько Ю.Н.** — начальник  
научно-методического отдела  
фитопатологии

**Скрипка О.В.** — заведующая  
лабораторией микологии

**Дренова О.Н.** — начальник  
отдела по международным  
связям и вопросам ВТО  
(переводчик)

**Маткава Л.Р.** — специалист  
отдела по международным  
связям и вопросам ВТО  
(переводчик)

**Шахманова З.Э.** — специалист  
отдела по международным  
связям и вопросам ВТО  
(переводчик)

## Дизайн и верстка:

Мария Повалеева

## Корректор:

Татьяна Артемьева

## Менеджер по подписке и дистрибуции:

Игорь Алпатов  
+7 (925) 357 20 61

Журнал «Карантин растений. Наука и практика» зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор), свидетельство о регистрации ПИ № ФС77-52594 от 25 января 2013 г.

**Учредитель:** ООО «Успех», выпускается по заказу Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр карантин растений» (ФГБУ «ВНИИКР»)

**Издатель:** ООО «Успех» (105122, г. Москва, Щелковское шоссе, д. 13, оф. 402)  
Адрес редакции: 105122, г. Москва, Щелковское шоссе, д. 13, оф. 402

**Типография:** ООО «Юнион Принт»,  
603022, Нижегородская область, г. Нижний Новгород, Окский Съезд, д. 2, тел.: 8 (831) 439-44-99  
Тираж 2000 экземпляров. Бесплатно.

# СОДЕРЖАНИЕ CONTENT

## I НОВОСТИ

Англо-русский словарь по защите и карантину растений

## I NEWS

English-Russian Dictionary and Handbook on Plant Protection

4 5

## II НАУЧНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ КАРАНТИНА РАСТЕНИЙ

Кольцевая гниль картофеля — скрытая угроза урожаю  
Д.Ф. Зинников, директор Карельского филиала ФГБУ «ВНИИКР»  
О.В. Синкевич, Петрозаводский государственный университет

## II RESEARCH STUDIES IN PLANT QUARANTINE

Ring Rot of Potato is a Hidden Threat to Harvest  
Denis F. Zinnikov, Director of FGBU VNIKR's Karelian Branch  
Olga V. Sinkevich, Petrozavodsk State University

6 9

Молекулярно-генетические методы идентификации,  
вредоносность и распространение кокцид (Coccoidea)  
И.О. Камаев, начальник  
научно-экспериментального отдела ФГБУ «ВНИИКР»

Н.А. Гура, старший научный сотрудник  
научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР»  
А.В. Шипулин, младший научный сотрудник  
научно-экспериментального отдела ФГБУ «ВНИИКР»

Coccids (Coccoidea) Significance, Distribution  
and DNA-Based Identification Methods  
Ilya O. Kamaev, Head of FGBU VNIKR's  
Research and Testing Department

Natalia A. Gura, Senior Researcher at FGBU VNIKR's  
Entomological Research and Methodology Department  
Andrey V. Shipulin, Junior Researcher at FGBU VNIKR's  
Research and Testing Department

12 23

Динамика относительной восприимчивости  
сортов *Vitis vinifera* к *Xylella fastidiosa*  
Араш Рашид, Отдел экологии, стратегии и управления,  
Университет Калифорнии Беркли, Калифорния,  
Соединенные Штаты Америки

Джойс Кван, Отдел экологии, стратегии и управления,  
Университет Калифорнии Беркли, Калифорния,  
Соединенные Штаты Америки

Бреанна Барафф, Отдел экологии, стратегии и управления,  
Университет Калифорнии Беркли, Калифорния,  
Соединенные Штаты Америки

Диана Линг, Отдел экологии, стратегии и управления,  
Университет Калифорнии Беркли, Калифорния,  
Соединенные Штаты Америки

Мэтью П. Доэрти, Отдел энтомологии Университета Калифорнии,  
Риверсайд, Калифорния, Соединенные Штаты Америки

Набил Киллини, Научно-образовательный центр цитрусовых культур,  
Отдел энтомологии и нематологии, Университет Флориды,  
Флорида, Соединенные Штаты Америки

Родриго П.П. Алмейда, Отдел экологии, стратегии и управления,  
Университет Калифорнии Беркли,  
Калифорния, Соединенные Штаты Америки

Relative Susceptibility of *Vitis vinifera* Cultivars  
to *Xylella fastidiosa* through Time  
Arash Rashed, Department of Environmental Science, Policy,  
and Management, University of California, Berkeley,  
California, United States of America

Joyce Kwan, Department of Environmental Science, Policy,  
and Management, University of California, Berkeley, California,  
United States of America

Breanna Baraff, Department of Environmental Science, Policy,  
and Management, University of California, Berkeley, California,  
United States of America

Diane Ling, Department of Environmental Science, Policy,  
and Management, University of California, Berkeley,  
California, United States of America

Matthew P. Daugherty, Department of Entomology, University of California  
Riverside, Riverside, California, United States of America

Nabil Killiny, Citrus Research and Education Center,  
Department of Entomology and Nematology, University of Florida, IFAS,  
Lake Alfred, Florida, United States of America

Rodrigo P.P. Almeida, Department of Environmental Science, Policy,  
and Management, University of California, Berkeley, California,  
United States of America

34 40

Череда дваждыперистая *Bidens bipinnata* L. —  
вид карантинного сорного растения из нового Перечня  
карантинных объектов, отсутствующий на территории РФ  
Е.М. Волкова, заведующая лабораторией сорных растений ФГБУ «ВНИИКР»  
Ю.Р. Кочнев, м.н.с. лаборатории сорных растений ФГБУ «ВНИИКР»

Spanish Needles *Bidens bipinnata* L. —  
a Quarantine Weed Species on the New List  
of Quarantine Pests Absent from the Russian Federation  
Elena M. Volkova, Chief of FGBU VNIKR's Weed Laboratory  
Yury R. Kochnev, Junior Researcher at FGBU VNIKR's Weed Laboratory

46 49

Диагностика вириода веретеновидности клубней картофеля  
С.Б. Абросимова, м.н.с. научно-методического отдела  
фитопатологии ФГБУ «ВНИИКР»  
Ю.Н. Приходько, начальник научно-методического отдела  
фитопатологии ФГБУ «ВНИИКР»

Detection and Identification of Potato Spindle Tuber Viroid  
Svetlana B. Abrosimova, Junior Researcher at FGBU VNIKR's  
Plant Pathology Research and Methodology Department  
Yury N. Prikhodko, Chief of FGBU VNIKR's  
Plant Pathology Research and Methodology Department

52 56

# АНГЛО-РУССКИЙ СЛОВАРЬ-СПРАВОЧНИК ПО ЗАЩИТЕ И КАРАНТИНУ РАСТЕНИЙ

В издательстве Российского государственного аграрного университета — МСХА имени К.А. Тимирязева вышел в свет «Англо-русский словарь-справочник по защите и карантину растений» (Москва, 2015, 450 с.; ISBN 978-5-9675-1124-0), подготовленный И.М. Митюшевым, кандидатом биологических наук, доцентом кафедры защиты растений РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева. Данный словарь-справочник является первым в России опытом издания наиболее полного собрания англоязычных терминов по защите и карантину растений и соответствующей терминологии на русском языке.

Словарь-справочник состоит из более чем 10 тысяч словарных статей, которые включают в себя английские термины и терминологические сочетания по важнейшим разделам защиты и карантина растений, обиходные названия наиболее распространенных и важных в экономическом отношении вредителей, болезней растений, сорняков, сельскохозяйственных культур, декоративных и лесных растений, а также общепринятые международные на-

звания пестицидов. Для всех обиходных названий вредителей, болезней растений, сорных и культурных растений приводятся латинские названия соответствующих таксонов, а большинство специальных терминов снабжено дефинициями или пояснениями на русском языке. В качестве приложений в словарь включены список аббревиатур названий организаций и терминов по защите и карантину растений, а также таблицы для взаимного перевода наиболее распространенных английских и метрических мер и весов (британская имперская и американская системы).

Словарь-справочник предназначен для широкого круга пользователей: студентов и аспирантов, обучающихся по сельскохозяйственным и биологическим направлениям подготовки, преподавателей английского языка и специальных сельскохозяйственных и биологических дисциплин в вузах, сотрудников лабораторий и научно-исследовательских институтов, ученых-лингвистов и научно-технических переводчиков, специалистов компаний-производителей средств защиты растений, сотрудников Федеральной службы по

ветеринарному и фитосанитарному надзору, Российского сельскохозяйственного центра, а также региональных и национальных организаций по карантину и защите растений других стран. Словарь-справочник имеет гриф Учебно-методического объединения вузов Российской Федерации по агрономическому образованию.

Особо следует отметить, что издание данного словаря-справочника автор посвятил двум знаменательным событиям: 150-летию основания Российского государственного аграрного университета — МСХА имени К.А. Тимирязева и 95-летию юбилею кафедры защиты растений РГАУ-МСХА, которая является старейшей кафедрой данного профиля в России; оба события будут широко отмечаться в декабре 2015 г.

# ENGLISH-RUSSIAN DICTIONARY AND HANDBOOK ON PLANT PROTECTION

The Publishing House of the Russian Timiryazev State Agrarian University also known as Moscow Timiryazev Agricultural Academy (RTSAU — MTAA) has published an English-Russian Dictionary and Handbook on Plant Protection (Moscow, 2015, Pp. 450; ISBN 978-5-9675-1124-0) compiled by Ilya M. Mityushev, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor at the RTSAU — MTAA's Academic Department of Plant Protection. In the Russian Federation, this Dictionary is the first attempt to produce a comprehensive edition of English plant protection and quarantine terms and their Russian equivalents.

The Dictionary comprises over 10 000 entries of words and word combinations used in major fields of plant protection and quarantine, common names of the most wide-spread and

economically significant plant pests, diseases, weeds, agricultural crops, ornamental and forest plants, as well as common names of pesticides. Corresponding Latin names of taxa are provided for all common names of plant pests, diseases, weeds and cultivated plants. Explanations in Russian are given for the majority of the field-specific terms. The Appendices provide a list of abbreviated names of plant protection organizations and abbreviations of plant protection terms, conversion tables of the most commonly used metric weights and measures of the imperial and American systems.

The Dictionary is meant for a wide audience: undergraduate and postgraduate students of agriculture and biology; college professors of English, agriculture and biology; specialists of laboratories and research institutions; linguists and

technical translators; specialists of plant protection companies; personnel of the Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance, the Russian Agricultural Centre as well as regional and national plant protection organizations. The Dictionary is approved by the Educational and Methodological Association of Institutions of Higher Agricultural Education of the Russian Federation.

Of special note is that the publication of the Dictionary is dedicated to the 150<sup>th</sup> anniversary of Moscow Timiryazev Agricultural Academy (RTSAU — MTAA) and the 95<sup>th</sup> anniversary of its Academic Department of Plant Protection which is the oldest plant protection academic department in the Russian Federation. These two events will see grand scale celebrations in December 2015.



# КОЛЬЦЕВАЯ ГНИЛЬ КАРТОФЕЛЯ — СКРЫТАЯ УГРОЗА УРОЖАЮ

Д.Ф. Зинников, директор Карельского филиала ФГБУ «ВНИИКР»

О.В. Синкевич, Петрозаводский государственный университет

Ценность и популярность картофеля давно неоспоримы, однако в Карелии сельскохозяйственные предприятия практически отказались от возделывания этой культуры, 96% произведенного картофеля в республике приходится на долю личных подсобных и крестьянских (фермерских) хозяйств (Карелия, 2012).

Массовое распространение и развитие болезней картофеля в посадках сельхозпроизводителей вызвано нарушением агротехники (картофель возделывается в монокультуре, для посадки используется собственный посадочный материал, в том числе продовольственный картофель). Часто зараженность клубней картофеля бывает скрытой, что обуслов-

лено погодными условиями, а также частичной устойчивостью сортов и низкой вирулентностью некоторых линий патогена. Перевозка и высадка клубней со скрытым заражением являются одной из причин распространения заболевания.

В 2011–2013 гг. проведено обследование посадок картофеля на территории Республики Карелия на наличие возбудителей бурой (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.) и кольцевой (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieckermann and Kotthoff) Smith)) гнилей картофеля.

В 2012–2013 гг. в обследование была включена территория Архангельской области. Сроки отбора образцов и проведения анализа — с третьей декады июля до конца августа. Для анализа использовались клубни и основание стеблей растения.

Выявление и идентификация *Ralstonia solanacearum* и *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* в образцах клубней картофеля проводились согласно стандарту организации «СТО ВНИИКР 4.009–2013 Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Методы выявления и идентификации» (2013).

Для выявления возбудителей бактериальных гнилей картофеля в лаборатории Карельского филиала

Для подтверждения результатов также применялся иммунофлуоресцентный анализ.

Проведенные исследования не выявили возбудителя бурой бактериальной гнили на территории Карелии и Архангельской области, однако было обнаружено присутствие возбудителя кольцевой гнили картофеля. Этот патоген является карантинным для территории Республики Беларусь и включен в список А2 ЕОКЗР (СТО ВНИИКР, 2013).

В 2011 г. обследование проводили в четырех районах республики. Возбудитель кольцевой гнили картофеля был обнаружен в 20,6% образцов, отобранных в Олонецком районе. Включение в обследование владельцев частных картофельных участков

большее число зараженных образцов обнаружено в партиях из Сортавальского и Олонецкого районов, расположенных в южной части Карелии. Патоген не был выявлен в образцах из Сеgezского и Пудожского районов (относящихся к северной части региона).

Обследование территории Архангельской области показало наличие возбудителя *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* во всех обследуемых районах. Из 81 проанализированного образца в 2012 г. возбудитель был обнаружен в 48, что составило 59,2%, в 2013 г. — из 105 образцов в 46, что составило 43,8%. Распределение образцов в пределах Архангельской области было неоднородным, наиболее часто (более 35% случаев) патоген встречался в образцах из Шенкурского, Котласского, Верхнетоемского, Вельского, Плесецкого, Приморского и Каргопольского районов.

Следует учесть, что при визуальном осмотре клубней картофеля, используемых для проведения анализа, не было выявлено симптоматики заболевания, что означает присутствие патогена в скрытой (латентной) форме.

Способность длительно бессимптомно находиться в клубнях и стеблях картофеля делает кольцевую гниль опасным заболеванием, спо-

**Способность длительно бессимптомно находиться в клубнях и стеблях картофеля делает кольцевую гниль опасным заболеванием, способным привести к потерям урожая до 45% (Евстратова, 2006; Лазарев, Борисова, 2010) как при производстве, так и во время хранения.**

ФГБУ «ВНИИКР» использовался молекулярно-генетический метод анализа — FLASH-ПЦР (см. рисунок).

2012–2013 гг. показало значительное распространение заболевания на территории республики. При этом

## Протокол результатов анализа

10 проб картофеля методом FLASH-ПЦР

Примечание: «К+» и «К-» — контрольные образцы.

Результат «+» — наличие в образце

*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*.

Результат «-» — отсутствие патогена в образце.

## Протокол №1 30авг2013

### *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

Оператор: Синкевич О.В.  
SN\_D3V213

Пробирка	Образец	Результат	Специфика	ВК
1/1	К+	+	10,60	9,59
2/1	К-	-	1,08	9,88
3/1	2681	-	1,11	14,70
4/1	2680	-	1,08	14,80
5/1	2699	-	1,08	14,90
6/1	2698	+	7,83	15,00
7/1	2696	+	7,48	12,80
8/1	2693	+	8,71	13,20
9/1	2695	+	7,99	13,50
10/1	2694	-	1,09	14,30
11/1	2692	+	9,94	13,60
12/1	2697	-	1,33	13,20
13/фон(Clavibacte	фон	фон	1,00	0,98
14/фон(Clavibacte	фон	фон	1,00	1,02

\*Нормированные значения  
87,00\* 59,00\*

Примечание:

Таблица 1

Результаты анализа образцов картофеля на наличие возбудителя *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* в Республике Карелия, 2011–2013 гг.

Районы Республики Карелия	Обследованная площадь, га			Количество образцов, шт.			Доля образцов, зараженных возбудителем <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> , %		
	2011 г.	2012 г.	2013 г.	2011 г.	2012 г.	2013 г.	2011 г.	2012 г.	2013 г.
Олонецкий	247,8	131	41	131	62	83	20,6	72,5	25,3
Прионежский	27,1	48	13,4	13	17	33	0	64,7	30,3
Медвежьегорский	40,2	10,2	54	53	17	20	0	23,5	90,0
Кондопожский	0,16	-	0,13	3	-	5	0	-	20,0
Пудожский	-	0,08	-	-	3	-	-	0	-
Суоярвский	-	1	0,16	-	1	5	-	0	20,0
г. Костомукша	-	1,1	-	-	19	-	-	10,5	-
Сортавальский	-	-	86,9	-	-	30	-	-	26,6
Сеgezский	-	-	0,34	-	-	12	-	-	0
Пряжинский	-	-	0,32	-	-	17	-	-	41,1
<b>Итого:</b>	<b>315,3</b>	<b>191,5</b>	<b>196</b>	<b>200</b>	<b>119</b>	<b>205</b>	<b>13,5</b>	<b>52,1</b>	<b>32,1</b>

собным привести к потерям урожая до 45% (Евстратова, 2006; Лазарев, Борисова, 2010) как при производстве, так и во время хранения.

Учитывая изменения в перечне карантинных объектов и внесение возбудителя кольцевой гнили картофеля в III список регулируемых некарантинных вредных организмов на территории РФ (Приказ, 2014), необходимо информировать население о наличии данного патогена на территории Республики Карелия и Архангельской области, знакомить производителей картофеля с симптоматикой данного заболевания, а также вести пропаганду недопустимости распространения картофеля в другие регионы, более благоприятные по погодным условиям для

массового развития бактериальной кольцевой гнили.

#### Литература

1. Евстратова Л.П. Атлас болезней и вредителей картофеля: учеб. пособие / Л.П. Евстратова, Е.В. Николаева, В.Н. Пермякова — Петрозаводск: Изд-во ПетрГУ, 2006. 214 с.

2. Карелия официальная. Официальный портал органов государственной власти Республики Карелия [Электронный ресурс] / Министерство сельского, рыбного и охотничьего хозяйства Республики Карелия. Отчет Министерства сельского, рыбного и охотничьего хозяйства Республики Карелия за 2012 год. [http://www.gov.karelia.ru/gov/Power/Ministry/Agriculture/Docs/otchet\\_2012.pdf](http://www.gov.karelia.ru/gov/Power/Ministry/Agriculture/Docs/otchet_2012.pdf).

3. Лазарев А.М., Борисова Т.П. Бактериальные болезни картофеля: профилактики и меры борьбы / А.М. Лазарев // Сельскохозяйственные вести. С.-Петербург, 2010. № 4. С. 48–50.

4. Методические указания по локализации и ликвидации бактериальной кольцевой гнили картофеля *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* / В.И. Калач и др. РУП Научно-практический центр НАН Белоруссии по картофелеводству и плодоовощеводству. — Самохваловичи, 2010. 12 с.

5. Приказ Министерства сельского хозяйства РФ от 15 декабря 2014 г. № 501 «Об утверждении перечня карантинных объектов».

6. СТО ВНИИКР 4.009–2013 Возбудитель бурой бактериальной гнили картофеля *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Методы выявления и идентификации. М., ФГБУ «ВНИИКР», 2013.

Таблица 2  
Результаты анализа образцов картофеля на наличие возбудителя *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* в Архангельской области, 2012–2013 гг.

Районы Архангельской области	Обследованная площадь, га		Количество образцов, шт.		Доля образцов, зараженных возбудителем <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> , %	
	2012 г.	2013 г.	2012 г.	2013 г.	2012 г.	2013 г.
Шенкурский	40	15	19	3	63,1	100
Котласский	33	44,8	17	17	94,1	35,2
Устьянский	5,2	1,3	3	20	33,3	15,0
Холмогорский	53	37,1	16	7	31,2	42,8
Верхнетоемский	13,69	12,65	8	8	62,5	50,0
Плесецкий	14,2	-	12	-	50,0	-
Вельский	20,3	88,56	6	17	50,0	82,3
Приморский	-	8	-	3	-	66,6
Каргопольский	-	26,77	-	17	-	41,1
Няндомский	-	1,1	-	13	-	30,7
<b>Итого:</b>	<b>179,39</b>	<b>235</b>	<b>81</b>	<b>105</b>	<b>59,2</b>	<b>43,8</b>

# RING ROT OF POTATO IS A HIDDEN THREAT TO HARVEST

Denis F. Zinnikov, Director of FGBU VNIKR's Karelian Branch

Olga V. Sinkevich, Petrozavodsk State University

Протокол №1 30авг2013

Оператор: Синкевич О.В.  
SN\_D3V213

## Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus

Пробирка	Образец	Результат	Специфика	БК
1/1	K+	+	10,60	9,59
2/1	K-	-	1,08	9,88
3/1	2681	-	1,11	14,70
4/1	2680	-	1,08	14,80
5/1	2699	-	1,08	14,90
6/1	2698	+	7,83	15,00
7/1	2696	+	7,48	12,80
8/1	2693	+	8,71	13,20
9/1	2695	+	7,99	13,50
10/1	2694	-	1,09	14,30
11/1	2692	+	9,94	13,60
12/1	2697	-	1,33	13,20
13/фон(Clavibacte	фон	фон	1,00	0,98
14/фон(Clavibacte	фон	фон	1,00	1,02

\*Нормированные значения  
Примечание:

Test report for 10 potato samples analyzed using FLASH-PCR

Note: «K+» and «K-» – control samples.

Result «+» – presence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in the sample.

Result «-» – absence of the pathogen in the sample.

The value and popularity of the potato has long been unquestionable. However, Karelian large agricultural producers have virtually refused to grow this crop; 96% of potatoes are harvested at smallholdings and privately owned farms (Karelia, 2012).

Mass distribution and development of potato diseases is caused by poor agricultural practices (potatoes are cultivated in monoculture, farm-saved seeds including ware potatoes are used for planting). Tubers are frequently latently infected which is caused by weather

conditions and partial resistance of cultivars and low virulence of some pathogen lines. The disease spreads due to transportation and planting of latently infected tubers, among other things.

In 2011–2013, potato crops planted in the Republic of Karelia were surveyed for brown (*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.) and ring (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Spieckermann and Kot-

thoff) Smith)) rots of potato. In 2012–2013, Arkhangelsk region was also surveyed. Samples were taken and tests performed from late July till the end of August. Tubers and plant basal stems were taken for analyses.

Detection and identification of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers was conducted in accordance with VNIKR Technical Standard

**Table 1**  
Results of testing potato samples for *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in the Republic of Karelia in 2011–2013

Regions in the Republic of Karelia	Surveyed area, ha			Number of samples			Proportion of samples infected with <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> , %		
	2011	2012	2013	2011	2012	2013	2011	2012	2013
Olonets	247.8	131	41	131	62	83	20.6	72.5	25.3
Prionezhsky	27.1	48	13.4	13	17	33	0	64.7	30.3
Medvezhgorye	40.2	10.2	54	53	17	20	0	23.5	90.0
Kondopoga	0.16	-	0.13	3	-	5	0	-	20.0
Pudozh	-	0.08	-	-	3	-	-	0	-
Suoyarvi	-	1	0.16	-	1	5	-	0	20.0
Town of Kostomuksha	-	1.1	-	-	19	-	-	10.5	-
Sortavala	-	-	86.9	-	-	30	-	-	26.6
Segezha	-	-	0.34	-	-	12	-	-	0
Pryazha	-	-	0.32	-	-	17	-	-	41.1
<i>Total:</i>	315.3	191.5	196	200	119	205	13.5	52.1	32.1

4.009–2013 “Brown Rot of Potato *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Detection and Identification Methods” (2013).

For detecting pathogens of bacterial rots at the Laboratory of FGBU VNIKR’s Karelian Branch, FLASH-

plots were included into the survey which enabled to record the considerable spread of the disease in Karelia. The largest amount of infected samples was detected in potato lots from Sortavala and Olonets regions situated in the southern part of Karelia. The

Plesetsk, Primorsky and Kargopol districts.

It should be taken into account that when potato tubers were visually examined, no disease symptoms were observed, i.e. the pathogen was present in a latent stage.

The ability to be present in symptomless potato tubers and stems makes ring rot a hazardous disease that can lead to yield drops by 45% (Evstratova, 2006; Lazarev, Borisova, 2010) both during production and storage.

Taking into consideration changes introduced into the List of quarantine pests and addition of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* into the Russian list of regulated non-quarantine pests (Order, 2014), the public should be informed on the occurrence of this pathogen in the Republic of Karelia and Arkhangelsk region, and potato producers should become familiar with the symptoms of this disease. The information campaign should be started explaining the unacceptability of moving potatoes to other regions with weather conditions more favorable for the massive development of bacterial ring rot.

PCR was used (see the Figure). For confirming the results, immunofluorescence staining was performed.

During the surveys, brown rot of potato was not found in Karelia and Arkhangelsk region. However, the ring rot pathogen was reported. This bacterium is quarantine for the Republic of Belarus and on the EPPA A2 List of pests (VNIKR Technical Standard, 2013).

In 2011, the survey was performed in four regions of the Republic. Ring rot of potato was detected in 20.6% of samples from Olonets region. In 2012–2013, privately owned potato

pathogen was not detected in samples from Segezha and Pudozh regions (the northern part of Karelia).

The survey of Arkhangelsk region showed the presence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in all surveyed districts. Out of 81 samples tested in 2012, the pathogen was found in 48 samples which amounted to 59.2%. In 2013, out of 105 samples 46 were tested positive which amounted to 43.8%. The pathogen was unevenly detected throughout Arkhangelsk region. Most frequently (over 35% of cases) it was found in samples from Shenkursk, Kotlas, Verkhnya Toima, Velsk,

**Table 2**  
Results of testing potato samples for *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in Arkhangelsk region in 2012–2013

Districts in Arkhangelsk region	Surveyed area, ha		Number of samples		Proportion of samples infected with <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> , %	
	2012	2013	2012	2013	2012	2013
Shenkursk	40	15	19	3	63.1	100
Kotlas	33	44.8	17	17	94.1	35.2
Ustyansky	5.2	1.3	3	20	33.3	15.0
Kholmogory	53	37.1	16	7	31.2	42.8
Verkhnya Toima	13.69	12.65	8	8	62.5	50.0
Plesetsk	14.2	-	12	-	50.0	-
Velsk	20.3	88.56	6	17	50.0	82.3
Primorsky	-	8	-	3	-	66.6
Kargopol	-	26.77	-	17	-	41.1
Nuandoma	-	1.1	-	13	-	30.7
<i>Total:</i>	179.39	235	81	105	59.2	43.8

#### References

1. Evstratova L.P. Atlas of Potato Diseases and Pests: Study Guide / L.P. Evstratova, E.V. Nikolaeva, V.N. Permyakova—Petrozavodsk: PetrGU Publishing House, 2006. 214 pp.
2. The 2012 Report of the Karelian Ministry of Agriculture, Fisheries and Wildlife. The official web-site of the Ministry: [http://www.gov.karelia.ru/gov/Power/Ministry/Agriculture/Docs/otchet\\_2012.pdf](http://www.gov.karelia.ru/gov/Power/Ministry/Agriculture/Docs/otchet_2012.pdf).
3. Lazarev A.M., Borisova T.P. Bacterial disease of potato: preventive and control measures / A.M. Lazarev // Agricultural News. Saint-Petersburg, 2010. № 4. P. 48–50.

4. Guidelines for Containment and Eradication of Bacterial Ring Rot *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* / V.I. Kalach et al. Research and Practical Center for Potato, Fruit and Vegetable Farming of the Academy of Sciences of the Republic of Belarus. – Samokhvalovich, 2010. 12 pp.

5. Order № 501 of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation dated 15 December 2014 “On Approval of the List of Pests”.

6. VNIKR Technical Standard 4.009–2013 “Brown Rot of Potato *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Detection and Identification Methods. M., FGBU VNIKR, 2013.

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ, вредоносность и распространение кокцид (Coccoidea)

И.О. Камаев, начальник научно-экспериментального отдела ФГБУ «ВНИИКР»

Н.А. Гура, старший научный сотрудник научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР»

А.В. Шипулин, младший научный сотрудник научно-экспериментального отдела ФГБУ «ВНИИКР»

Кокциды, или червецы и щитовки (Coccoidea), насчитывают около 7 800 видов из 49 семейств (ScaleNet), относятся к группе сосущих насекомых, питающихся соками растений. Среди представителей Coccoidea встречаются вредители важнейших сельскохозяйственных культур, некоторые из которых, как например тутовая (*Pseudaulacaspis pentagona*) и калифорнийская (*Quadraspidiotus perniciosus*) щитовки, имеют карантинное значение для многих стран (рис. 1 и 2).

Перед специалистами в области карантина и защиты растений стоит важная задача по своевременному выявлению вредоносных видов кокцид, что, в свою очередь, требует их точной идентификации. Последняя основана на морфологических признаках червецов и щитовок, которые, однако, могут быть определены лишь на стадии имаго самок. Самцы короткоживущие, в значительной мере хуже изучены и легко повреждаются на липком клейевом слое феромонных ловушек, с помощью которых эти

насекомые могут быть выявлены. Все это ограничивает применение диагностики червецов и щитовок на стадии личинок разного возраста.

Необходимость разработки точных методов идентификации кокцид становится еще более актуальной в связи с расширением списка карантинных вредных организмов для территории России и стран Таможенного союза. Решение данной проблемы возможно с помощью применения молекулярно-генетических методов.

В настоящее время активно развиваются филогенетические исследования щитовок и червецов на базе молекулярно-генетических признаков, в их основу положены последовательности фрагментов митохондриального и ядерного генома (Morse & Normark, 2006; Andersen et al., 2010; Sethusa et al., 2014 и др.). Кроме того, проведены исследования в области цитогенетики и кариосистематики кокцид Палеарктики (Гаврилов, 2005). Преимущество молекулярно-генетического подхода заключается в том, что он позволяет проводить



Fig. 1. San Jose Scale *Quadraspidiotus perniciosus* (photo by N.A. Gura)

Рис. 1. Калифорнийская щитовка *Quadraspidiotus perniciosus* (фото Н.А. Гура)

идентификацию любых жизненных стадий организма. Ранее уже приводился пример возможной молекулярно-генетической идентификации трех видов червецов по двум участкам генома (Копина и др., 2013).

Данная работа посвящена молекулярно-генетическому исследованию и обзору данных по вредоносности, распространению 14 таксонов видового уровня червецов и щитовок, относящихся к 4 семействам.

Таблица 1  
Краткая характеристика исследуемого материала

Вид	Информация о материале (место и время сбора, объект, сборщик)	№ образца
<b>Семейство Diaspididae</b>		
Подсемейство Aspidiotinae		
Калифорнийская щитовка <i>Quadraspidiotus perniciosus</i> Comstock, 1881	персик, Грузия, июнь 2014 г., Матяшова Г.Н.	SK02
	яблоко, 2013 г., Гура Н.А.	SK09
	яблоко, Белгородская обл., сентябрь 2014 г., Коваленко Я.Н.	SK12, 13, 19
Красная померанцевая щитовка <i>Aonidiella aurantii</i> (Maskell, 1879)	мандарин, Пакистан, февраль 2014 г., Камаев И.О.	SP02
Желтая померанцевая щитовка <i>Aonidiella citrina</i> (Craw, 1980)	авокадо, продуктовый рынок, Москва, ноябрь 2014 г., Камаев И.О.	SPC01, 02
Олеандровая щитовка <i>Aspidiotus nerii</i> Bouche, 1833	культура ФГБУ «ВНИИКР», июль 2014 г., Гура Н.А.	SM00, 01
Цитрусовая фиолетовая щитовка <i>Parlatoria pergandii</i> Comstock, 1881	апельсин, экспертиза, май 2014 г., Буш М.Г.	SO02
Подсемейство Diaspidinae		
Тутовая щитовка <i>Pseudaulacaspis pentagona</i> (Targioni Tozzetti, 1886)	киви, экспертиза, май 2014 г., Буш М.Г.	ST07, 148, 151
Ивовая щитовка <i>Chionaspis salicis</i> (Linnaeus, 1758)	черника, территория ФГБУ «ВНИИКР», окр. Быково, Московская область, июль 2014 г., Гура Н.А.	SS00,04
Яблоневая запятовидная щитовка <i>Lepidosaphes ulmi</i> (Linnaeus, 1758)	яблоня, август 2014 г., Гура Н.А.	SZ04
Бересклетовая щитовка <i>Unaspis euonymi</i> (Comstock, 1881)	декоративное растение, экспертиза, июнь 2014 г., Ершова Н.И.	SN01
	коллекция, сборы 2013 г., Гура Н.А.	LB01, 02
<b>Семейство Coccidae</b>		
Ложнощитовка мягкая <i>Coccus hesperidum</i> Linnaeus, 1758	культура ФГБУ «ВНИИКР», июль 2014 г., Гура Н.А.	SLM03
Восковая ложнощитовка <i>Ceroplastes</i> sp.	лавр, окр. пос. Никита, Крым, август 2014 г., Камаев И.О.	SLV01
<b>Семейство Pseudococcidae</b>		
Червец цитрусовый <i>Planococcus citri</i> Risso, 1813	культура ФГБУ «ВНИИКР», июль 2014 г., Гура Н.А.	SCC01
Щетинистый червец <i>Pseudococcus longispinus</i> (Targioni Tozzetti, 1867)	культура ФГБУ «ВНИИКР», июль 2014 г., Гура Н.А.	SCS01
<b>Семейство Margarodidae</b>		
Гигантские червецы Margarodidae	<i>Prunus</i> sp., Карши, Узбекистан, 2014 г., Коваленко Я.Н.	SCN01

### Исследуемый материал

Материалом для настоящей работы послужили образцы, отобранные для экспертизы, сборы авторов и коллег — специалистов ФГБУ «ВНИИКР», а также коллекционные образцы и особи из культуры червецов ФГБУ «ВНИИКР» (табл. 1). Идентификацию подавляющего большинства видов червецов и щитовок выполнила старший научный сотрудник научно-методического отдела энтомологии Н.А. Гура.



Fig. 2. A kiwi fruit damaged by the white peach scale *Pseudaulacaspis pentagona* (photo by N.A. Gura)

### Вредоносность и распространение исследуемых видов *Coccoidea*

Данный раздел базируется на сведениях, представленных в работах Н.С. Борхсениуса (1966), Е.М. Данциг (1993), D. Miller & J. Davidson (2005), базах данных ScaleNet (<http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm>), ЕОКЗР — PQR (<https://www.erro.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>) и СABI (<http://www.cabi.org>).

### Семейство Diaspididae

#### Подсемейство Aspidiotinae

Калифорнийская щитовка (*Quadraspidiotus perniciosus*)<sup>1</sup> поражает более 270 видов растений из 75 родов, относящихся к 45 семействам (ScaleNet). Предпочитает представителей семейства розоцветные. У плодовых деревьев данный вид вызывает растрескивание и отмирание коры, преждевременное опадание листьев, уменьшение прироста, искривление и засыхание побегов, измельчание и деформацию плодов. На плодах и молодых побегах в местах прикрепления калифорнийской щитовки появляются характерные красные (антоциановые) пятна (рис. 1). Вид является космополитическим, имеет статус карантинного организма в России и странах Азиатской и Тихоокеанского комиссии по карантин-

<sup>1</sup> Следует отметить, что по общепринятому мнению виды рода *Quadraspidiotus* MacGillivray, 1921 рассматриваются в составе рода *Diaspidiotus* Berlese, 1896 из-за отсутствия четкого понимания границ данных таксонов и их объема (Данциг, 1993; Miller, Davidson, 2005); в последнее время калифорнийская щитовка также рассматривается как вид самостоятельного рода *Comstockaspis* MacGillivray, 1921 (ScaleNet). В настоящей работе используется устоявшееся в отечественной практике карантина растений латинское название калифорнийской щитовки — *Quadraspidiotus perniciosus*.

Рис. 2. Плод киви, пораженный туповой щитовкой *Pseudaulacaspis pentagona* (фото Н.А. Гура)

ну и защите растений, Европейской и Средиземноморской организации по карантину и защите растений, Тихоокеанской организации по защите растений, в Африке, Израиле, Иордании, Казахстане, Узбекистане и др. (по данным PQR). На территории России щитовка отмечена на юге Дальнего Востока, включая о-в Сахалин, Курильские о-ва, в Иркутской обл. и Бурятии, на юге европейской части и Северном Кавказе (Данциг, 1993; ScaleNet).

Красная померанцевая щитовка (*Aonidiella aurantii*, рис. 3) — полифаг, отмеченный на представителях 260 родов из 88 семейств растений (ScaleNet). Ареал красной померанцевой щитовки охватывает почти всю зону выращивания цитрусовых,

Рис. 3. Красная померанцевая щитовка *Aonidiella aurantii* (фото Н.А. Гура)



Fig. 3. Red scale *Aonidiella aurantii* (photo by N.A. Gura)

которым и наносит основной вред. На территории России красная померанцевая щитовка отсутствует, т.к. не акклиматизируется в Закавказье (Данциг, 1993).

Желтая померанцевая щитовка (*Aonidiella citrina*, рис. 4) поражает растения 28 родов из 27 семейств (ScaleNet). Наносит серьезный вред цитрусовым, вызывая засыхание и опадение листьев и плодов. Космополит. Вид отмечен в регионе Черноморского побережья Грузии, оранжереях Армении и Украины (Данциг, 1993).

Олеандровая, или плющевая щитовка (*Aspidiotus nerii*, рис. 5) — полифаг, отмеченный на растениях более чем 500 родов из 124 семейств (ScaleNet), среди которых олеандр, пальмы, орхидеи, виноград, цитрусовые, персик, груша, сандаловое и оливковое деревья (Miller, Davidson, 2005). Высасывая из кормовых культур клеточный сок, спо-

Таблица 2

Исследуемые фрагменты генома и праймерные системы

Участок гена	Праймеры	Последовательность праймера (5'-3')	Размер продукта, п.о.	Источник
EF1α	EF1a	GATGCTCCGGGACAYAGA	~1150	Morse & Normark, 2006
	EF2	ATGTGAGCGGTGTGGCAATCCAA		
28s	s3660	GAGAGTTMAASAGTACGTGAAAC	~800	Morse & Normark, 2006
	28b	TCGGAAGGAACCAGCTACTA		
18s	2660	CTGGTTGATCCTGCCAGTAG	~700	Sethusa et al., 2014
	18s-B	CCGCGGCTGCTGGCACCAGA		

собствует уменьшению их роста, вызывает опадение листьев, деформацию плодов и снижение содержания масел у оливковых деревьев. При поражении плодов лимона образуются зеленые пятна. В оранжерейных условиях развивается в трех поколениях. Космополит, отмечена на Черноморском побережье России (Данциг, 1993).

Цитрусовая фиолетовая щитовка (*Parlatoria pergandii*, рис. 6) повреждает около 60 родов растений из 36 семейств (ScaleNet), основной вред наносит цитрусовым и субтропическим культурам: лавру благородному, чайному кусту, камелии и др. Вид преимущественно распространен в странах со средиземноморским типом климата Евразии, в России отмечен на Черноморском побережье Краснодарского края (Данциг, 1993).

#### Подсемейство Diaspidinae

Туповая щитовка (*Pseudaulacaspis pentagona*, рис. 2, 7) отличается высо-

кой вредоносностью, повреждая растения из примерно 270 родов, относящихся к 90 семействам (ScaleNet). Предпочитаемыми кормовыми культурами являются шелковица, смородина, ежевика, малина, виноград, персики, абрикосы, слива, сирень, олеандр, ясень, актинидия и др. Космополит. Имеет статус карантинного объекта для Российской Федерации, Республики Беларусь, Казахстана, Турции, Чили (по данным PQR). Щитовка завезена на Черноморское побережье Грузии, достоверных указаний о находках вида на территории России нет (Данциг, 1993).

Ивовая щитовка (*Chionaspis salicis*, рис. 8) — полифаг, отмеченный на растениях 72 родов из 26 семейств, в основном деревьях и кустарниках (ScaleNet). Основным кормовым растением является ива. Из ягодных культур серьезно вредит смородине, чернике, голубике, из декоративных — клену, сирени, розе, рябине, жасмину и др. Побеги покрываются сплошным слоем щитков вредителя, что приводит к усыханию растений и резкому снижению урожая. Отмечена в Северной Америке, Северной Африке, широко распространена на

территории Евразии, включая Россию (Данциг, 1993; Miller, Davidson, 2005).

Яблоневая запятовидная щитовка (*Lepidosaphes ulmi*, рис. 9) наносит серьезный вред яблоне в зонах плодородия России. Этот вид также повреждает грушу, сливу, персик, абрикос, смородину, шелковицу, из декоративных и лесных — ясень, клен, березу, дуб, боярышник, сирень, розу. Яблоневая запятовидная щитовка отмечена на более чем 200 родах растений-хозяев из 73 семейств (ScaleNet). Снижает вегетацию, приводит к опадению листьев, усыханию ветвей и целых деревьев. Вид имеет космополитическое распространение (Данциг, 1993).

Бересклетовая щитовка (*Unaspis euonymi*, рис. 10) — полифаг, отмеченный на растениях из 25 родов из 20 семейств (ScaleNet). Наиболее серьезные повреждения наносит бересклету, широко используемому в декоративном садоводстве. Вредоносность щитовки проявляется в образовании сначала светло-желтых пятен на листьях, затем происходит полное обесцвечивание листовых пластин, наблюдается усыхание по-

Таблица 3

Температурно-временные условия для проведения ПЦР с исследуемыми праймерными системами

Этап	EF1a/EF2		s3660/28b		2660/18s-B		Количество циклов
	Температура, °C	Время	Температура, °C	Время	Температура, °C	Время	
Преденатурация	95	10 мин	95	10 мин	95	5 мин	1
Денатурация	95	30 с	95	30 с	95	30 с	
Отжиг праймеров*	61	30 с	54	30 с	61	1 мин	35
Элонгация	72	2 мин	72	2 мин	72	2 мин	
Финальная элонгация	72	2 мин	72	2 мин	-	-	1

Примечание: \* — температуру отжига праймеров определяли эмпирически.



бегов и ветвей, сильное угнетение и гибель растений. На листьях до 90% преобладают самцы, на ветках и стволах, наоборот, основную часть колонии составляют самки. Космополит, происхождение — Юго-Восточная Азия (Miller, Davidson, 2005). Вид завезен в Крым и на Черноморское побережье Краснодарского края (Данциг, 1993).

#### Семейство Coccidae

Ложнощитовка мягкая (*Coccus hesperidum*, рис. 11). Широкий полифаг, питающийся на представителях свыше 500 родов растений из более чем 130 семейств (ScaleNet), предпочитающий тропические и субтропические культуры закрытого грунта, комнатные растения. Предпочитает заселять верхнюю сторону листьев, располагаясь вдоль жилок. Мягкая ложнощитовка обильно выделяет медвяную росу, способствуя развитию сажистого грибка, что снижает декоративную ценность растений. В открытом грунте вид распространен в регионах со средиземноморским типом климата. Космополит.

Японская восковая ложнощитовка (*Ceroplastes japonicus*, рис. 12) является полифагом, трофический спектр которого представлен более 100 видами растений, относящихся к 26 семействам (Борхсениус, 1966; ScaleNet). Из субтропических

**Необходимо отметить, что на результаты молекулярно-генетических исследований также влияет качество самого материала (лучше всего использовать свежий или замороженный, вполне пригоден высушенный) и его количество.**

культур ложнощитовка повреждает многие цитрусовые, хурму, инжир, гранат, яблоню, сливу, грушу, персик, абрикос, вишню, черешню, айву, шелковицу, боярышник, барбарис, самшит, бересклет, плющ, олеандр, платан, иву, вяз и др. Вызывает снижение роста и урожайности, опадение листьев и гибель молодых растений. На листьях часто образуется черный налет из-за развития грибов рода *Carpodium* на богатых сахарами выделениях ложнощитовок, что приводит к снижению фотосинтетической активности листьев и эстетической привлекательности декоративных растений (Яснош, 1952; Ширяева, 2000). Палеарктический

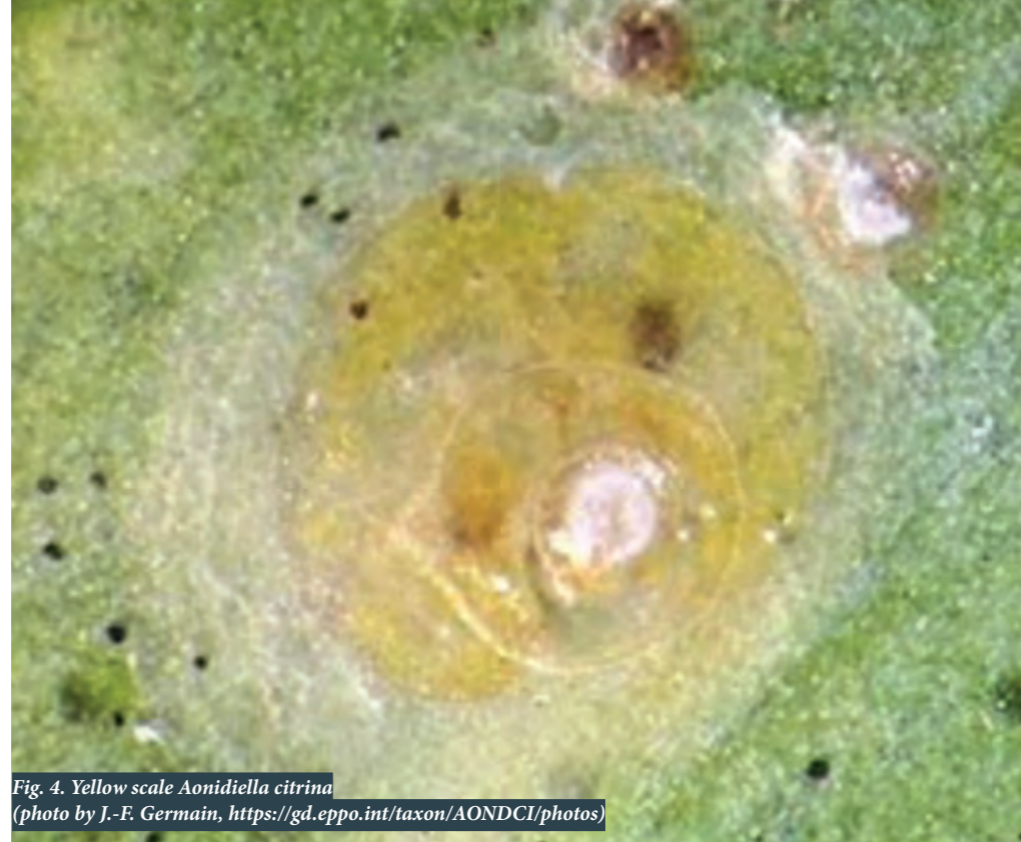


Fig. 4. Yellow scale *Aonidiella citrina* (photo by J.-F. Germain, <https://gd.eppo.int/taxon/AONDCI/photos>)

Рис. 4. Желтая померанцевая щитовка *Aonidiella citrina* (фото J.-F. Germain, <https://gd.eppo.int/taxon/AONDCI/photos>)

вид, выявленный на территории Европы, Турции, Кавказа, Китая, Кореи и Японии (ScaleNet).

#### Семейство Pseudococcidae

Цитрусовый, или виноградный мучнистый червец (*Planococcus citri*, рис. 13) — полифаг, отмеченный на 242 родах растений из 89 семейств

(ScaleNet). Повреждает все наземные части оранжерейных и комнатных культур, в южных широтах — также растений открытого грунта. Наиболее часто встречается на винограде, цитрусовых, плодовых и субтропических культурах. Приводит к усыханию листьев и увяданию плодов. Космополит (<http://www.cabi.org>).

Щетинистый мучнистый червец рода *Carpodium* на богатых сахарами выделениях ложнощитовок, что приводит к снижению фотосинтетической активности листьев и эстетической привлекательности декоративных растений (Яснош, 1952; Ширяева, 2000). Палеарктический

говники. В результате повреждений, наносимых червецом, листья становятся бурными, засыхают и опадают. Космополит (<http://www.cabi.org>), в открытом грунте в основном распространен в тропических и субтропических районах.

#### Молекулярно-генетические методы исследования

Материал отбирали с помощью обработанных 96% этанолом энтомологических игл в лабораторных условиях, при этом для каждой особи использовали одну пару игл. У щитовок тело отделяли от щитка и в дальнейшем выделение ДНК проводили только из него в отличие от представителей остальных семейств, которых сразу же помещали в стерильные пробирки.

Выделение ДНК из исследуемого материала проводили методом обработки образца протеиназой K, с последующим удалением белков без экстракции органическими растворителями. Использовали набор серии «ДНК-Экстрен-2», кат. № НГ-511-100 (ЗАО «Синтол», Москва).

Целевые участки ДНК и праймерные системы. По литературным данным, были выбраны праймерные системы, представленные в табл. 2, для фрагментов трех ядерных генов: фактор элонгации один альфа (EF1α) и два рибосомальных гена (28s и 18s).

Постановка ПЦР. ПЦР-амплифи-

Таблица 4

Сравнение последовательностей EF1α исследуемых видов Coccoidea с базой данных NCBI

Исследуемый вид	№ образца	Идентификация по BLAST NCBI	Идентичность, %	Покрытие, %
<b>Семейство Diaspididae</b>				
<b>Подсемейство Aspidiotinae</b>				
<i>Quadraspidiotus perniciosus</i>	SK02	<i>Diaspidiotus</i> sp.	90	100
	SK09		91	97
	SK12		90	100
	SK13		91	100
	SK19		90	98
<i>Aonidiella aurantii</i>	SP02	<i>Aonidiella aurantii</i>	98	98
<i>Aonidiella citrina</i>	SPC01	<i>Aonidiella citrina</i>	98	100
	SPC02			
<i>Aspidiotus nerii</i>	SM00	<i>Aspidiotus nerii</i>	100	100
	SM01		99	97
<i>Parlatoria pergandii</i>	SO02	<i>Parlatoria pergandii</i>	100	87
<b>Подсемейство Diaspidinae</b>				
<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	ST07	<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	99	94
	ST148		100	100
	ST151		100	100
<i>Chionaspis salicis</i>	SS04	<i>Chionaspis salicis</i>	99	99
<i>Lepidosaphes ulmi</i>	SZ04	<i>Lepidosaphes ulmi</i>	100	89
<i>Unaspis euonymi</i>	SN01	<i>Unaspis euonymi</i>	99	86
<b>Семейство Pseudococcidae</b>				
<i>Planococcus citri</i>	SCC01	<i>Planococcus citri</i>	100	100
<i>Pseudococcus longispinus</i>	SCS01	<i>Pseudococcus longispinus</i>	99	84

**Преимущество молекулярно-генетического подхода заключается в том, что он позволяет проводить идентификацию любых жизненных стадий организма.**

кацию проводили в термоциклере Veriti™ (Applied Biosystems, США). Состав реакционной смеси: 5 мкл готовой смеси для ПЦР 5X ScreenMix-HS (ЗАО «Евроген», Россия), 1 мкл каждого праймера (по 10 пМ), 2 мкл ДНК (с концентрацией 2-100 нг/мкл).

Условия ПЦР для каждой исследуемой праймерной системы представлены в табл. 3.

Секвенирование осуществлялось по общепринятой методике на секвенаторе Genetic Analyzer AB-3500 (Applied Biosystems, США).

Первичное сравнение полученных последовательностей с базой данных ГенБанка проводилось с по-

мощью интернет-ресурса NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Проверка, выравнивание и редактирование последовательностей выполнены в редакторе «BioEdit v.7.0.5.3».

Попарные генетические расстояния между последовательностями определены по двухпараметрической модели Кимуры. Построение дендрограмм проводили с использованием метода максимального правдоподобия, реализованного в пакете программ MEGA 6.0. Статистическое подтверждение корректности дендрограмм рассчитывали с помощью бутстреп-анализа («bootstrap») путем построения 500 альтернатив-

ных деревьев и дается в процентах от исходного значения. Доступные в Генбанке гомологичные исследуемым генам последовательности ДНК проанализированы вместе со вновь секвенированными последовательностями.

#### Результаты исследования

Исследования возможности использования молекулярно-генетических методов для идентификации предшествовало несколько этапов:

- морфологическая идентификация червцов и щитовок (использовали только достоверно определенный материал);

- после выделения ДНК и постановки ПЦР с исследуемыми праймерами полученный продукт секвенировали, последовательность искомого фрагмента гена сравнива-

Таблица 5  
Сравнение последовательностей 28s RNA исследуемых видов надсемейства Coccoidea с базой данных NCBI

Исследуемый вид	№ образца	Идентификация по BLAST NCBI	Идентичность, %	Покрытие, %
<b>Семейство Diaspididae</b>				
Подсемейство Aspidiotinae				
<i>Quadraspidiotus perniciosus</i>	SK12	<i>Diaspidiotus</i> sp.	98	100
	SK13			
	SK19			
<i>Aonidiella aurantii</i>	SP02	<i>Aonidiella aurantii</i>	93	99
<i>Aonidiella citrina</i>	SPC01	<i>Aonidiella</i> sp.	98	100
<i>Aspidiotus nerii</i>	SM00	<i>Aspidiotus nerii</i>	100	100
	SM01		100	100
<i>Parlatoria pergandii</i>	SO02	<i>Parlatoria pergandii</i>	100	94
Подсемейство Diaspidinae				
<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	ST07	<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	98	100
	ST151		99	96
<i>Chionaspis salicis</i>	SS00	<i>Chionaspis salicis</i>	99	100
	SS04		97	99
<i>Lepidosaphes ulmi</i>	SZ04	отсутствует в базе данных	-	-
<i>Unaspis euonymi</i>	LB01	<i>Unaspis euonymi</i>	100	94
	LB02		100	94
<b>Семейство Coccidae</b>				
<i>Ceroplastes</i> sp.	SLJ01	<i>Ceroplastes</i> sp.	97	100
	SLV01		97	100
<i>Coccus hesperidum</i>	SLM03	<i>Coccus hesperidum</i>	100	100
<b>Семейство Pseudococcidae</b>				
<i>Planococcus citri</i>	SCC01	<i>Planococcus citri</i>	100	95
<i>Pseudococcus longispinus</i>	SCS01	<i>Pseudococcus longispinus</i>	100	94
<b>Семейство Margarodidae</b>				
Margarodidae	SCN01	Monophlebinae	84	73

ли с базой данных ГенБанка (NCBI). На этом этапе из анализа исключался материал, пораженный грибными организмами или паразитоидами. В нашем исследовании продукты ПЦР для грибов, поражающих тела Coccoidea, как правило, имели меньший размер по сравнению с таковым для щитовок.

Необходимо отметить, что на результаты молекулярно-генетических исследований также влияет качество самого материала (лучше всего использовать свежий или замороженный, вполне пригоден высушенный)

и его количество. В последнем случае возможно получить последовательность искомого фрагмента гена из одной особи (в случае щитовок используют только тело насекомого, без щитка) с концентрацией ДНК в растворе после выделения, равной 1 нг/мл.

Исследуемые ядерные гены широко используются для молекулярно-генетических исследований насекомых. Фрагмент каждого гена анализировали на предмет возможного использования в диагностике видов червецов и щитовок.

#### Фрагмент гена, кодирующего фактор элонгации один альфа (*EF1α*)

Кодирует белок фактора элонгации один альфа, отвечающего за обеспечение доставки аминоксил-тРНК в рибосому при биосинтезе белков. Этот высококонсервативный ген используется для филогенетических исследований таксонов низшего ранга для чешуекрылых и других насекомых (NAPS).

В результате проведенной работы были получены последовательности фрагмента гена *EF1α* для 11 видов



Fig. 5. Oleander scale *Aspidiotus nerii* (photo by N.A. Gura)

Рис. 5. Олеандровая, или плющевая щитовка *Aspidiotus nerii* (фото Н.А. Гура)

червецов и щитовок, представленных в табл. 4. Сравнение полученных последовательностей с базой данных NCBI позволила заключить, что исследуемые виды Coccoidea, за исключением калифорнийской щитовки, хорошо идентифицируются по данному фрагменту гена (табл. 4). Следует отметить, что в базе данных ГенБанка имеется значительное число последовательностей по различным видам червецов и щитовок.

В ходе анализа последовательностей фрагмента гена *EF1α* путем построения дендрограммы (рис. 15) было установлено, что исследуемые виды дифференцируются на две крупные группы: первую, состоящую из двух ветвей, образуют представители семейства Pseudococcidae и подсемейства Aspidiotinae, тогда как вторую формируют представители Diaspidinae и *Parlatoria pergandii*. Та-

Рис. 7. Тютювая щитовка *Pseudaulacaspis pentagona* (фото Н.А. Гура)



Fig. 7. White peach scale *Pseudaulacaspis pentagona* (photo by N.A. Gura)

кое разделение, в общих чертах соответствующее таксономическому разграничению видов щитовок на уровне надсемейств, определяется большим числом вариабельных участков последовательности фрагмента гена *EF1α*, обуславливающим заметные различия не только на уровне семейств, но и видов. Следует отметить, что положение в дендрограмме вида *Parlatoria pergandii*, который относят к подсемейству Aspidiotinae (Данциг, 1993), определяется, возможно, сравнительно небольшой выборкой исследованных видов и не совсем ясным филогенетическим родством. В частности, Борхсениус (1966) выделял род *Parlatoria* наряду с другими в отдельное подсемейство Leucaspidae. В то же время согласно современным молекулярным данным род *Parlatoria* филогенетически близок к представителям подсемейства Aspidiotinae, но при этом внутри данного подсемейства рассматриваемый род достаточно обособлен.



Fig. 6. Chaff scale *Parlatoria pergandii* (photo: <http://www.forestryimages.org>)

Рис. 6. Цитрусовая фиолетовая щитовка *Parlatoria pergandii* (фото: <http://www.forestryimages.org>)

Карантинный для России вид тютювая щитовка достаточно хорошо идентифицируется по последовательности фрагмента гена *EF1α* по имеющемуся в базе ГенБанка материалу. Напротив, идентификация калифорнийской щитовки молекулярными методами затрудняется недостатком данных в базе ГенБанка и высоким сходством последовательностей группы видов трибы Aspidiotini.

#### Фрагмент рибосомального гена 28s

Данный ген кодирует рРНК большой субъединицы рибосом, участвующих в биосинтезе белка. Этот ген, наряду с межгенными спейсерами (ITS), используется для молекулярно-генетических исследований двукрылых, перепончатокрылых, клопов и др. (NAPS).

Были получены последовательности фрагмента гена 28s для 14 таксонов видового уровня, которые, за исключением *Lepidosaphes ulmi*, были идентифицированы по базе данных ГенБанка (табл. 5). Виды щитовок и червецов, кроме *Quadraspidiotus perniciosus* и видов рода *Aonidiella* и *Ceroplastes*, достаточно точно идентифицируются до видового уровня по фрагменту гена 28s благодаря большому числу последовательной исследуемого участка ядерного гена в базе данных ГенБанка.

Анализ последовательностей фрагмента гена 28s исследуемых червецов и щитовок путем построения дендрограммы (рис. 16) выявил закономерность в формировании



Fig. 8. Willow scale *Chionaspis salicis* (photo by N.A. Gura)

Рис. 8. Ивовая щитовка *Chionaspis salicis* (фото Н.А. Гура)

групп видов, совпадающих с системой Coccoidea. Все исследованные таксоны видового уровня подразделились на четыре клады с высокой бутстреп-поддержкой (99–100%),

согласно их принадлежности к тому или иному семейству. В свою очередь, представители семейства щитовок подразделяются на две группы, соответствующие двум под-

семействам по системе Е.М. Данциг (1993). В подсемействе Aspidiotinae виды рода *Quadraspidotus*, *Aonidiella* и *Aspidiotus*, относящиеся к трибе Aspidiotina, объединены в одну группу и дифференцируются от *Parlatoria pergandii*, принадлежащего к трибе Parlatoriini. Аналогичным образом классифицируются виды подсемейства Diaspidinae: группа видов рода *Pseudaulacaspis*, *Chionaspis*, *Unaspis*, относящихся к Diaspidini, обособляется от *Lepidosaphes ulmi*, относящегося к трибе Lepidosaphini. Полученные результаты в целом совпадают с молекулярно-генетическими построениями филогении щитовок (Andersen et al., 2010).

Идентификация карантинного вида тутовой щитовки может быть проведена по фрагменту данного гена, в то время как идентификация калифорнийской щитовки, как и в предыдущем случае, затрудняется недостатком данных в базе Ген-

Банка и высоким сходством последовательностей группы видов трибы Aspidiotini.

#### Фрагмент рибосомального гена 18s

Данный ген кодирует рРНК малой субъединицы рибосом. Этот ген также используется для молекулярно-генетических исследований насекомых.

Таблица 7  
Сводная таблица результатов идентификации исследуемых видов Coccoidea

Последовательности гена 18s были получены для 13 таксонов видового уровня кокцид, из них в ГенБанке отсутствовали последовательности для 5 видов (табл. 6). Анализ данных последовательностей путем построения дендрограммы с помощью метода максимального правдоподобия классифицировал исследуемые таксоны видового уровня на группы, согласно их принадлежности к тому или иному семейству (рис. 17). Виды семейства щитовок слабо дифференцировались между собой на два подсемейства, что

связано с высоким сходством последовательностей данных видов (зачастую различия проявлялись в единичных нуклеотидных заменах, рис. 18). При этом необходимо отметить, что данный фрагмент хорошо дифференцирует виды на уровне семейств.

#### Заключение

Результаты исследования последовательностей фрагментов трех генов представителей Coccoidea обобщены в табл. 7. В целом получены последовательности фрагментов трех

Таблица 6  
Сравнение последовательностей 18s RNA исследуемых видов надсемейства Coccoidea с базой данных NCBI

Исследуемый вид	№ образца	Идентификация по BLAST NCBI	Идентичность, %	Покрытие, %
<b>Семейство Diaspididae</b>				
Подсемейство Aspidiotinae				
<i>Quadraspidotus perniciosus</i>	SK06	<i>Quadraspidotus perniciosus</i>	100	86
	SK05	<i>perniciosus</i>	98	99
<i>Aonidiella aurantii</i>	SP02	<i>Aonidiella aurantii</i>	98	100
<i>Aspidiotus nerii</i>	SM01	<i>Aspidiotus nerii</i>	100	97
<i>Parlatoria pergandii</i>	SO02	отсутствует в базе данных	-	-
Подсемейство Diaspidinae				
<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	ST07	<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	99	86
<i>Chionaspis salicis</i>	SS04	отсутствует в базе данных	-	-
<i>Lepidosaphes ulmi</i>	SZ04	отсутствует в базе данных	-	-
<i>Unaspis euonymi</i>	SN01	отсутствует в базе данных	-	-
<b>Семейство Coccidae</b>				
<i>Ceroplastes</i> sp.	SLV01	<i>Ceroplastes</i> sp.	100	99
<i>Coccus hesperidum</i>	SLM03	<i>Coccus hesperidum</i>	99	96
<b>Семейство Pseudococcidae</b>				
<i>Planococcus citri</i>	SCC01	<i>Planococcus citri</i>	100	87
<i>Pseudococcus longispinus</i>	SCS01	<i>Pseudococcus longispinus</i>	99	93
<b>Семейство Margarodidae</b>				
Margarodidae	SCN01	Monophlebinae	98	96

Исследуемый вид	Идентификация по BLAST NCBI		
	<i>EF1α</i>	28s	18s
	<b>Семейство Diaspididae</b>		
Подсемейство Aspidiotinae			
Калифорнийская щитовка <i>Quadraspidotus perniciosus</i>	<i>Diaspidiotus</i> sp.	<i>Diaspidiotus</i> sp.	<i>Quadraspidotus perniciosus</i>
Красная померанцевая щитовка <i>Aonidiella aurantii</i>	<i>Aonidiella aurantii</i>	<i>Aonidiella aurantii</i>	<i>Aonidiella aurantii</i>
Желтая померанцевая щитовка <i>Aonidiella citrina</i>	<i>Aonidiella citrina</i>	<i>Aonidiella</i> sp.	-
Олеандровая щитовка <i>Aspidiotus nerii</i>	<i>Aspidiotus nerii</i>	<i>Aspidiotus nerii</i>	<i>Aspidiotus nerii</i>
Цитрусовая фиолетовая щитовка <i>Parlatoria pergandii</i>	<i>Parlatoria pergandii</i>	<i>Parlatoria pergandii</i>	отсутствует в базе данных
Подсемейство Diaspidinae			
Тутовая щитовка <i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>
Ивовая щитовка <i>Chionaspis salicis</i>	<i>Chionaspis salicis</i>	<i>Chionaspis salicis</i>	отсутствует в базе данных
Запятовидная щитовка <i>Lepidosaphes ulmi</i>	<i>Lepidosaphes ulmi</i>	отсутствует в базе данных	отсутствует в базе данных
Бересклетовая щитовка <i>Unaspis euonymi</i>	<i>Unaspis euonymi</i>	<i>Unaspis euonymi</i>	отсутствует в базе данных
<b>Семейство Coccidae</b>			
Ложнощитовка мягкая <i>Coccus hesperidum</i>	-	<i>Coccus hesperidum</i>	<i>Coccus hesperidum</i>
Восковая ложнощитовка <i>Ceroplastes</i> sp.	-	<i>Ceroplastes</i> sp.	<i>Ceroplastes</i> sp.
<b>Семейство Pseudococcidae</b>			
Червец цитрусовый <i>Planococcus citri</i>	<i>Planococcus citri</i>	<i>Planococcus citri</i>	<i>Planococcus citri</i>
Щетинистый червец <i>Pseudococcus longispinus</i>	<i>Pseudococcus longispinus</i>	<i>Pseudococcus longispinus</i>	<i>Pseudococcus longispinus</i>
<b>Семейство Margarodidae</b>			
Margarodidae	-	Monophlebinae	Monophlebinae

Примечание: «-» — последовательность фрагмента гена не была получена.

ядерных генов для 15 таксонов видового уровня Coccoidea, из них по гену *EF1α* — для 11, по гену *28s* — для 14 и по гену *18s* — для 13. В частности, для пяти видов были получены последовательности по гену *18s*, отсутствующие в базе данных NCBI. Дендрограммы сходства последовательностей по всем трем генам позволяют строго дифференцировать исследуемые виды по их принадлежности к тому или иному семейству. Это свидетельствует о возможности использования данных генов в качестве молекулярно-генетических маркеров для идентификации видов Coccoidea. Для видовой идентификации червецов и щитовок возможно использовать фрагменты генов *EF1α* и *28s*, в которых имеется наибольшее число диагностически значимых варибельных участков, тогда как ген *18s* значительно консервативнее, поэтому не может быть рекомендован для данных целей.

Молекулярно-генетические маркеры *EF1α* и *28s* позволяют идентифицировать карантинный вид — туютовую щитовку. Калифорнийская щитовка может быть идентифицирована по тем же генам, однако в дальнейшем требуется исследование материала по видам рода *Diaspidiotis* и другим видам трибы *Aspidiotini* из-за недостатка данных ГенБанка.

#### Благодарности

Авторы выражают признательность коллегам из ФГБУ «ВНИИКР» за помощь в сборе материала и проведении некоторых этапов работы младшему научному сотруднику научно-экспериментального отдела Г.Н. Матяшовой, младшему научному сотруднику лаборатории энтомологии ИЭЦ М.Г. Буш, научному сотруднику научно-методического отдела энтомологии к.б.н. Я.Н. Коваленко, старшему научному сотруднику лаборатории энтомологии Н.И. Ершовой.

#### Литература

1. Борхсениус Н.С. Каталог щитовок (Diaspidoidea) мировой фауны. М.-Л.: Наука, 1966. 450 с.
2. Гаврилов И.А. Систематика и цитогенетика кокцид (Homoptera: Coccinea) Европейской части России. Дисс. на соискание уч. ст. канд. биол. наук. СПб, 2005. 269 с.
3. Данциг Е.М. Подотряд кокциды (Coccinea). Семейства Phoenicococcidae

**Для видовой идентификации червецов и щитовок возможно использовать фрагменты генов *EF1α* и *28s*, в которых имеется наибольшее число диагностически значимых варибельных участков, тогда как ген *18s* значительно консервативнее, поэтому не может быть рекомендован для данных целей.**

и Diaspididae // Фауна России и сопредельных стран. № 144. Насекомые хоботные. Т. 10. СПб: Наука, 1993. 453 с.

4. Копина М.Б., Гура Н.А., Мугол Хан Г.Н. Распространение, вредность и методы идентификации цитруссового червеца *Planococcus citri* (Risso) // Карантин растений. Наука и практика. 2013. № 3. С. 53–59.

5. Ширияева Н.В. Вредные членистоногие уличных насаждений Северного Кавказа // Организмы, популяции, экосистемы. Материалы 4-й научно-практической конференции Майкопского государственного технологического института. Майкоп, 2000. С. 124–125.

6. Яснош В.А. Японская восковая ложнощитовка // Тр. ВИЗР. М.-Л., 1952. С. 83–93.

7. Andersen J.C., Wu J., Gruwell M.E., Gwiazdowski R., Santana S.E., Feliciano N.M., Morse G.E., Normark B.B. (2010) A phylogenetic analysis of armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae), based upon nuclear, mitochondrial, and endosymbiont gene sequences // Mol. Phylogenet. Evol. № 57 (3). P. 992–1003.

8. CABI. <http://www.cabi.org/> Онлайн-доступ на 15 мая 2015 г.

9. Miller D., Davidson J. (2005) Armored Scale Insect Pests of Trees and Shrubs (Hemiptera: Diaspididae). Ithaca, United States. P. 456.

10. Morse G.E., Normark B.B. (2006) A molecular phylogenetic study of armoured scale insects (Hemiptera: Diaspididae) // Systematic Entomology. Vol. 31. № 2. P. 338–349.

11. NAPS Unit list of standard primers. <http://www.msl.ubc.ca/services/naps>. Онлайн-доступ на 15 мая 2015 г.

12. NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Онлайн-доступ на 15 мая 2015 г.

13. PQR — EPPO Plant Quarantine Data Retrieval system, version 5.3.5. <https://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>.

14. ScaleNet. 2013. URL <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm>. Онлайн-доступ на 15 мая 2015 г.

15. Sethusa M.T., Millar I.M., Yesoufou K., Jacobs A., van der Bank M., van der Bank H. (2014) DNA Barcode Efficacy for the Identification of Economically Important Scale Insects (Hemiptera: Coccoidea) in South Africa // African Entomology. Vol. 22. № 2. P. 257–266.

Рис. 9. Яблоневаая запятовидная щитовка *Lepidosaphes ulmi* (фото Н.А. Гура)



Fig. 9. Apple mussel scale *Lepidosaphes ulmi* (photo by N.A. Gura)

# COCCIDS (COCCOIDEA)

## Significance, Distribution and DNA-Based Identification Methods

Ilya O. Kamaev, Head of FGBU VNIKR's Research and Testing Department

Natalia A. Gura, Senior Researcher at FGBU VNIKR's Entomological Research and Methodology Department

Andrey V. Shipulin, Junior Researcher at FGBU VNIKR's Research and Testing Department

Coccids, or mealybugs and scale insects (Coccoidea), numbering about 7,800 species in 49 families (ScaleNet), belong to the group of sucking insects feeding on plant sap. Pests of the most important agricultural crops are found among coccids. Some of them, for instance, the white peach scale (*Pseudaulacaspis pentagona*) and San Jose scale (*Quadraspidiotus perniciosus*) are of quarantine concern for many countries (Fig. 1 and 2).

Plant protection experts are facing a challenge with regard to timely detection of harmful Coccoidea species requiring accurate identification. The

latter relies on the morphological characteristics of mealybugs and scale insects, however, identifiable only at the life stage of a female imago. Males have short life expectancy, are considerably less studied and easily damaged on a sticky layer of pheromone traps utilized to detect these insects. All this sets a limit to identifying mealybugs and scale insects at the life stage of various instars.

The need to develop accurate identification methods for coccids is gaining relevance in view of the Russian and Customs Union Lists of quarantine pests being extended. This task can be solved by using DNA methods.

Phylogenetic studies of scale insects and mealybugs based on molecular and

genetic characteristics of mitochondrial and nuclear genome fragment sequences are booming (Morse & Normark, 2006; Andersen et al., 2010; Sethusa et al., 2014, etc). Besides, studies on cytogenetics and karyotaxonomy of Palearctic coccids have been undertaken (Gavrilov, 2005). The advantage of the DNA approach lies in the fact that it enables to identify all life stages. An example of DNA identification of three mealybug species by two genome regions was previously presented (Kopina et al., 2013).

This work focuses on DNA studies and review of data on the significance and distribution of 14 taxa of mealybug and scale insect species belonging to 4 families.

Рис. 10. Бересклетовая щитовка *Unaspis euonymi* (фото Н.А. Гура)



Fig. 10. Beresketovaya щитовка *Unaspis euonymi* (photo by N.A. Gura)

**Table 1**  
Brief description of the material under study

Species	Details (collection place and time, object, collector)	Sample number
<b>Family Diaspididae</b>		
Subfamily Aspidiotinae		
San Jose scale <i>Quadraspidiotus perniciosus</i> Comstock, 1881	peach, Georgia, June 2014, Matyashova G.N.	SK02
	apple, 2013, Gura N.A.	SK09
	apple, Belgorod region, September 2014, Kovalenko Ya.N.	SK12, 13, 19
Red scale <i>Aonidiella aurantii</i> (Maskell, 1879)	tangerine, Pakistan, February 2014, Kamaev I.O.	SP02
Yellow scale <i>Aonidiella citrina</i> (Craw, 1980)	avocado, a food market, Moscow, November 2014, Kamaev I.O.	SPC01, 02
Oleander scale <i>Aspidiotus nerii</i> Bouche, 1833	FGBU VNIKR's collection, July 2014, Gura N.A.	SM00, 01
Chaff scale <i>Parlatoria pergandii</i> Comstock, 1881	orange, plant health testing sample, May 2014, Bush M.G.	SO02
Subfamily Diaspidinae		
White peach scale <i>Pseudaulacaspis pentagona</i> (Targioni Tozzetti, 1886)	kiwi fruit, plant health testing sample, May 2014, Bush M.G.	ST07, 148, 151
Willow scale <i>Chionaspis salicis</i> (Linnaeus, 1758)	blueberry, FGBU VNIKR precinct, Bykovo, Moscow oblast, July 2014, Gura N.A.	SS00,04
Apple mussel scale <i>Lepidosaphes ulmi</i> (Linnaeus, 1758)	apple tree, August 2014, Gura N.A.	SZ04
Euonymus scale <i>Unaspis euonymi</i> (Comstock, 1881)	ornamental plant, plant health testing sample, June 2014, Ershova N.I.	SN01
	reference specimens, collections of 2013, Gura N.A.	LB01, 02
Subfamily Coccidae		
Brown soft scale <i>Coccus hesperidum</i> Linnaeus, 1758	FGBU VNIKR's reference collection, July 2014, Gura N.A.	SLM03
Japanese wax scale <i>Ceroplastes</i> sp.	laurel, the village of Nikita, Crimea, August 2014, Kamaev I.O.	SLV01
<b>Family Pseudococcidae</b>		
Citrus mealybug <i>Planococcus citri</i> Risso, 1813	FGBU VNIKR's reference collection, July 2014, Gura N.A.	SCC01
Long-tailed mealybug <i>Pseudococcus longispinus</i> (Targioni Tozzetti, 1867)	FGBU VNIKR's reference collection, July 2014, Gura N.A.	SCS01
<b>Family Margarodidae</b>		
Ground pearls, Margarodidae	<i>Prunus</i> sp., Karshi, Uzbekistan, 2014, Kovalenko Ya.N.	SCN01

**Table 2**  
Genome fragments under study and primer systems

Gene region	Primers	Primer sequence (5'-3')	Product size, bp	Reference
<i>EF1α</i>	EF1a	GATGCTCCGGGACAYAGA	~1,150	Morse & Normark, 2006
	EF2	ATGTGAGCGGTGTGGCAATCCAA		
28s	s3660	GAGAGTTMAASAGTACGTGAAAC	~800	Morse & Normark, 2006
	28b	TCGGAAGGAACCAGCTACTA		
18s	2660	CTGGTTGATCCTGCCAGTAG	~700	Sethusa et al., 2014
	18s-B	CCGCGGCTGCTGGCACCAGA		

#### Material under study

For this work, samples collected for plant health testing, collection materials provided by the authors of this article and other FGBU VNIKR's specialists, as well as FGBU VNIKR's reference collections of mealybugs were used (Table 1). Identification of the overwhelming majority of mealybug and scale insect species was conducted by Natalia A. Gura, senior researcher at the Entomological Research and Methodology Department.

#### Significance and distribution of the Coccoidea species under study

This section is based on data found in the works by N.S. Borkhenius (1966), E.M. Dantsig (1993), D. Miller & J. Davidson (2005), and databases: ScaleNet (<http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm>), EPPO – PQR (<https://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>), and CABI (<http://www.cabi.org>).

#### Family Diaspididae

##### Subfamily Aspidiotinae

The San Jose scale (*Quadraspidiotus perniciosus*)<sup>1</sup> attacks over 270 plant species in 75 genera belonging to 45 families (ScaleNet). It prefers plants of the rose family. In fruit trees, this species causes cracking and dieback of bark, premature leaf fall, impeded growth,

<sup>1</sup> It should be noted that species of the genus *Quadraspidiotus* MacGillivray, 1921 are reputedly considered as belonging to the genus *Diaspidiotus* Berlese, 1896 due to the lack of clear understanding what species these taxa comprise and what their volume is (Dantsig, 1993; Miller, Davidson, 2005); the San Jose scale has currently been regarded as a species of the independent genus *Comstockaspis* MacGillivray, 1921 (ScaleNet). Here, we use the Latin name of the San Jose scale common for the Russian plant quarantine tradition – *Quadraspidiotus perniciosus*.

deformation and drying of shoots, size reduction and malformation of fruit. Typical red (reddish purple) spots appear on fruit and young shoots where a scale settles (Fig. 1). The species is cosmopolitan and of quarantine concern for Russia and the member countries of

#### *The need to develop accurate identification methods for coccids is gaining relevance in view of the Russian and Customs Union Lists of quarantine pests being extended.*

the Asia-Pacific Plant Protection Commission (APPPC), European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO), and Pacific Plant Protection Organization (PPPO). According to PQR, it is on the List of quarantine pests in Africa, Israel, Jordan, Kazakhstan, Uzbekistan, etc. In Russia, the San Jose scale is reported in the south of the Far East including Sakhalin and the Kuril Islands, in Irkutsk region and

Buryatia, in the south of the European part of Russia and the Northern Caucasus (Dantsig, 1993; ScaleNet).

The red scale (*Aonidiella aurantii*, Fig. 3) is a polyphagous pest feeding on plants of 260 genera in 88 families (ScaleNet). The red scale is distributed

virtually throughout the entire citrus growing area where it causes its major damage. In Russia, the red scale doesn't occur as it doesn't get established in the Caucasus region (Dantsig, 1993).

The yellow scale (*Aonidiella citrina*, Fig. 4) attacks plants of 28 genera in 27 families (ScaleNet). It severely damages citrus plants causing leaf and fruit drying and drop. It is a cosmopolitan species reported on the Black Sea coast of Georgia, and in greenhouses in Armenia and Ukraine (Dantsig, 1993).

**Fig. 11. Brown soft scale *Coccus hesperidum* (photo by N.A. Gura)**



**Table 3**  
Temperature and time conditions for PCR with the primer systems under study

Stage	EF1a/EF2		s3660/28b		2660/18s-B		Number of cycles
	Temperature, °C	Time	Temperature, °C	Time	Temperature, °C	Time	
Initialization	95	10 min	95	10 min	95	5 min	1
Denaturation	95	30 sec	95	30 sec	95	30 sec	35
Annealing of primers*	61	30 sec	54	30 sec	61	1 min	
Elongation	72	2 min	72	2 min	72	2 min	
Final elongation	72	2 min	72	2 min	-	-	1

Note: \* — The temperature for annealing of primers was determined empirically.

The oleander scale (*Aspidiotus nerii*, Fig. 5) is a polyphagous species found on plants belonging to over 500 genera in 124 families (ScaleNet) including oleander, palm trees, orchids, vine, citrus, peach, pear, sandal and olive trees (Miller, Davidson, 2005). Sucking cell sap from host plants, the pest impedes their growth, causes leaf drop, fruit deformation and reduction of oil content in olives. When lemon fruit are damaged, green spots appear. In greenhouses, the pest develops three generations. This cosmopolitan species is reported on the Black Sea coast of Russia (Dantsig, 1993).

The chaff scale (*Parlatoria pergandii*, Fig. 6) damages about 60 plant genera in 36 families (ScaleNet). Major damage is done to citrus and subtropical crops — bay laurel, tea plant, camellia, etc. The species is predominantly spread in Eurasian countries with the Mediterranean climate. In Russia, it is reported

on the Black Sea coast of Krasnodar krai (Dantsig, 1993).

Subfamily Diaspidinae

The white peach scale (*Pseudaulacaspis pentagona*, Fig. 2, 7) is noted for causing severe damage to plants of about 270 genera belonging to 90 families (ScaleNet). It prefers mulberry, currant, blackberry, raspberry, vine, peach, apricot, plum, lilac, oleander, ash tree, actinidia, etc. This cosmopolitan species is of quarantine concern for the Russian Federation, Republic of Belarus, Kazakhstan, Turkey, and Chili (PQR). The white peach scale was introduced onto the Black Sea coast of Georgia. Reliable data on the occurrence of this species in Russia are not available (Dantsig, 1993).

The willow scale (*Chionaspis salicis*, Fig. 8) is a polyphagous pest mainly feeding on trees and shrubs of 72 genera in 26 families (ScaleNet). Its major host plant is willow. In berry crops, it severely damages currant, blueberry, great

bilberry, in ornamental crops — maple, lilac, rose, rowan, jasmine, etc. Shoots become covered with a layer of scales which leads to the die-back of plants and rapid yield reduction. The willow scale is reported in North America, North Africa and widely spread in Eurasia including Russia (Dantsig, 1993; Miller, Davidson, 2005).

The apple mussel scale (*Lepidosaphes ulmi*, Fig. 9) causes severe damage to apple trees in Russian apple production areas. This species also damages pear, plum, peach, apricot, currant, and mulberry. In ornamental and forest crops, it is harmful for ash, maple, birch, oak, hawthorn, lilac, and rose. The apple mussel scale is reported on host plants of over 200 genera in 73 families (ScaleNet). This cosmopolitan species reduces vegetation, causes leaf drop, dieback of branches and trees (Dantsig, 1993).

The euonymus scale (*Unaspis euonymi*, Fig. 10) is a polyphagous pest feed-

**Fig. 12.** Japanese wax scale *Ceroplastes japonicus* (photo by N.A. Gura)



Рис. 12. Японская восковая ложнощитовка *Ceroplastes japonicus* (фото Н.А. Гура)

**Fig. 13.** Citrus mealybug (*Planococcus citri*) (photo by N.A. Gura)



Рис. 13. Цитрусовый или виноградный мучнистый червец (*Planococcus citri*) (фото Н.А. Гура)

**Table 4**  
Comparison of *EF1α* sequences of Coccoidea species under study with the NCBI database

Species under study	Sample number	Identification according to BLAST NCBI	Identity, %	Coverage, %
<b>Family Diaspididae</b>				
Subfamily Aspidiotinae				
<i>Quadraspidiotus perniciosus</i>	SK02	<i>Diaspidiotus</i> sp.	90	100
	SK09		91	97
	SK12		90	100
	SK13		91	100
	SK19		90	98
<i>Aonidiella aurantii</i>	SP02	<i>Aonidiella aurantii</i>	98	98
<i>Aonidiella citrina</i>	SPC01	<i>Aonidiella citrina</i>	98	100
	SPC02			
<i>Aspidiotus nerii</i>	SM00	<i>Aspidiotus nerii</i>	100	100
	SM01		99	97
<i>Parlatoria pergandii</i>	SO02	<i>Parlatoria pergandii</i>	100	87
Subfamily Diaspidinae				
<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	ST07	<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	99	94
	ST148		100	100
	ST151		100	100
<i>Chionaspis salicis</i>	SS04	<i>Chionaspis salicis</i>	99	99
<i>Lepidosaphes ulmi</i>	SZ04	<i>Lepidosaphes ulmi</i>	100	89
<i>Unaspis euonymi</i>	SN01	<i>Unaspis euonymi</i>	99	86
<b>Family Pseudococcidae</b>				
<i>Planococcus citri</i>	SCC01	<i>Planococcus citri</i>	100	100
<i>Pseudococcus longispinus</i>	SCS01	<i>Pseudococcus longispinus</i>	99	84

**Fig. 14.** Long-tailed mealybug *Pseudococcus longispinus* (photo by N.A. Gura)



Рис. 14. Щетинистый мучнистый червец *Pseudococcus longispinus* (фото Н.А. Гура)

ing on plants of 25 genera in 20 families (ScaleNet). The most severe damage is caused to spindle commonly used in ornamental horticulture. Firstly, light yellow spots on leaves are produced. Then, complete discoloration of lamina takes place, dieback of shoots and branches is observed followed by strong suppression and death of plants. On leaves, 90% of the population is represented by males, while on branches and stems females dominate. This cosmopolitan species originates from Southeast Asia (Miller, Davidson, 2005). The species was introduced into Crimea and onto the Black Sea coast of Krasnodar krai (Dantsig, 1993).

#### Family Coccidae

The brown soft scale (*Coccus hesperidum*, Fig. 11) is a highly polyphagous pest feeding on plants of over 500

**Table 5**  
Comparison of 28s RNA sequences of the superfamily Coccoidea species under study with the NCBI database

Species under study	Sample number	BLAST NCBI identification	Identity, %	Coverage, %
<b>Family Diaspididae</b>				
Subfamily Aspidiotinae				
<i>Quadraspidotus perniciosus</i>	SK12	<i>Diaspidiotus</i> sp.	98	100
	SK13			
	SK19			
<i>Aonidiella aurantii</i>	SP02	<i>Aonidiella aurantii</i>	93	99
<i>Aonidiella citrina</i>	SPC01	<i>Aonidiella</i> sp.	98	100
<i>Aspidiotus nerii</i>	SM00	<i>Aspidiotus nerii</i>	100	100
	SM01		100	100
<i>Parlatoria pergandii</i>	SO02	<i>Parlatoria pergandii</i>	100	94
Subfamily Diaspidinae				
<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	ST07	<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	98	100
	ST151		99	96
<i>Chionaspis salicis</i>	SS00	<i>Chionaspis salicis</i>	99	100
	SS04		97	99
<i>Lepidosaphes ulmi</i>	SZ04	unavailable in the database	-	-
<i>Unaspis euonymi</i>	LB01	<i>Unaspis euonymi</i>	100	94
	LB02		100	94
<b>Family Coccidae</b>				
<i>Ceroplastes</i> sp.	SLJ01	<i>Ceroplastes</i> sp.	97	100
	SLV01		97	100
<i>Coccus hesperidum</i>	SLM03	<i>Coccus hesperidum</i>	100	100
<b>Family Pseudococcidae</b>				
<i>Planococcus citri</i>	SCC01	<i>Planococcus citri</i>	100	95
<i>Pseudococcus longispinus</i>	SCS01	<i>Pseudococcus longispinus</i>	100	94
<b>Family Margarodidae</b>				
Margarodidae	SCN01	Monophlebinae	84	73

genera in over 130 families (ScaleNet). It prefers tropical and subtropical greenhouse crops and house plants. It mainly settles on the upper side of leaves along veins. The brown soft scale abundantly produces honeydew facilitating the development of sooty blotch, thus, reducing the ornamental value of plants. In open-ground planting, this cosmopolitan species is spread in regions with the Mediterranean climate.

The Japanese wax scale (*Ceroplastes japonicus*, Fig. 12) is a polyphagous pest feeding on over 100 plant species in 26 families (Borkhsenius, 1966; ScaleNet). In subtropical crops, the brown soft

scale damages many citrus crops, date plum, fig, pomegranate, apple, plum, pear, peach, apricot, cherry, sweet cherry, quince, mulberry, hawthorn, barber-

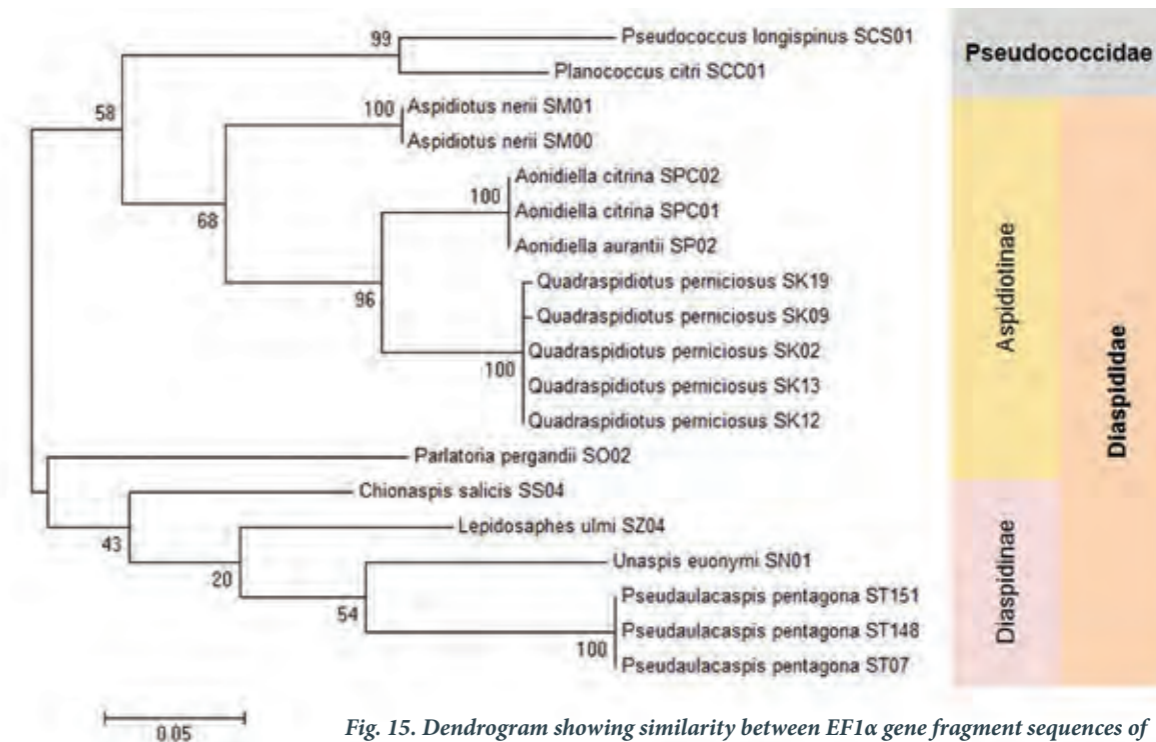
**The advantage of the DNA approach lies in the fact that is enables to identify all life stages.**

ry, boxwood, spindle tree, ivy, oleander, plane tree, willow, elm, etc. The pest impedes growth and causes yield reduction, leaf drop and death of young trees. A black coating is formed on leaves due to the development of the *Capnodium* fungi on sugar-rich excretions of Japa-

nese wax scales. This leads to decline in the photosynthetic activity of leaves and aesthetic attractiveness of ornamental plants (Yasnosh, 1952; Shiryaeva 2000). This palearctic species occurs in Europe, Turkey, Caucasus, Korea, and Japan (ScaleNet).

#### Family Pseudococcidae

The citrus mealybug (*Planococcus citri*, Fig. 13) is a polyphagous pest reportedly feeding on 242 plant genera in 89 families (ScaleNet). It damages all above-ground parts of greenhouse and indoor plants. In southern latitudes, it damages open-ground plants, as well.



**Fig. 15.** Dendrogram showing similarity between *EF1α* gene fragment sequences of the Coccoidea species under study (species names and sample numbers are given) is built using the maximum likelihood method. Stability measured in the bootstrap analysis (500 alternative dendrograms) is expressed in percent above the branches

**Рис. 15.** Дендрограмма сходства последовательностей фрагмента гена *EF1α* исследуемых представителей Coccoidea (названия видов и номер образца приведены), построенная с помощью метода максимального правдоподобия. Устойчивость, определенная бутстреп-анализом (500 альтернативных дендрограмм), дана в процентах над ветвями

Most commonly, it is found on vine, citrus, fruit and subtropical crops. This cosmopolitan species causes leaf wilt and fruit decline (<http://www.cabi.org>).

The long-tailed mealybug (*Pseudococcus longispinus*, Fig. 14) is a polyphagous pest settling 253 plant genera in 96 families. It essentially damages such greenhouse and indoor plants as asparagus, begonia, hibiscus, cyclamen, orchid, palm tree, and cycas. Leaves damaged by the long-tailed mealybug become brown, dry and fall. In open-ground planting, this cosmopolitan species (<http://www.cabi.org>) is predominantly spread in tropical and subtropical regions.

#### DNA studies

The material was selected under laboratory conditions using entomological needles treated with 96% ethanol, with one pair of needles used per specimen. In scale insects, bodies were separated from scales for further DNA extraction, while specimens of the other families were directly placed into sterile tubes.

The extraction of DNA from the material under study was performed by treating the specimens with Proteinase K followed by removal of proteins with no extraction with organic solvents. A kit of the DNA-Ekstran-2 series, catalogue number NG-511-100, was used (Synthol, Moscow).

Regarding DNA target regions and primers, in accordance with literary sources, we used the following primers

(indicated in Table 2) for the fragments of three nuclear genes – elongation factor 1-alpha (*EF1α*) and two ribosomal genes (28s and 18s).

PCR amplification was performed using the Veriti™ thermal cycler (Applied Biosystems, USA). The reaction mix contained 5 µl of the readymade PCR mix 5X ScreenMix-HS (Evrogen, Russia), 1 µl of every primer (10 pmol each), and 2 µl of DNA (with the concentration of 2-100 ng/µl).

The PCR conditions for each primer system under study are given in Table 3.

Sequencing was performed in accordance with the common technique using the Genetic Analyzer AB-3500 (Applied Biosystems, USA).

Primary comparison of the produced sequences with the GenBank data was conducted using the NCBI BLAST internet resource (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The sequences were verified, aligned and edited using the software BioEdit v.7.0.5.3.

Pairwise genetic distances between the sequences were determined using Kimura's two parameter model. Dendrograms were built using the maximum likelihood method implemented

in MEGA 6.0 software. The statistical confirmation of the dendrogram accuracy was evaluated using the bootstrap analysis through building 500 alternative trees. This statistical confirmation is given as percentage of the base value. GenBank sequences homologous with the genes under study were analyzed together with the new sequences.

#### Results

The following stages preceded the studies on the possibility of using DNA methods for identification of scale insects and mealybugs:

- morphological identification of mealybugs and scale insects (only reliably identified material was used);
- after DNA had been isolated and PCR with the primers under study had been performed, the derived product was sequenced and the sequence of the target gene fragment was compared with the sequences available in the GenBank (NCBI). At this stage, all material infested with fungi or parasitoids was excluded. In our studies, PCR products for fungi infesting Coccoidea, as a rule, were smaller in size than those for scale insects.

It should be noted that DNA test results are also influenced by the quality of the material itself (it is better to utilize fresh or frozen material, the dry one is of use, as well) and its quantity. In the latter case, it is possible to obtain the sequence of the target gene from one specimen (in case with scale insects, only bodies without scales are used), with the concentration of DNA in the solution after its isolation amounting to 1 ng/ml.

The nuclear genes under study are widely used for DNA studies of insects. The fragment of every gene was evaluated with regard to its potential use in diagnosing mealybugs and scale insects.

#### The fragment of elongation factor 1-alpha gene (EF1α)

It encodes the elongation factor 1-alpha protein catalyzing the binding of aminoacyl-transfer RNAs to the ribosome in protein synthesis. This highly conserved gene is used for phylogenetic studies of taxa of lower rank in Lepidoptera and other insects (NAPS).

As a result of the work performed, the sequences of *EF1α* gene were obtained for 11 species of mealybugs and scale insects given in Table 4. Comparison of the obtained sequences with the NCBI database enabled to conclude that the Coccoidea species under study, apart from the San Jose scale, are reliably identified by this gene fragment (Table 4). It should be noted that GenBank

**It should be noted that DNA test results are also influenced by the quality of the material itself (it is better to utilize fresh or frozen material, the dry one is of use, as well) and its quantity.**

has a considerable number of sequences for various species of mealybugs and scale insects.

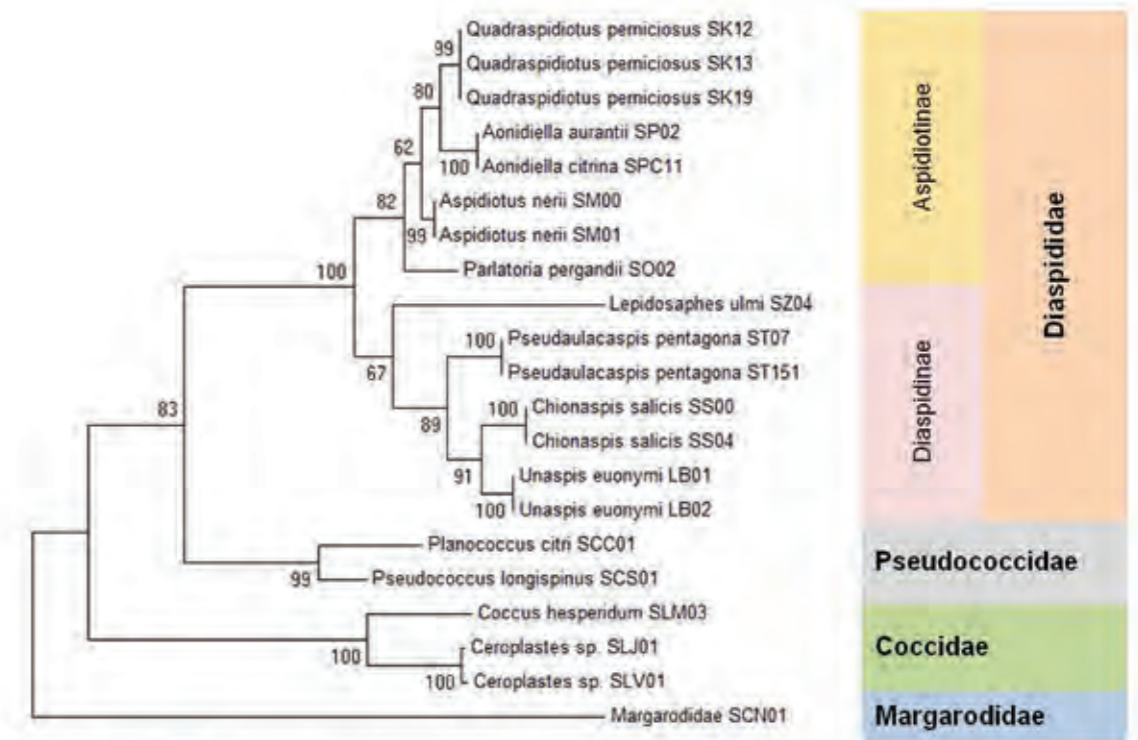
In the course of analyzing the *EF1α* gene fragment sequences through building a dendrogram (Fig. 15), it was found that the species under study could be divided into two large groups. The first group consisting of two branches is formed by the representatives of the family Pseudococcidae and subfamily Aspidiotinae, while the second group is formed by the representatives of the

subfamily Diaspidinae and *Parlatoria pergandii*. Such division, in general terms matching the taxonomic distinction between the scale insect species on the family level, is determined by the large number of variable regions of the *EF1α* gene fragment conditioning perceptible differences on both the family and species level. It should be noted that the position of *Parlatoria*

*pergandii*, classified as belonging to the subfamily Aspidiotinae (Dantsig, 1993), in the dendrogram is likely to be determined by a relatively small selection of the tested species and a rather unclear phylogenetic relationship. In particular, Borkhsenius (1966) identified the genus *Parlatoria* along with other genera as the independent subfamily Leucaspinae. Meanwhile, according to up-to-date molecular data, the genus *Parlatoria* is phylogenetically close to the representatives of the subfamily Aspidiotinae,

**Table 6**  
Comparison of 18s RNA sequences of the superfamily Coccoidea species under study with the NCBI database

Species under study	Sample number	BLAST NCBI identification	Identity, %	Coverage, %
<b>Family Diaspididae</b>				
Subfamily Aspidiotinae				
<i>Quadraspidiotus perniciosus</i>	SK06	<i>Quadraspidiotus perniciosus</i>	100	86
	SK05		98	99
<i>Aonidiella aurantii</i>	SP02	<i>Aonidiella aurantii</i>	98	100
<i>Aspidiotus nerii</i>	SM01	<i>Aspidiotus nerii</i>	100	97
<i>Parlatoria pergandii</i>	SO02	unavailable in the database	-	-
Subfamily Diaspidinae				
<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	ST07	<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	99	86
<i>Chionaspis salicis</i>	SS04	unavailable in the database	-	-
<i>Lepidosaphes ulmi</i>	SZ04	unavailable in the database	-	-
<i>Unaspis euonymi</i>	SN01	unavailable in the database	-	-
<b>Family Coccidae</b>				
<i>Ceroplastes</i> sp.	SLV01	<i>Ceroplastes</i> sp.	100	99
<i>Coccus hesperidum</i>	SLM03	<i>Coccus hesperidum</i>	99	96
<b>Family Pseudococcidae</b>				
<i>Planococcus citri</i>	SCC01	<i>Planococcus citri</i>	100	87
<i>Pseudococcus longispinus</i>	SCS01	<i>Pseudococcus longispinus</i>	99	93
<b>Family Margarodidae</b>				
Margarodidae	SCN01	Monophlebinae	98	96



**Fig. 16.** Dendrogram showing similarity between 28s gene fragment sequences of the Coccoidea species under study (species names and sample numbers are given) is built using the maximum likelihood method. Stability measured in the bootstrap analysis (500 alternative dendrograms) is expressed in percent above the branches

**Рис. 16.** Дендрограмма сходства последовательностей фрагмента гена 28s исследуемых представителей надсемейства Coccoidea (приведены названия видов и номер образца), построенная с помощью метода максимального правдоподобия. Устойчивость, определенная бутстреп-анализом (500 альтернативных дендрограмм), дана в процентах над ветвями

but at the same time the genus under consideration is quite alone-standing within this subfamily.

The white peach scale quarantine for Russia is easily identified by the *EF1α* gene fragment sequences available in the GenBank. And, on the contrary, DNA identification of the San Jose scale is made difficult by the lack of data in the GenBank and high similarity between the sequences of the group of species belonging to Aspidiotini.

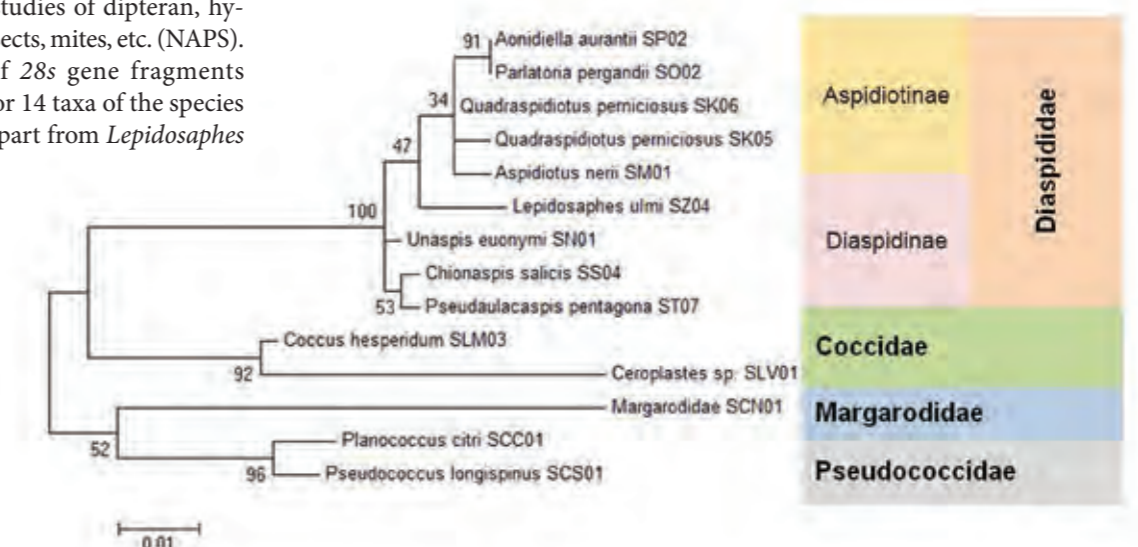
#### 28s ribosomal gene fragment

This gene encodes rRNA of the large subunit of ribosomes participating in protein synthesis. Along with internal transcribed spacers (ITS), this gene is used for DNA studies of dipteran, hymenopterous insects, mites, etc. (NAPS).

Sequences of 28s gene fragments were obtained for 14 taxa of the species level. They all, apart from *Lepidosaphes*

**Fig. 17.** Dendrogram showing similarity between 18s gene fragment sequences of the Coccoidea species under study (species names and sample numbers are given) is built using the maximum likelihood method. Stability measured in the bootstrap analysis (500 alternative dendrograms) is expressed in percent above the branches

**Рис. 17.** Дендрограмма сходства последовательностей фрагмента гена 18s исследуемых представителей Coccoidea (приведены названия видов и номер образца), построенная с помощью метода максимального правдоподобия. Устойчивость, определенная бутстреп-анализом (500 альтернативных дендрограмм), дана в процентах над ветвями





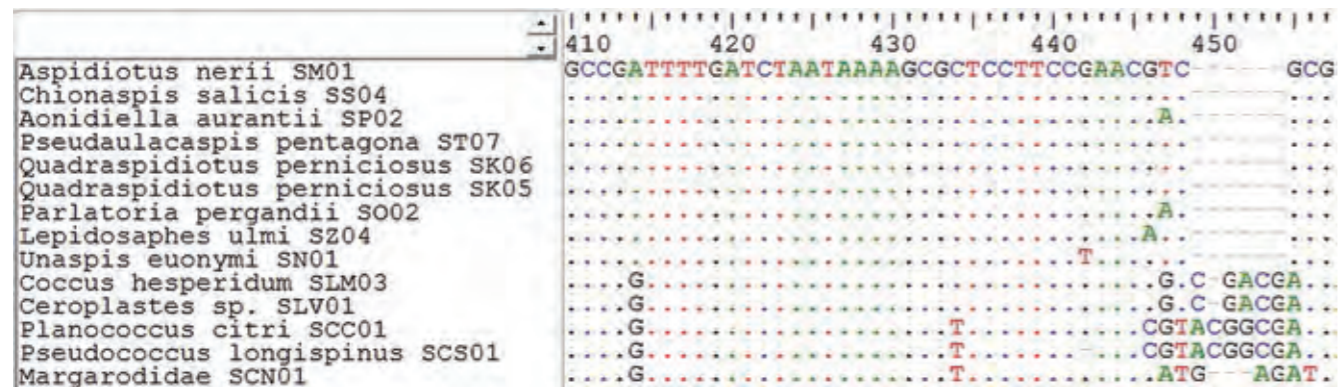


Fig. 18. 18s gene fragment sequences of the Coccoidea species under study (species names and sample numbers are given). Corresponding nucleotides are marked with letters, nucleotide identity in sequences shown by dots and deletions indicated by dashes

Рис. 18. Последовательности фрагмента гена 18s исследуемых представителей Coccoidea (приведены названия видов и номер образца). Буквами обозначены соответствующие нуклеотиды, точками показана идентичность нуклеотидов в последовательностях, прочерками — делеции

*ulmi*, were identified using the GenBank (Table 5). Species of scale insects and mealybugs, except for *Quadraspidiotus perniciosus* and species of the genera *Aonidiella* and *Ceroplastes*, are quite accurately identified to the species level by the 28s gene fragment owing to the large number of sequences of the nuclear genome region under study in the GenBank.

Analyzing the 28s gene fragment sequences of the mealybugs and scale insects under study through building a dendrogram (Fig. 16), we discovered a consistent pattern in the formation of species groups matching the group system. All studied taxa of the species level were divided into four clades with high bootstrap support (99-100%) based on their membership in this or that family. In their turn, scale insects are divided into two groups matching the two subfamilies in E.M. Dantsig's system (1993). The species of the genera *Quadraspidiotus*, *Aonidiella* and *Aspidiotus* in the subfamily Aspidiotinae belonging to the tribe Aspidiotina are united in one group and distinguished from *Parlatoria pergandii* belonging to the tribe Parlatoriini. The same is observed in classifying the genera *Pseudaulacaspis*, *Chionaspis*, *Unaspis* species in the subfamily Diaspidinae – a group of species belonging to Diaspidini is

**For species identification of mealybugs and scale insects, EF1α and 28s gene fragments with the largest number of diagnostically significant variable regions can be used, while 18s gene is considerably more conserved and can't be recommended for this purpose.**

differentiated from *Lepidosaphes ulmi* belonging to the tribe Lepidosaphini. On the whole, the obtained results are consistent with the DNA phylogeny of scale insects (Andersen et al., 2010).

The quarantine white peach scale can be identified by the fragment of this gene, while identification of the San Jose scale, as in the abovementioned case, is difficult due to the lack of data in the GenBank and high similarity between the sequences of the group of species belonging to the tribe Aspidiotini.

#### 18s ribosomal gene fragment

This gene encodes rRNA of the small ribosomal subunit. This gene is also used for DNA studies of insects.

18s gene sequences were obtained for 13 taxa of the coccid species level. The GenBank had no sequences available for 5 species (Table 6). Analyzing these sequences through building a dendrogram using the maximum likelihood method enabled to classify the taxa of the species level under study based on the membership in this or that family (Fig. 17). Species of the scale insect family were not readily differentiated from one another into two subfamilies which was due to high similarity of sequences in the species (differences often manifested themselves in single nucleotide substitutions, Fig. 18). Herewith,

it should be noted that this fragment reliably distinguishes the species on the level of families.

#### Acknowledgements

The authors express their gratitude to their FGBU VNIKR's colleagues – G.N. Matyashova, junior researcher at Research and Testing Department, M.G. Bush, junior researcher at the Entomological Laboratory of the Expert and Testing Center, Ya.N. Kovalenko, candidate of biological sciences, researcher at the Entomological Research and Methodology Department, and N.I. Ershova, senior researcher at the Entomological Laboratory of the Expert and Testing Center, for their assistance rendered in collecting material and performing some stages of work.

#### References

1. Borkhsenius N.S. Catalogue of Scale Insects (Diaspidoidea) of the World Fauna. M.-L.: Nauka, 1966. 450 pp., available in Russian only.
2. Gavrilov I.A. Taxonomy and Cytogenetics of Coccids (Homoptera: Coccinea) of the European part of Russia. Ph.D Thesis in Biological Sciences. Saint-Petersburg, 2005. 269 pp., available in Russian only.
3. Dantsig E.M. Suborder Coccinea. Families Phoenicocidae and Diaspididae // The Fauna of Russia and Neighboring Countries. № 144. Proboscidea Insects. Vol. 10. Saint-Petersburg: Nauka, 1993. 453 pp., available in Russian only.
4. Kopina M.B., Gura N.A., Mugol Khan G.N. Citrus Mealybug *Planococcus citri* (Risso) Distribution, Damage and Identification Methods // Plant Health: Research and Practice. 2013. № 3. P. 53–59.
5. Shiryaeva N.V. Pests of urban plantations in the North Caucasus // Organisms, populations, ecosystems. Proceedings of the 4-th Research and Practice Conference at Maikop State

Table 7  
Summary table of identification results for the Coccoidea species under study

Species under study	BLAST NCBI identification		
	EF1α	28s	18s
	Family Diaspididae		
Subfamily Aspidiotinae			
San Jose scale <i>Quadraspidiotus perniciosus</i>	<i>Diaspidiotus</i> sp.	<i>Diaspidiotus</i> sp.	<i>Quadraspidiotus perniciosus</i>
Red scale <i>Aonidiella aurantii</i>	<i>Aonidiella aurantii</i>	<i>Aonidiella aurantii</i>	<i>Aonidiella aurantii</i>
Yellow scale <i>Aonidiella citrina</i>	<i>Aonidiella citrina</i>	<i>Aonidiella</i> sp.	-
Oleander scale <i>Aspidiotus nerii</i>	<i>Aspidiotus nerii</i>	<i>Aspidiotus nerii</i>	<i>Aspidiotus nerii</i>
Chaff scale <i>Parlatoria pergandii</i>	<i>Parlatoria pergandii</i>	<i>Parlatoria pergandii</i>	unavailable in the database
Subfamily Diaspidinae			
White peach scale <i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>	<i>Pseudaulacaspis pentagona</i>
Willow scale <i>Chionaspis salicis</i>	<i>Chionaspis salicis</i>	<i>Chionaspis salicis</i>	unavailable in the database
Apple mussel scale <i>Lepidosaphes ulmi</i>	<i>Lepidosaphes ulmi</i>	unavailable in the database	unavailable in the database
Euonymus scale <i>Unaspis euonymi</i>	<i>Unaspis euonymi</i>	<i>Unaspis euonymi</i>	unavailable in the database
Family Coccidae			
Brown soft scale <i>Coccus hesperidum</i>	-	<i>Coccus hesperidum</i>	<i>Coccus hesperidum</i>
Japanese wax scale <i>Ceroplastes</i> sp.	-	<i>Ceroplastes</i> sp.	<i>Ceroplastes</i> sp.
Family Pseudococcidae			
Citrus mealybug <i>Planococcus citri</i>	<i>Planococcus citri</i>	<i>Planococcus citri</i>	<i>Planococcus citri</i>
Long-tailed mealybug <i>Pseudococcus longispinus</i>	<i>Pseudococcus longispinus</i>	<i>Pseudococcus longispinus</i>	<i>Pseudococcus longispinus</i>
Family Margarodidae			
Margarodidae	-	Monophlebinae	Monophlebinae

Note: “-” — a gene fragment sequence was not obtained.

6. Technological Institute. Maikop, 2000. P. 124–125, available in Russian only.
7. Yasnosh V.A. Japanese Wax Scale // Published Works of VIZR. M.-L., 1952. P. 83–93, available in Russian only.
8. Andersen J.C., Wu J., Gruwell M.E., Gwiazdowski R., Santana S.E., Feliciano N.M., Morse G.E., Normark B.B. (2010) A phylogenetic analysis of armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae), based upon nuclear, mitochondrial, and endosymbiont gene sequences // Mol. Phylogenet. Evol. № 57 (3). P. 992–1003.

9. CABI. <http://www.cabi.org/>, accessed on 15 May 2015.
10. Miller D., Davidson J. (2005) Armored Scale Insect Pests of Trees and Shrubs (Hemiptera: Diaspididae). Ithaca, United States. P. 456.
11. Morse G.E., Normark B.B. (2006) A molecular phylogenetic study of armored scale insects (Hemiptera: Diaspididae) // Systematic Entomology. Vol. 31. № 2. P. 338–349.
12. NAPS Unit list of standard primers. <http://www.msl.ubc.ca/services/naps>, accessed on 15 May 2015.

13. NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, accessed on 15 May 2015.
14. PQR — EPPQ Plant Quarantine Data Retrieval system, version 5.3.5. <https://www.eppo.int/DATABASES/pqr/pqr.htm>.
15. ScaleNet. 2013. URL <http://www.sel.barc.usda.gov/scalenet/scalenet.htm>, accessed on 15 May 2015.
16. Sethusa M.T., Millar I.M., Yessoufou K., Jacobs A., van der Bank M., van der Bank H. (2014) DNA Barcode Efficacy for the Identification of Economically Important Scale Insects (Hemiptera: Coccoidea) in South Africa // African Entomology. Vol. 22. № 2. P. 257–266.

# ДИНАМИКА ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ВОСПРИИМЧИВОСТИ сортов *Vitis vinifera* к *Xylella fastidiosa*

Араш Рашид<sup>1</sup>, Джойс Кван<sup>1</sup>, Бреанна Барафф<sup>1</sup>, Диана Линг<sup>1</sup>, Мэтью П. Доэрти<sup>2</sup>,  
Набил Киллини<sup>3</sup>, Родриго П.П. Алмейда<sup>1</sup>

1. Отдел экологии, стратегии и управления, Университет Калифорнии, Беркли, Калифорния, Соединенные Штаты Америки

2. Отдел энтомологии Университета Калифорнии, Риверсайд, Калифорния, Соединенные Штаты Америки

3. Научно-образовательный центр цитрусовых культур, Отдел энтомологии и нематологии, Университет Флориды, Флорида, Соединенные Штаты Америки

## Введение

Восприимчивость растения-хозяина к заражениям патогенами зависит от его генетической структуры (May, Anderson, 1983), однако на проявление болезни постоянно воздействуют факторы окружающей среды, такие, как температура, возраст (Goss, Bergelson, 2006) и пищевое поведение хозяина (Laine, 2007), а также генетические факторы (Laine et al., 2011). В природных условиях, если особи одной популяции имеют различную степень восприимчивости, патоген действует как селективный агент и будет воздействовать в зависимости от приспособленности каждой отдельной особи (Restif, Koella, 2004). В сельскохозяйственном производстве, тем не менее, различия в восприимчивости особей одной популяции могут быть сокращены путем выращивания одного сорта с определенным генотипом, имеющим хозяйственное значение. Однако выращиваемый сорт может оказаться восприимчив к патогенам, что может привести к значительным потерям урожая (Anderson, 1986; Kolmer, 1996; Leung, 2003). Однако благодаря защитным механизмам устойчивость хозяина может развиться уже после заражения. Защитные механизмы отрицательно

воздействуют на патоген, ограничивая его размножение и сокращая популяцию (т.е. устойчивость), или ограничивая воздействие патогена на фенотип растения-хозяина (т.е. толерантность). Следует отметить, что уровни устойчивости к заражению и толерантности к заражению у различных типов хозяев не всегда совпадают (Restif, Koella, 2004; Kover, Schaal, 2002; Raberg et al., 2007).

**Данное исследование было проведено с целью сравнения уровня зараженности и выраженности симптомов на десяти виноградных сортах, традиционно выращиваемых в Калифорнии и других районах возделывания винограда по всему миру.**

Связь между количеством патогена (уровнем заражения) и проявлением симптомов еще более важна при заражении болезнями, распространяемыми переносчиками. При заражении подобными болезнями результат взаимодействия патогена и хозяина также может влиять на пищевое поведение переносчика и его выбор хозяина, и как следствие — на эпидемиологию болезни (McElhany et al., 1995). *Xylella fastidiosa* — это бактерия, заражающая большое количество растений-хозяев, включая несколько экономически значимых сельскохозяйственных культур

(Hopkins, Purcell, 2002; Purcell, 1997). Бактерия распространяется переносчиком и поражает ксилему. *X. fastidiosa* вызывает болезнь Пирса на винограде. Численность бактерии в Калифорнии увеличилась после акклиматизации инвазивной цикадки *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae) (Sorensen, Gill, 1996; Blua et al., 1999; Purcell, Feil, 2001; Stenger et al., 2010).

*X. fastidiosa* проникает в здоровый виноград, питаясь ксилемным соком, а затем размножается и распространяется по всему организму хозяина, колонизируя сосуды ксилемы (Chatterjee et al., 2008), что в конечном итоге приводит к закупорке сосудов, ограничивающей циркуляцию воды в растении (Tyson et al., 1985; Fry, Milholland, 1990; Newman et al., 2003; Alves et al., 2004). Хотя механизм патогенности еще не полностью изучен, дефицит воды, ввиду закупорки ксилемы, — основная причина проявления симптомов болезни Пирса (Baccari, Lindow, 2011).

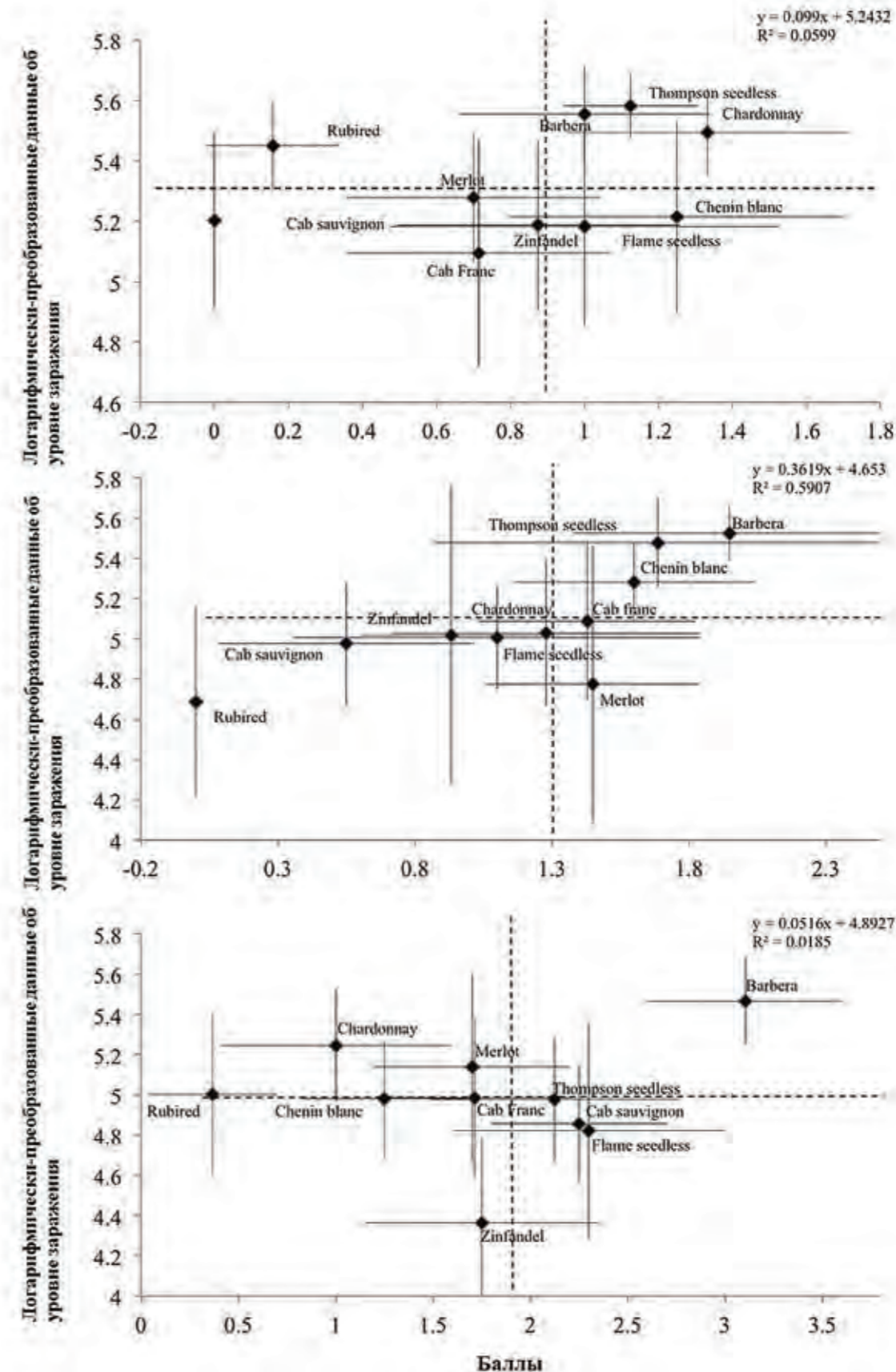


Рис. 1. Категоризация сортов *Vitis vinifera* по уровню их зараженности *X. fastidiosa* и выраженности симптомов на А) 8-й В) 12-й и С) 16-й неделях после инокуляции. Планки погрешностей составляют 95% уровней доверия

Fig. 1. Categorization of *Vitis vinifera* cultivars in relation to their *X. fastidiosa* infection level and symptom severity means at А) 8, В) 12, and С) 16 weeks post inoculation. Error bars represent 95% confidence intervals

Типичные симптомы болезни Пирса — ожог листьев, неравномерное созревание побегов, черешки без листовой пластины (так называемые «спичечные соломки»), усыхание верхушки и, в конечном итоге, гибель растения (Purcell, 1997; Krivanek et al., 2005).

Различные виды растений-хозяев *X. fastidiosa* различаются по своей восприимчивости к заражению данной бактерией; слива и кофе, судя по всему, относительно более восприимчивы к заражению, чем цитрусовые культуры, т.е. большая часть сосудов ксилемы колонизируется патогеном (Alves et al., 2004). Также, согласно имеющимся данным, различные *Vitis* spp. имеют разную степень восприимчивости к патогену (Krivanek et al., 2005; Krivanek, Walker, 2005), при этом генотипы *Vitis vinifera* более восприимчивы к заражению *X. fastidiosa*, чем другие виды (Fritschi et al., 2008).

Сорта *V. vinifera* также различаются по степени восприимчивости к болезни Пирса (Krivanek et al., 2005; Hewitt et al., 1942; Purcell, 1974; Raju, Goheen, 1981). Эти различия обусловлены тем, что на различных генотипах присутствует различное

количество бактерий, и степень закупорки ксилемы вдоль стебля также различна (Fry, Milholland, 1990; Baccari, Lindow, 2011; Krivanek et al., 2005). Важность объективной количественной оценки взаимосвязи между уровнем заражения и выраженностью симптомов на различных сортах *V. vinifera* стала еще более очевидной в свете исследований, показавших, что: а) существует взаимосвязь между уровнем заражения и эффективностью распространения с переносчиком (Hill, Purcell, 1997) и б) выбор хозяина переносчиком не случаен и основан на выраженности симптомов на хозяине (Daugherty et al., 2011).

Наличие большого количества бактерий может увеличить вероятность того, что она успешно попадет на переносчика, а значит — будет успешно переноситься им (Hill, Purcell, 1997; Daugherty et al., 2010). Более того, предпочтение переносчиком бессимптомных хозяев (Stenger et al., 2010; Daugherty et al., 2011) означает, что толерантные генотипы, которые могут содержать большое количество бактерий, но практически не проявляют симптомы болезни, могут быть потенциальными

источниками заражения в виноградниках, где выращиваются более восприимчивые сорта (М.П. Дозэрти, неопубликованные результаты).

В данном исследовании термин «устойчивость» отражает относительную способность растения ограничить (или сократить) уровень заражения, а термин «толерантность» — степень сохранения растением здорового фенотипа, несмотря на свою зараженность. Более того, каждое из вышеописанных качеств рассматривается как метрическое постоянное, а не категорическая характеристика (Daugherty et al., 2009).

Относительный характер этих двух терминов также усложняет задачу сравнения результатов различных исследований, так как, помимо того, что различия существуют между наборами исследуемых сортов, различные условия проведения испытаний также могут значительно повлиять на рост популяции бактерии и выраженность симптомов (Feil, Purcell, 2001; Hill, Purcell, 1995). Данное исследование было проведено с целью сравнения уровня зараженности и выраженности симптомов на десяти виноградных сортах, традиционно выращиваемых в Калифорнии и других районах возделывания винограда по всему миру. Устойчивость и толерантность сорта оценивалась последовательно для анализа взаимосвязи между этими двумя качествами и установления взаимосвязи между изменением уровня устойчивости и толерантности в зависимости от развития заражения.

## Материалы и методы

Черенки с двумя почками десяти сортов винограда были укоренены в смесь перлита и вермикулита (в соотношении 1:1) в теплице исследовательского центра «Oxford Tract» при Калифорнийском Университете, Беркли, при этом применялась система увлажнения туманом. Эта коллекция состояла из восьми технических сортов винограда (cv. Barbera, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Chenin Blanc, Merlot, Rubired, Zinfandel) и двух столовых сортов (cv. Flame Seedless, Thompson Seedless).

Выбраны были одни из наиболее часто выращиваемых сортов в Калифорнии и в других районах. Сертифицированные, свободные от патогена черенки в состоянии покоя от каждого сорта были предоставлены «Foundation Plant Services» (Университет Калифорнии, Дэвис). На незараженных сертифицированных черенках разных сортов симптомы болезни не проявились, а тесты на присутствие *X. fastidiosa* показали отрицательный результат. После развития корневой системы черенки пересаживали в горшки диаметром 5 см, наполненные почвой для горшечных культур «Supersoil potting soil» (Rod McLellan Company, Сан-Матео, Калифорния, США). Затем эти укорененные черенки были перемещены в горшки объемом один галлон (3,78 л) со смесью Supersoil (50%), песка (25%) и вермикулита (25%). Горшки хранились в одном и том же месте в защищенной от насекомых теплице.

## Уровень зараженности и выраженность симптомов значительно различались среди десяти тестируемых сортов и трех периодов инкубации.

Инокулят патогена был получен путем выращивания клеток *X. fastidiosa* (штамм STL) на среде PWG и их суспендирования в буфере SCP (Hill, Purcell, 1995). Двадцать микролитров этой суспензии использовали для механической инокуляции 6-месячных растений винограда в основание ствола при помощи иглы в конце декабря 2009 года. Инокуляция проводилась в два этапа. На каждом этапе инокулировали десять растений каждого из десяти сортов. Растения регулярно обрезались для удаления боковых побегов и сохранения высоты примерно 120–150 см.

В ходе опыта была установлена температура 22–26 °C. Освещение (14:10, L:D) было дополнено 1000-ватными лампами для тепличного освещения PL 2000 (P.L. Light Systems Inc., Линкольн, Онтарио, Канада). Образцы растений отбирали через каждые 4 недели спустя 8 недель после инокулирования в течение 3 месяцев подряд. Далее период между инокуляцией и отбором образцов будет называться «периодом инкубации». В каждом из трех периодов инкубации черешок удаляли на расстоянии + 10 см над местом инокуляции. В последний период инкубации (16-я неделя), образцы были отобраны, как с +10 см, так и +90 см над местом инокуляции. Отбор образцов с места инокуляции, а также на расстоянии примерно 90 см над ним позволил обнаруживать потенциальное движение патогена и колонизацию новой ткани винограда. Было сделано предположение, что различия в степени восприимчивости объясняются структурными различиями между сортами, которые в различной степени ограничивают рост патогенных микроорганизмов и их движение (Baccari, Lindow, 2011).

Растения оценивались по выраженности симптомов по шкале от 0 до 5, предложенной Guilhabert и Kirkpatrick (2005) (0 = бессимптомное, 1 = один или 2 листа с обожженными краями, 2 = дополнительно 2–3 листа с ожогом, 3 = ожог всех листьев и несколько черешков без листовой пластины, 4 = все листья с сильным ожогом и большое количество че-

и набор Qiagen (Dneasy plant mini Qiashredder, 2007). Для получения максимального результата в лизирующий буфер добавили 0,5% лаурил саркозина и 10% ПВП-40 (поливинилпирролидон).

Подсчет количества патогена в растительной ткани проводили в режиме реального времени с использованием мастермикса SYBR Green Mix (Applied Biosystems) на амплификаторе модели 7500 (Applied Biosystems) в соответствии с Daugherty et al. (2009). Все образцы тестировали в трех повторностях, а результаты были усреднены. Мы использовали праймеры HL5 и HL6, разработанные Francis et al. (2006). Для получения стандартной кривой ДНК *X. fastidiosa* выделяли из суспензий культивированных клеток, и часть этих суспензий использовали для посева методом серийного разбавления для установления взаимосвязи между числом клеток и содержанием ДНК. Число бактериальных клеток оценивали на основе количества ДНК *X. fastidiosa* в 1 мг всей ДНК, выделенной из ткани черешка.

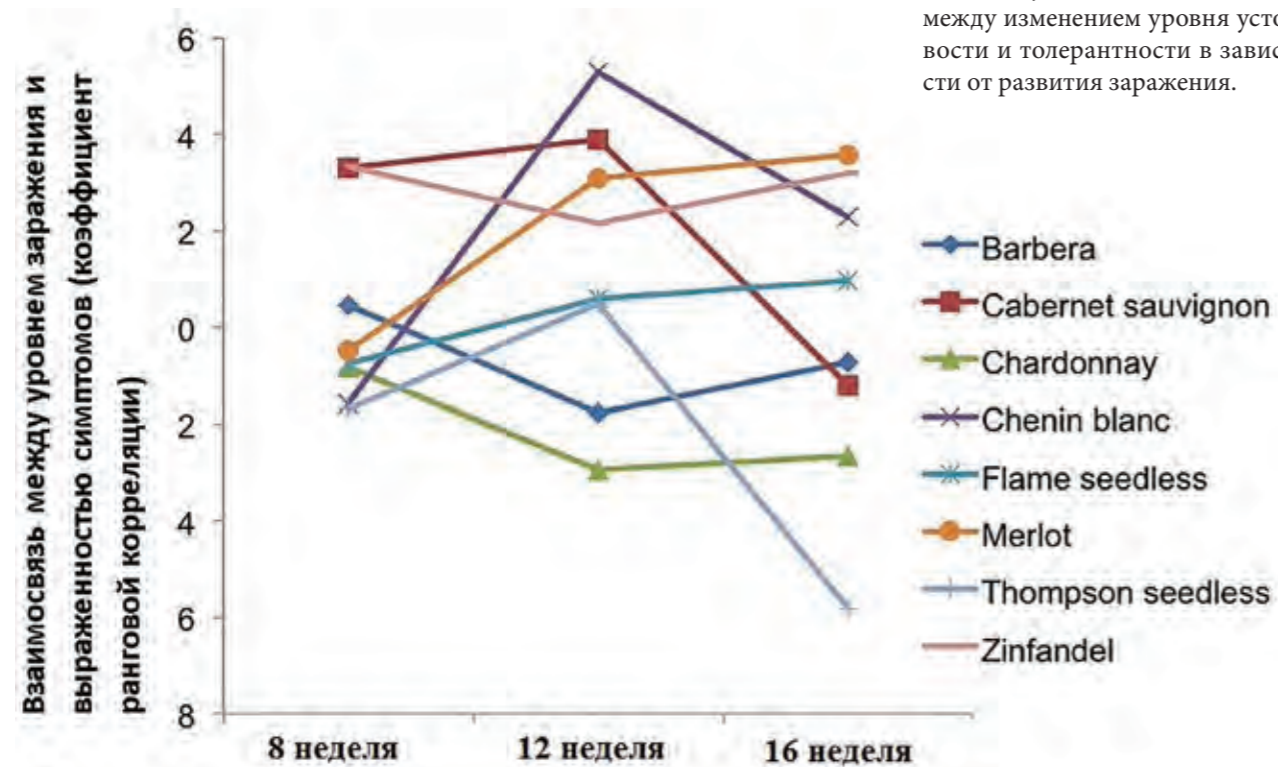
## Статистический анализ

Для проверки различий в выраженности симптомов использовали двухмерную обобщенную линейную модель со смешанными эффектами (GLM-модели) с распределением Пуассона. Сорт растений и период инкубации были установлены как фиксированные эффекты. Идентичность растений в повторностях рассматривали как случайный эффект. Эта структура модели была необходима для учета повторных измерений, сделанных на отдельных растениях, и ненормальных погрешностей.

Двухмерная модель повторных измерений со смешанными эффектами с диагональным повторным ковариантом использовали для сравнения уровня заражения в сортах винограда. Сорт и период инкубации (повторное измерение) рассматривали как категориальные переменные с фиксированным эффектом. Критерий Тьюки (критерий достоверно значимой разницы (HSD)) использовали для проведения сравнительного анализа пар по полученным результатам. Время инокуляции никак не влияло на результаты анализов (P.0.68 в обоих случаях), и поэтому оно было исключено из оконча-

Рис 2. Различия коэффициентов ранговой корреляции между выраженностью симптомов и между уровнем заражения на 10 сортах винограда в динамике

Fig. 2. Variations in Spearman rho correlations between symptom severity and infection level of the 10 evaluated grape cultivars over time



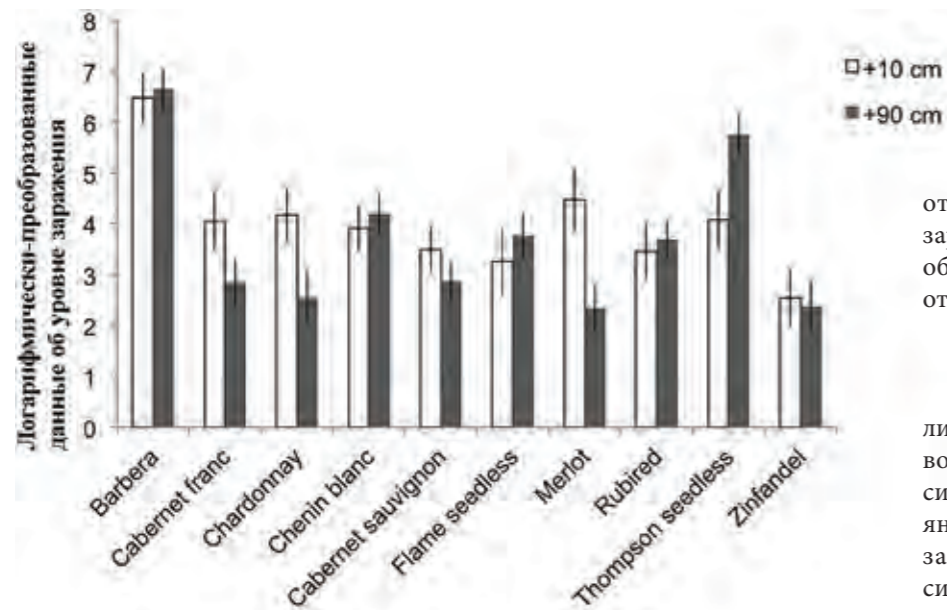


Рис. 3. Уровни зараженности в черешках каждого сорта, отобранных на расстоянии +10 см и +90 см выше места инокуляции. Белыми столбиками показаны уровни зараженности на расстоянии +10 см, черными – +90 см. Планки погрешностей —  $\pm 1$  стандартная ошибка

Fig. 3. Infection levels of the petioles collected from +10 and +90 cm above the point of inoculation (POI) for each cultivar. Open bars refer to the infection levels at 10-cm above the point of inoculation. Filled bars represent the infection level of the petiole samples taken 90-cm above the point of inoculation. Error bars represent  $\pm 1$  SE

тельных моделей. Логарифмическое преобразование данных об уровне зараженности дало наиболее точный подбор для кривой нормальности.

На 16-й неделе было проведено сравнение уровней зараженности в образцах черешков, отобранных на расстоянии +10 см и +90 см от места инокуляции. Ввиду зависимости между образцами с двумя черешками в каждом растении также использовали двухмерную модель повторных измерений со смешанными эффектами с диагональным повторным ковариантом для сравнения уровней зараженности в этот день. Первоначальная модель учитывала промежутки времени, сорт и место отбора образца (повторное измерение), а также взаимосвязь между сортом и местом отбора образца. Промежуток времени был удален из нашей окончательной модели, а первоначальный анализ не выявил существенного воздействия этой переменной ( $F_{1, 252,2} = 0,019$ ;  $P = 0,890$ ).

Корреляцию Пирсона (P. Corr.) использовали для оценки взаимосвязи между уровнем зараженности и выраженностью симптомов на сортах. Для этого была оценена взаимосвязь между средним уровнем зараженности и средней выраженностью

симптомов на каждом сорте ( $n = 10$  сортов). Анализ взаимосвязи проводили для каждого из трех временных отрезков.

#### Результаты

Уровень зараженности и выраженность симптомов значительно различались среди десяти тестируемых сортов и трех периодов инкубации. Несмотря на то, что продолжительность инкубации оказалась незначима, в целом наблюдалось снижение уровня зараженности в промежутке между 8-й и 16-й неделями, а выраженность симптомов при этом увеличивалась (рис. 1).

В некоторых сортах постоянно наблюдался высокий уровень зараженности (например, Barbera), в других же уровень зараженности со временем снижался (например, Zinfandel, Cabernet sauvignon и Flame seedless). Результаты повторных измерений по GLM-моделям показали значительные различия в выраженности симптомов у различных сортов.

Мы не выявили никаких значительных различий между уровнями зараженности на растениях 10 см и 90 см над местом инокуляции на 16-й неделе. Однако не только общий уровень зараженности зависел

от конкретного сорта, но уровень зараженности в двух точках отбора образцов также значительно зависел от сорта.

#### Обсуждение

Десять сортов винограда показали различную степень восприимчивости к заражению и выраженности симптомов болезни Пирса. Постоянная взаимосвязь между уровнем зараженности и выраженностью симптомов не была выявлена. Уровень зараженности был различен в различные промежутки времени. Взаимосвязь между выраженностью симптомов и уровнем зараженности четко наблюдалась только на 12-й неделе после инокуляции. Результаты исследования показывают, что устойчивость и толерантность сортов *Vitis vinifera* к заражению со временем меняется.

#### Литература

- May R.M., Anderson R.M. (1983) Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. Proc. R. Soc. B 219: 281-313.
- Laine A.-L., Burdon J.J., Dodds P.N., Thrall P.H. (2011) Spatial variation in disease resistance: from molecules to metapopulations. J. Ecol. 99: 96-112.
- Laine A.-L. (2007) Pathogen fitness components and genotypes differ in their sensitivity to nutrient and temperature variation in a wild plant-pathogen association. J. Evol. Biol. 20: 2371-2378.
- Goss E.M., Bergelson J. (2006) Variation in resistance and virulence in the interaction between *Arabidopsis thaliana* and a bacterial pathogen. Evolution 60: 1562-1573.
- Restif O., Koella J.C. (2004) Concurrent evolution of resistance and tolerance to pathogens. Am. Nat. 164: E90-E102.
- Anderson T.R. (1986) Plant losses and yield responses to monoculture of soybean cultivars susceptible, tolerant, and resistant to *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea*. Plant Dis. 70: 468-471.
- Kolmer J.A. (1996) Genetics of resistance to wheat rust. Ann. Rev. Phytopath. 34: 435-455.

- Leung H., Zhu Y., Revilla-Molina I., Fan J.X., Chen H., et al. (2003) Using genetic diversity to achieve sustainable rice disease management. Plant Dis 87: 1156-1169.

- Kover P.X., Schaal B.A. (2002) Genetic variation for disease resistance and tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 9: 11270-11274.

- Raberg L., Sim D., Read A.F. (2007) Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. Science 318: 812-184.

- McElhany P., Real L.A., Power A.G. (1995) Vector preference and disease dynamics: a study of barley yellow dwarf virus. Ecology 76: 444-457.

- Hopkins D.L., Purcell A.H. (2002) *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. Plant Dis. 86: 1056-1066.

- Purcell A.H. (1997) *Xylella fastidiosa*, a regional problem or global threat? J. Plant Pathol. 79: 99-105.

- Sorensen J.T., Gill R.J. (1996) A range extension of *Homalodisca coagulata* (Say) (Hemiptera: Clypeorrhyncha: Cicadellidae) to southern California. Pan Pacific Entomol. 72: 160-161.

- Blua M.J., Phillips P.A., Redak R.A. (1999) A new sharpshooter threatens both crops and ornamentals. Calif. Agric. 53: 22-25.

- Purcell A.H., Feil H. (2001) Glassy-winged sharpshooter. Pesticide Outlook 12: 199-203.

- Stenger D.C., Sisterson M.S., French R. (2010) Population genetics of *Homalodisca vitripennis* reovirus validates timing and limited introduction to California of its invasive insect host, the glassy-winged sharpshooter. Virology 407: 53-59.

- Chatterjee S., Almeida R.P.P., Lindow S. (2008) Living in two worlds: The plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. Ann. Rev. Phytopath. 46: 243-271.

- Tyson G.E., Stojanovic B.J., Kukulinski R.F., DiVittorio T.J., Sullivan M.L. (1985) Scanning electron microscopy of Pierce's disease bacterium in petiolar xylem of grape leaves. Phytopathology 75: 264-269.

- Fry S.M., Milholland R.D. (1990) Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. Phytopathology 80: 61-65.

- Newman K.L., Almeida R.P.P., Purcell A.H., Lindow S.E. (2003) Use of green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. Appl. Environ. Microbiol. 101: 1737-1742.

- Alves E., Marucci C.R., Lopes J.R.S., Leite B. (2004) Leaf symptoms on plum, coffee and citrus and the relationship with the extent of xylem vessels colonized by *Xylella fastidiosa*. Phytopathology 152: 291-297.

- Baccari C., Lindow S.E. (2011) Assessment of the process of movement of *Xylella fastidiosa* within susceptible and resistant grape cultivars. Phytopathology 101: 77-84.

- Krivanek A.F., Stevenson J.F., Walker M.A. (2005) Development and comparison of symptom indices for quantifying grapevine resistance to Pierce's disease. Phytopathology 95: 36-43.

- Krivanek A.F., Walker M.A. (2005) *Vitis* resistance to Pierce's disease is characterized by differential *Xylella fastidiosa* populations in stems and leaves. Phytopathology 95: 44-52.

- Fritsch F.B., Lin H., Walker M.A. (2008) Scanning electron microscopy reveals different response pattern of four *Vitis* genotypes to *Xylella fastidiosa* infection. Plant Dis. 92: 276-286.

- Hewitt W.B., Frazier N.W., Houston B.R. (1942) Pierce's disease of grapevine. Calif. Agric. Exp. Stn. Circ. 353: 1-32.

- Purcell A.H. (1974) Spatial patterns of Pierce's disease in the Napa Valley. Am. J. Enol. Viti. 25: 162-167.

- Raju B.C., Goheen A.C. (1981) Relative sensitivity of selected grapevine cultivars to Pierce's disease bacterial inoculations. Am. J. Enol. Viti. 32: 155-158.

- Hill B.L., Purcell A.H. (1997) Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. Phytopathology 87: 1197-1201.

- Daugherty M.P., Rashed A., Almeida R.P.P., Perring T.M. (2011) Vector preference for host infection status: Sharpshooter movement and *Xylella fastidiosa* transmission. Ecol. Entomol. 36: 654-662.

- Daugherty M.P., Lopes J., Almeida R.P.P. (2010) Vector within-host preference mediates transmission of a heterogeneously distributed pathogen. Ecol. Entomol. 35: 360-366.

- Daugherty M.P., Bosco D., Almeida R.P.P. (2009) Temperature mediates

vector transmission efficiency: Inoculum supply and plant infection dynamics. Ann. Appl. Biol. 155: 361-369.

- Feil H., Purcell A.H. (2001) Temperature-dependent growth and survival of *Xylella fastidiosa* in vitro and in potted grapevines. Plant Dis. 85: 1230-1234.

- Hill B.L., Purcell A.H. (1995) Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. Phytopathology 85: 1368-1372.

- Guilhabert M.R., Kirkpatrick B.C. (2005) Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: Hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. Mol. Plant Microbe Interact. 18: 848-856.

- Francis M., Lin H., Cabrera-La Rosa J., Doddapaneni H., Civerolo E.L. (2006) Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. Eur. J. Plant Pathol. 115: 203-213.

- Crawley M.J. (2009) The R Book. John Wiley & Sons, Chichester, UK.

- Fritsch F.B., Lin H., Walker M.A. (2007) *Xylella fastidiosa* population dynamics in grapevine genotypes differing in susceptibility to Pierce's disease. Am. J. Enol. Viti. 58: 326-332.

- Hopkins D.L. (1989) *Xylella fastidiosa* - xylem-limited bacterial pathogen of plants. Ann. Rev. Phytopath. 27: 271-90.

- Rashed A., Daugherty M.P., Almeida R.P.P. (2011) Grapevine genotype susceptibility to *Xylella fastidiosa* does not predict vector transmission success. Environ. Entomol. 40: 1192-1199.

- Hopkins D.L. (1981) Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles, and leaf veins. Phytopathology 71: 415-418.

- Sisterson M.S. (2008) Effects of insect-vector preference for healthy or infected plants on pathogen spread: insights from a model. J. Econom. Entomol. 101: 1-8.

- Blua M.J., Perring T.M. (1992) Effects of zucchini yellow mosaic virus on feeding behavior of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) alatae. Environ. Entomol. 21: 578-585.

- Mauck K.E., De Moraes C.M., Mescher M.C. (2010) Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 107: 3600-3605.

# RELATIVE SUSCEPTIBILITY of *Vitis vinifera* Cultivars to *Xylella fastidiosa* through Time

Arash Rashed<sup>1</sup>, Joyce Kwan<sup>1</sup>, Breanna Baraff<sup>1</sup>, Diane Ling<sup>1</sup>, Matthew P. Daugherty<sup>2</sup>, Nabil Killiny<sup>3</sup>, Rodrigo P.P. Almeida<sup>1</sup>

1. Department of Environmental Science, Policy, and Management, University of California, Berkeley, California, United States of America

2. Department of Entomology, University of California Riverside, Riverside, California, United States of America

3. Citrus Research and Education Center, Department of Entomology and Nematology, University of Florida, IFAS, Lake Alfred, Florida, United States of America

PLoS ONE 8(2) e55326 doi: 10.1371/journal.pone.0055326

## Introduction

Variation in susceptibility to pathogenic infections is a function of the host genetic structure (May, Anderson, 1983), however, constant genotype-by-environment interactions can influence the degree of disease expression in host plants (Goss, Bergelson, 2006). Examples of these environmental variables include, but are not limited to, ambient incubation temperature, host nutrient status (Laine, 2007), and host age (Laine et al., 2011). In natural circumstances, when variation in susceptibility exists among individuals in a given population, pathogens would effectively act as selective agents because they are expected to impact fitness of individuals differentially (Restif, Koella, 2004). In agricultural systems, however, among-individual variability may be minimized by the use of a particular cultivar, where a certain genotype is desirable because of its associated economic value. In practice this can result in significant yield loss if the plant genotype is susceptible to pathogens (Anderson, 1986; Kolmer, 1996; Leung, 2003). However, post-infection plant resistance can be achieved through defensive mechanisms that either negatively impact the

pathogen by limiting its multiplication and reducing its population (i.e. resistance), or by limiting its impact on host phenotype (i.e. tolerance). Notably, levels of resistance to infection and tolerance of infection among different host types are not necessarily correlated with each other (Restif, Koella, 2004; Kover, Schaal, 2002; Raberg et al., 2007).

The relationship between pathogen quantity (hereafter infection level) and symptom severity becomes even more crucial in vector-borne disease complexes, where the outcome of pathogen-host interactions is expected to also influence vector host choice and feeding behavior, and subsequently disease epidemiology (McElhany et al., 1995). *Xylella fastidiosa* is a vector-borne xylem-limited bacterium that infects a wide range of host plants, including several economically important agricultural crops (Hopkins, Purcell, 2002; Purcell, 1997). In grapevines, *X. fastidiosa* causes Pierce's disease, which increased in prevalence in California following the establishment of an invasive leafhopper vector *Homalodisca vitripennis* (Hemiptera: Cicadellidae) (Sorensen, Gill, 1996; Blua et al., 1999; Purcell, Feil, 2001; Stenger et al., 2010).

*Xylella fastidiosa* is inoculated into a healthy grapevine during insect xylem-sap feeding, then multiplies and spreads throughout the host by colonizing xylem vessels (Chatterjee et al., 2008). Bacterial colonization of the xylem network eventually leads to occlusion of vessels, limiting water flow through the plant (Tyson et al., 1985; Fry, Milholland, 1990; Newman et al., 2003; Alves et al., 2004). Although mechanism of pathogenicity has not been fully elucidated, water stress due to xylem blockage is an important trigger for Pierce's disease symptoms (Baccari, Lindow, 2011). Typically, Pierce's disease symptoms include progressive leaf scorch, irregular cane maturation, 'match-stick' petioles (petiole with no leaf blade), dieback of the apex, and ultimately plant death (Purcell, 1997; Krivanek et al., 2005).

Different species of *X. fastidiosa* host plants vary in their susceptibility to infection; plum and coffee plants appear to be relatively more susceptible to infection than citrus, in that a higher proportion of their xylem vessels become colonized by the pathogen (Alves et al., 2004). Similarly, variation in susceptibility has been reported among grape

species (Krivanek et al., 2005; Krivanek, Walker, 2005) with *Vitis vinifera* genotypes being more susceptible to *X. fastidiosa* infection than other *Vitis* spp. (Fritschi et al., 2008).

Within *V. vinifera*, different cultivars also exhibit variation in susceptibility to Pierce's disease Krivanek et al., 2005; Hewitt et al., 1942; Purcell, 1974; Raju, Goheen, 1981); this variation has been attributed to among-genotype differences in bacterial quantities and the rate of xylem occlusion along the stem tissue (Fry, Milholland, 1990; Baccari, Lindow, 2011; Krivanek et al., 2005). The importance of an objective quantification for the relationship between infection level and symptom severity of different *V. vinifera* cultivars became more evident in light of studies showing, i) the correlation between host infection level and vector transmission efficiency Hill, Purcell, 1997), and ii) vector non-random preference based on host symptoms status (Daugherty et al., 2011).

Vector exposure to higher bacterial quantities can increase the probability of successful pathogen acquisition, and subsequently, increase its overall transmission efficiency (Hill, Purcell, 1997; Daugherty et al., 2010). In addition, vec-

tor preference for asymptomatic hosts (Stenger et al., 2010; Daugherty et al., 2011) means that tolerant genotypes – which can host high bacterial quantities and yet exhibit limited disease symptoms – may potentially function as a pathogen source for vineyards containing more susceptible cultivars (MP Daugherty, unpublished results).

## Materials and Methods

Two-bud cuttings of 10 grape cultivars were rooted in a mix of perlite and vermiculite (1:1) on a misting bench in the Oxford Tract greenhouse facility at the University of California, Berkeley. This collection included 8 wine grape cultivars (cv. Barbera, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Chenin Blanc, Merlot, Rubired, Zinfandel) and 2 table grape cultivars (cv. Flame Seedless, Thompson Seedless). These varieties were selected because they are among the most commonly grown cultivars in California vineyards and elsewhere. Certified pathogen free dormant cuttings of each cultivar were

## This study was conducted to compare infection level and symptom severity in 10 grapevine cultivars that are commonly grown in California and in other viticultural regions across the globe.

provided by Foundation Plant Services, University of California, Davis. Uninfected certified cuttings of different cultivars never developed disease symptom nor tested positive for *X. fastidiosa*. Following root development, cuttings were transplanted into 5-cm pots filled with Supersoil potting soil (Rod McLellan Company, San Mateo, CA, USA). Later, these rooted grapevine cuttings were transferred into 1-gallon pots filled with a mix of Supersoil (50%), sand (25%), and vermiculite (25%), and maintained in an insect free glasshouse in the same facility. Pathogen inoculum was prepared by growing *X. fastidiosa* subspecies *fastidiosa* (STL strain) cells on PWG medium and suspending them in SCP buffer (Hill, Purcell, 1995). Twenty microliter of this suspension was used to mechanically needle-inoculate 6-month old grapevines at the stem base, in late December 2009. Inoculations were performed in 2 temporal blocks. Ten plants of each of the 10 cultivars were

can greatly influence bacterial population growth and symptom severity (Feil, Purcell, 2001; Hill, Purcell, 1995). This study was conducted to compare infection level and symptom severity in 10 grapevine cultivars that are commonly grown in California and in other viticultural regions across the globe. Resistance and tolerance were evaluated in each cultivar at successive time points to see whether these traits are correlated and whether their relative levels change as infection progresses.

Two-bud cuttings of 10 grape cultivars were rooted in a mix of perlite and vermiculite (1:1) on a misting bench in the Oxford Tract greenhouse facility at the University of California, Berkeley. This collection included 8 wine grape cultivars (cv. Barbera, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Chardonnay, Chenin Blanc, Merlot, Rubired, Zinfandel) and 2 table grape cultivars (cv. Flame Seedless, Thompson Seedless). These varieties were selected because they are among the most commonly grown cultivars in California vineyards and elsewhere. Certified pathogen free dormant cuttings of each cultivar were

inoculated in each block. Experimental plants were regularly trimmed from the side-shoots and pruned to stay approximately 120-150 cm in height. During the experiment, temperature was set to 22-26 °C. Lighting (14:10, L:D) was supplemented by 1000 Watt, PL 2000 greenhouse lights (P.L. Light Systems Inc., Lincoln, ON, Canada). Plants were sampled every 4 weeks, starting 8 weeks post-inoculation, for 3 consecutive months. Hereafter, the period between inoculation and sampling date is referred to as 'incubation time'. At each of the three incubation times a petiole was removed from +10-cm above the point of inoculation. In the last incubation period (week 16), samples were removed from both +10 and +90-cm above the point of inoculation. Sampling plants at the point of inoculation and also approximately 90-cm above the point of inoculation would allow detecting potential movement and new colonization of succulent vine tissue; it has been suggested that variations in susceptibility can be due to structural differences among plant cultivars, which restricts pathogen growth and movement to various degrees (Baccari, Lindow, 2011). Plants were scored for symptoms, following a 0 to 5 scale proposed by Guilhabert and Kirkpatrick (2005) (0 = asymptomatic, 1 = One or 2 leaves with scorched margins, 2 = Two to 3 more developed scorched leaves, 3 = All leaves scorched and a few match-stick petioles, 4 = All leaves heavily scorched and many match-stick petioles, 5 = A few leaves only present at the end of the cane). Symptom scores were recorded at the same time as petiole samplings in each incubation time (weeks 8, 12, and 16). Collected petioles were stored at -80 °C for later bacterial quantification.

## Bacterial Quantification

Petiole samples were frozen in liquid nitrogen and ground using mortar and pestle. A robotic workstation QIAcube and a QiaGen extraction kit (Dneasy plant mini with QiaShredder, 2007), was then used to perform all DNA extractions. To maximize yield, the lysis buffer was supplemented with 0.5% lauryl sarcosine and 10% PVP-40 (polyvinylpyrrolidone). Pathogen absolute quantification within plant tissue was performed with SYBR Green Mix (Applied Biosystems) on a 7500 real-time thermocycler (Applied Biosystems)

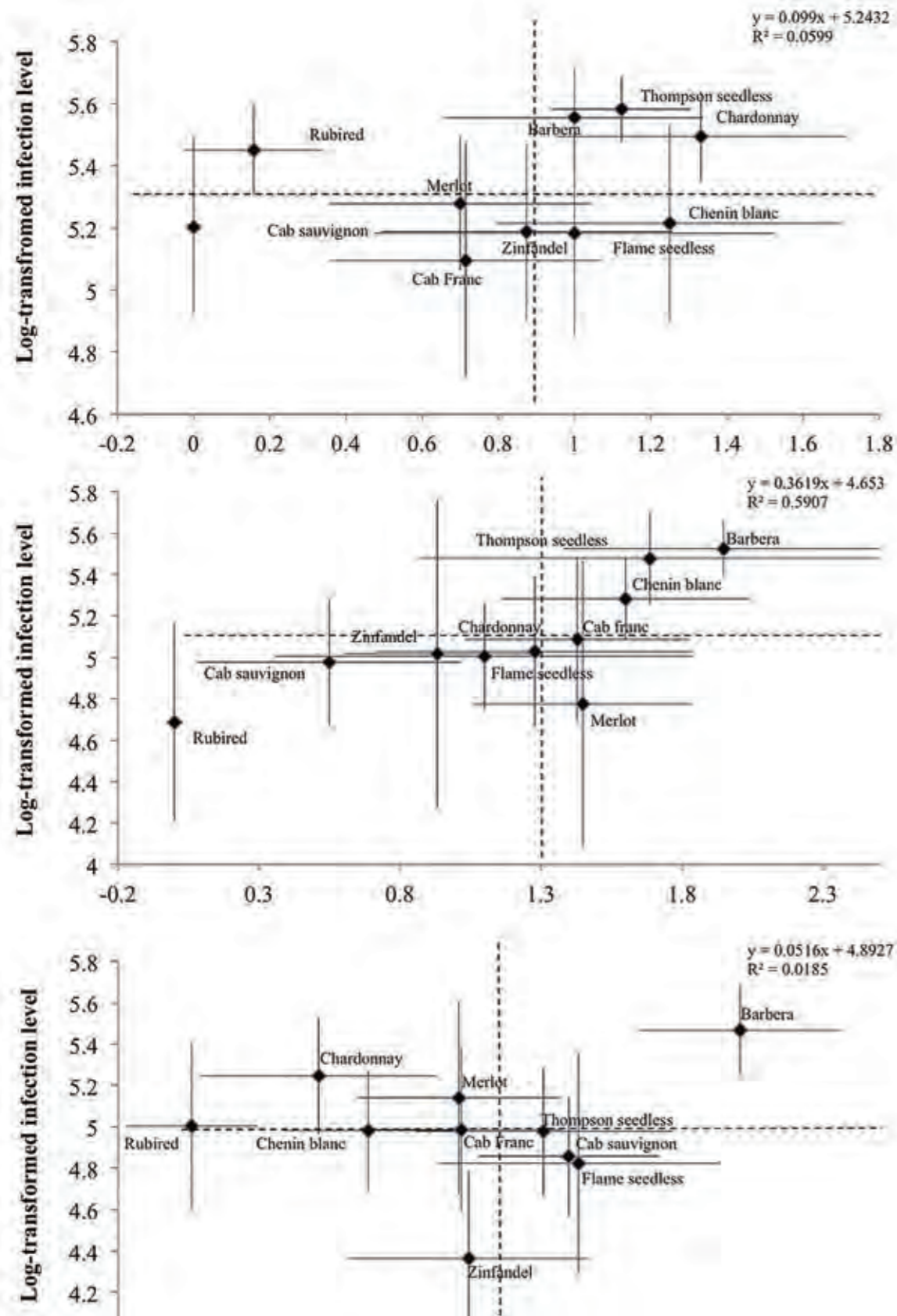


Fig. 1. Categorization of *Vitis vinifera* cultivars in relation to their *X. fastidiosa* infection level and symptom severity means at A) 8, B) 12, and C) 16 weeks post inoculation. Error bars represent 95% confidence intervals

Рис. 1. Категоризация сортов *Vitis vinifera* по уровню их зараженности *X. fastidiosa* и выраженности симптомов на А) 8-й В) 12-й и С) 16-й неделях после инокуляции. Планки погрешностей составляют 95% уровень доверия

according to Daugherty et al. (2009); all samples were run in triplicate and results were averaged. We used primers HL5 and HL6 designed by Francis et al. (2006). To obtain the standard curve, *X. fastidiosa* DNA was extracted from suspensions of cultured cells while portions of these suspensions were used to plate serial dilutions to correlate the number of cells with the content of DNA. Bacterial cell numbers were estimated based on *X. fastidiosa* DNA quantity within 1mg of total extracted DNA from petiole tissue.

#### Statistical Analysis

To test for differences in symptom scores a two-way generalized linear mixed effects model (GLMM) with Poisson error distribution was used. Plant cultivar and disease incubation time were defined as fixed effects. Plant replicate identity was treated as a random effect. This model structure was needed to account for the repeated measures made on individual plants and non-normal error.

A two-way repeated-measures mixed-effects model, with diagonal repeated covariance, was used to compare infection level among grape cultivars. Cultivar and incubation time (repeat-

ed measure) were treated as fixed effect categorical variables. Tukey (Honestly Significant Difference (HSD)) was used for any post hoc pairwise comparisons. Inoculation block did not have a significant effect in either analysis (P.0.68 in both), and was therefore dropped from final models. Log-transformed infection levels provided the closest fit

#### Infection level varied significantly among the 10 evaluated cultivars and across three incubation times.

to the normality curve. On week 16, infection levels of the petioles sampled at +10-cm and +90-cm from the point of inoculation were compared. Due to the lack of independence between the two-petiole samples within each plant, a two-way repeated-measures mixed-effects model with diagonal repeated covariance was also used to compare infection levels at this date. Initial model included block, grape cultivar, and sampling position (repeated measure) and cultivar-by-sampling position interaction. Block was removed from our final model, as initial analysis detected no significant effect of this variable ( $F_{1, 252.2} = 0.019$ ;  $P = 0.890$ ). Pearson's cor-

relation (P. Corr.) was used to evaluate the relationship between infection level and symptom severity among cultivars. To do this, mean infection level was correlated with mean symptom severity for each cultivar ( $n=10$  cultivars). Separate correlations were conducted at each of the three time points.

#### Results

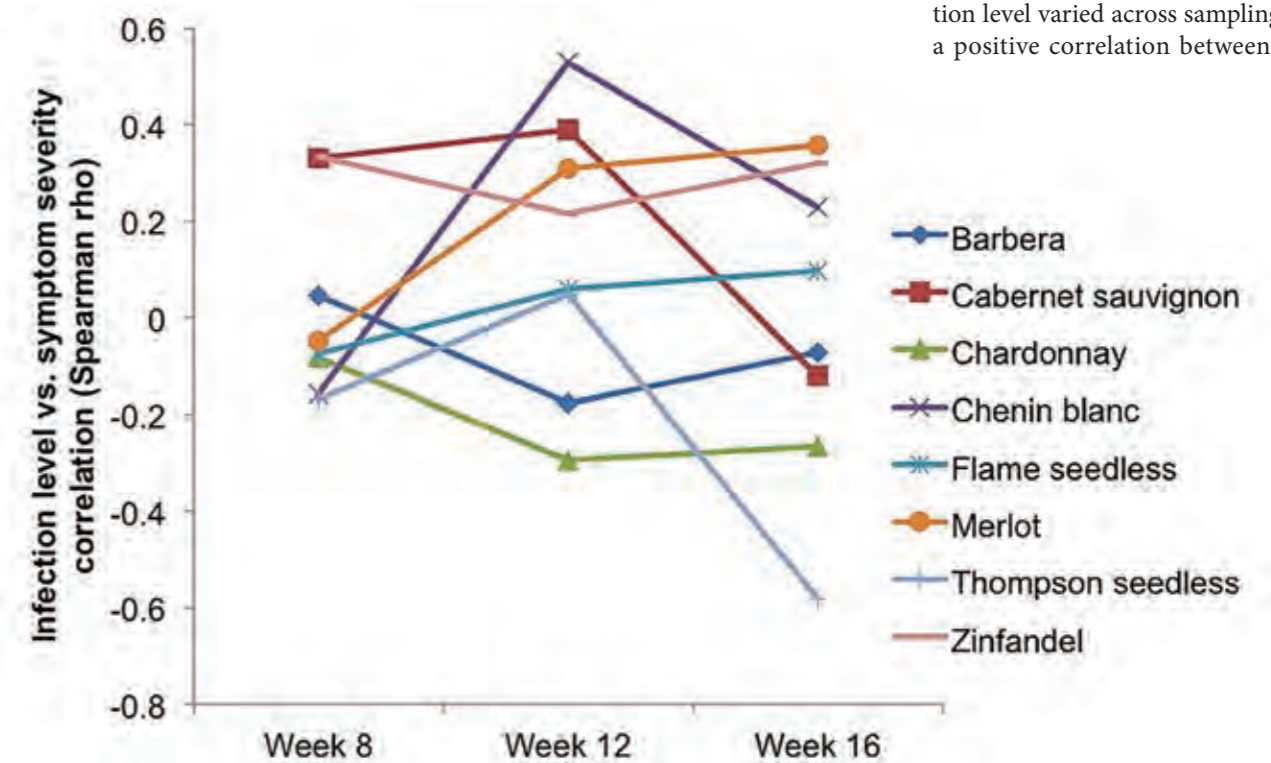
Infection level varied significantly among the 10 evaluated cultivars and across three incubation times. Although incubation time-by-cultivar interaction was non-significant, collectively, average cultivar infection levels decreased between weeks 8 and 16, while symptom severity increased (Fig. 1). Some cultivars had consistently high infection levels (e.g., Barbera), and others showed a decrease in infection level over time (e.g., Zinfandel, Cabernet sauvignon, and Flame seedless). Results of the repeated measures GLMM showed significant differences in symptom score among cultivars and incubation times. Yet, there were differences in symptom severity changes over time among the evaluated cultivars.

#### Discussion

The 10 grapevine cultivars tested in this study showed variability in their susceptibility to infection as well as Pierce's disease symptom expression. Cultivars did not show a consistent pattern of susceptibility as the correlation between symptom expression and infection level varied across sampling dates; a positive correlation between symp-

Fig. 2. Variations in Spearman rho correlations between symptom severity and infection level of the 10 evaluated grape cultivars over time

Рис. 2. Различия коэффициентов ранговой корреляции между выраженностью симптомов и между уровнем заражения на 10 сортах винограда в динамике



tom score and infection level among the evaluated cultivars was observed only on week 12 post-inoculation. This finding suggests that within *V. vinifera*, the degree of cultivar resistance and tolerance varies over time.

#### References

1. May R.M., Anderson R.M. (1983) Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. Proc. R. Soc. B 219: 281-313.
2. Laine A.-L., Burdon J.J., Dodds P.N., Thrall P.H. (2011) Spatial variation in disease resistance: from molecules to metapopulations. J. Ecol. 99: 96-112.
3. Laine A.-L. (2007) Pathogen fitness components and genotypes differ in their sensitivity to nutrient and temperature variation in a wild plant-pathogen association. J. Evol. Biol. 20: 2371-2378.
4. Goss E.M., Bergelson J. (2006) Variation in resistance and virulence in the interaction between *Arabidopsis thaliana* and a bacterial pathogen. Evolution 60: 1562-1573.

5. Restif O., Koella J.C. (2004) Concurrent evolution of resistance and tolerance to pathogens. Am. Nat. 164: E90-E102.
6. Anderson T.R. (1986) Plant losses and yield responses to monoculture of soybean cultivars susceptible, tolerant, and resistant to *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea*. Plant Dis. 70: 468-471.
7. Kolmer J.A. (1996) Genetics of resistance to wheat rust. Ann. Rev. Phytopath. 34: 435-455.
8. Leung H., Zhu Y., Revilla-Molina I., Fan J.X., Chen H., et al. (2003) Using genetic diversity to achieve sustainable rice disease management. Plant Dis 87: 1156-169.
9. Kover P.X., Schaal B.A. (2002) Genetic variation for disease resistance and tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 9: 11270-11274.
10. Raberg L., Sim D., Read A.F. (2007) Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. Science 318: 812-184.

11. McElhany P., Real L.A., Power A.G. (1995) Vector preference and disease dynamics: a study of barley yellow dwarf virus. Ecology 76: 444-457.
12. Hopkins D.L., Purcell A.H. (2002) *Xylella fastidiosa*: cause of Pierce's disease of grapevine and other emergent diseases. Plant Dis. 86: 1056-1066.
13. Purcell A.H. (1997) *Xylella fastidiosa*, a regional problem or global threat? J. Plant Pathol. 79: 99-105.
14. Sorensen J.T., Gill R.J. (1996) A range extension of *Homalodisca coagulata* (Say) (Hemiptera: Clypeorrhyncha: Cicadellidae) to southern California. Pan Pacific Entomol. 72: 160-161.
15. Blua M.J., Phillips P.A., Redak R.A. (1999) A new sharpshooter threatens both crops and ornamentals. Calif. Agric. 53: 22-25.
16. Purcell A.H., Feil H. (2001) Glassy-winged sharpshooter. Pesticide Outlook 12: 199-203.
17. Stenger D.C., Sisterson M.S., French R. (2010) Population genetics of *Homalodisca vitripennis* reovirus validates timing and limited introduction to California of its invasive insect host, the glassy-winged sharpshooter. Virology 407: 53-59.
18. Chatterjee S., Almeida R.P.P., Lindow S. (2008) Living in two worlds: The plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. Ann. Rev. Phytopath. 46: 243-271.
19. Tyson G.E., Stojanovic B.J., Kukulinski R.F., DiVittorio T.J., Sullivan M.L. (1985) Scanning electron microscopy

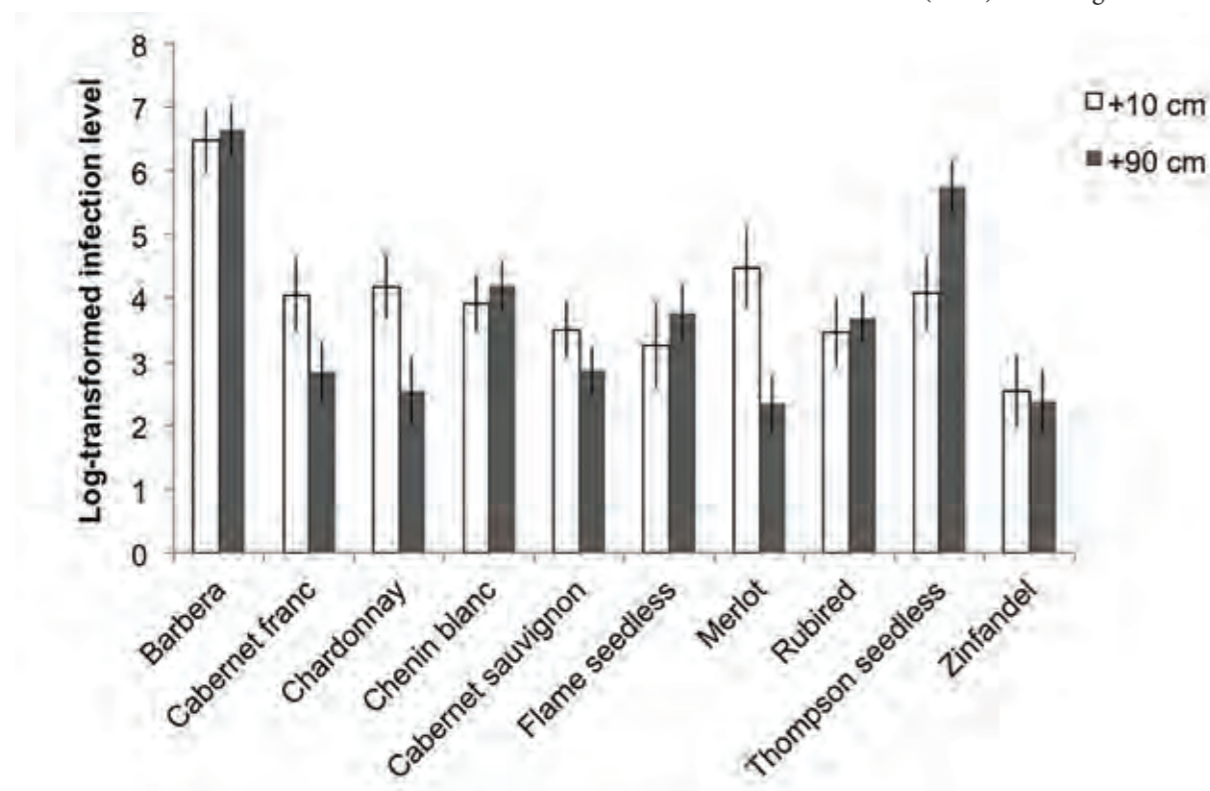
- of Pierce's disease bacterium in petiolar xylem of grape leaves. Phytopathology 75: 264-269.
20. Fry S.M., Milholland R.D. (1990) Multiplication and translocation of *Xylella fastidiosa* in petioles and stems of grapevine resistant, tolerant, and susceptible to Pierce's disease. Phytopathology 80: 61-65.
21. Newman K.L., Almeida R.P.P., Purcell A.H., Lindow S.E. (2003) Use of green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis vinifera*. Appl. Environ. Microbiol. 101: 1737-1742.
22. Alves E., Marucci C.R., Lopes J.R.S., Leite B. (2004) Leaf symptoms on plum, coffee and citrus and the relationship with the extent of xylem vessels colonized by *Xylella fastidiosa*. Phytopathology 152: 291-297.
23. Baccari C., Lindow S.E. (2011) Assessment of the process of movement of *Xylella fastidiosa* within susceptible and resistant grape cultivars. Phytopathology 101: 77-84.
24. Krivanek A.F., Stevenson J.F., Walker M.A. (2005) Development and comparison of symptom indices for quantifying grapevine resistance to Pierce's disease. Phytopathology 95: 36-43.
25. Krivanek A.F., Walker M.A. (2005) *Vitis* resistance to Pierce's disease is characterized by differential *Xylella fastidiosa* populations in stems and leaves. Phytopathology 95: 44-52.
26. Fritsch F.B., Lin H., Walker M.A. (2008) Scanning electron microscopy reveals different response pattern of four *Vitis* genotypes to *Xylella fastidiosa* infection. Plant Dis. 92: 276-286.
27. Hewitt W.B., Frazier N.W., Houston B.R. (1942) Pierce's disease of grapevine. Calif. Agric. Exp. Stn. Circ. 353: 1-32.

28. Purcell A.H. (1974) Spatial patterns of Pierce's disease in the Napa Valley. Am. J. Enol. Viti. 25: 162-167.
29. Raju B.C., Goheen A.C. (1981) Relative sensitivity of selected grapevine cultivars to Pierce's disease bacterial inoculations. Am. J. Enol. Viti. 32: 155-158.
30. Hill B.L., Purcell A.H. (1997) Populations of *Xylella fastidiosa* in plants required for transmission by an efficient vector. Phytopathology 87: 1197-1201.
31. Daugherty M.P., Rashed A., Almeida R.P.P., Perring T.M. (2011) Vector preference for host infection status: Sharpshooter movement and *Xylella fastidiosa* trans-mission. Ecol. Entomol. 36: 654-662.
32. Daugherty M.P., Lopes J., Almeida R.P.P. (2010) Vector within-host preference mediates transmission of a heterogeneously distributed pathogen. Ecol. Entomol. 35: 360-366.
33. Daugherty M.P., Bosco D., Almeida R.P.P. (2009) Temperature mediates vector transmission efficiency: Inoculum supply and plant infection dynamics. Ann. Appl. Biol. 155: 361-369.
34. Feil H., Purcell A.H. (2001) Temperature-dependent growth and survival of *Xylella fastidiosa* in vitro and in potted grapevines. Plant Dis. 85: 1230-1234.
35. Hill B.L., Purcell A.H. (1995) Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. Phytopathology 85: 1368-1372.
36. Guilhabert M.R., Kirkpatrick B.C. (2005) Identification of *Xylella fastidiosa* antivirulence genes: Hemagglutinin adhesins contribute to *X. fastidiosa* biofilm maturation and colonization and attenuate virulence. Mol. Plant Microbe Interact. 18: 848-856.

37. Francis M., Lin H., Cabrera-La Rosa J., Doddapaneni H., Civerolo E.L. (2006) Genome-based PCR primers for specific and sensitive detection and quantification of *Xylella fastidiosa*. Eur. J. Plant Pathol. 115: 203-213.
38. Crawley M.J. (2009) The R Book. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
39. Fritsch F.B., Lin H., Walker M.A. (2007) *Xylella fastidiosa* population dynamics in grapevine genotypes differing in susceptibility to Pierce's disease. Am. J. Enol. Viti. 58: 326-332.
40. Hopkins D.L. (1989) *Xylella fastidiosa* – xylem-limited bacterial pathogen of plants. Ann. Rev. Phytopath. 27: 271-90.
41. Rashed A., Daugherty M.P., Almeida R.P.P. (2011) Grapevine genotype susceptibility to *Xylella fastidiosa* does not predict vector transmission success. Environ. Entomol. 40: 1192-1199.
42. Hopkins D.L. (1981) Seasonal concentration of the Pierce's disease bacterium in grapevine stems, petioles, and leaf veins. Phytopathology 71: 415-418.
43. Sisterson M.S. (2008) Effects of insect-vector preference for healthy or infected plants on pathogen spread: insights from a model. J. Econom. Entomol. 101: 1-8.
44. Blua M.J., Perring T.M. (1992) Effects of zucchini yellow mosaic virus on feeding behavior of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) alatae. Environ. Entomol. 21: 578-585.
45. Mauck K.E., De Moraes C.M., Mescher M.C. (2010) Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 107: 3600-3605.

Fig. 3. Infection levels of the petioles collected from +10 and +90 cm above the point of inoculation (POI) for each cultivar. Open bars refer to the infection levels at 10-cm above the point of inoculation. Filled bars represent the infection level of the petiole samples taken 90-cm above the point of inoculation. Error bars represent  $\pm 1$  SE

Рис. 3. Уровни зараженности в черешках каждого сорта, отобранных на расстоянии +10 см и +90 см выше места инокуляции. Белыми столбиками показаны уровни зараженности на расстоянии +10 см, черными – +90 см. Планки погрешностей —  $\pm 1$  стандартная ошибка



# ЧЕРЕДА ДВАЖДЫПЕРИСТАЯ *VIDENS BIPINNATA* L. — вид карантинного сорного растения из нового Перечня карантинных объектов, отсутствующий на территории РФ

Е.М. Волкова, заведующая лабораторией сорных растений ФГБУ «ВНИИКР»

Ю.Р. Кочнев, м.н.с. лаборатории сорных растений ФГБУ «ВНИИКР»

Череда дваждыперистая *Bidens bipinnata* L. согласно приказу Минсельхоза России от 15.12.2014 № 501 «Об утверждении Перечня карантинных объектов» является карантинным сорным растением, отсутствующим на территории РФ. Ранее череда дваждыперистая некоторое время находилась в «Перечне вредителей, болезней растений и сорняков, имеющих карантинное значение для СССР», утвержденном 6 августа 1986 г., в III группе (потенциально опасные виды).

Череда дваждыперистая — однолетнее сорное травянистое растение семейства Asteraceae. Происходит из Северной Америки.

Встречается на всех континентах (<http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Bidens+bipinnata>):

**Азия:** Индия, Йемен, Китай, Непал, Южная Корея, Япония.

**Америка:** Ангилья, Бразилия, Венесуэла, Канада, Колумбия, Коста-Рика, Никарагуа, США, Эквадор.

**Африка:** Бенин, Ботсвана, Буркина-Фасо, Гана, Гвинея, Египет,

Кабо-Верде, Камерун, Коморские острова, Конго, Кот-д'Ивуар, Мадагаскар, Мали, Намибия, Сенегал, Судан, Экваториальная Гвинея.

Европа: Австрия, Великобритания, Германия, Испания, Италия, Франция, Швейцария, Швеция.

**Океания:** Австралия, Новая Каледония, Папуа — Новая Гвинея.

Вид имеет высокий инвазивный потенциал, особенно широко распространен в нарушенных местообитаниях, таких как обрабатываемые поля, пустыри, обочины дорог, вдоль

железнодорожных путей, по берегам рек и так далее.  
Для исследования морфологии растения череды дваждыперистой выращивали в лаборатории сорных растений ФГБУ «ВНИИКР» начиная с февраля 2015 года.

Для исследования морфологии растения череды дваждыперистой выращивали в лаборатории сорных растений ФГБУ «ВНИИКР» начиная с февраля 2015 года.

Для исследования морфологии растения череды дваждыперистой выращивали в лаборатории сорных растений ФГБУ «ВНИИКР» начиная с февраля 2015 года.

Рис. 1. Цветущее растение



Fig. 3. Stem

Рис. 3. Стебель



Fig. 4. Leaves

Рис. 4. Листья

железнодорожных путей, по берегам рек и так далее.

Для исследования морфологии растения череды дваждыперистой выращивали в лаборатории сорных

**Корневая система** череды дваждыперистой состоит из разветвленного стержневого корня.

**Стебель** прямой, голый, ветвящийся, зеленый (некоторые участки

**Череда дваждыперистая — однолетнее сорное травянистое растение семейства Asteraceae. Происходит из Северной Америки.**

растений ФГБУ «ВНИИКР» начиная с февраля 2015 года. Череда дваждыперистая — растение короткого дня. В природе, в частности в штате Иллинойс США, период цветения длится с конца лета до начала осени.

В тепличных условиях часть посеянных плодов развилась в низкорослые растения, которые зацвели и дали плоды уже ранней весной (рис. 1). Другая часть плодов, высеянных в то же время, дала начало растениям (рис. 2), которые развились в крупные нецветущие экземпляры высотой до 160 см.

стебля могут быть окрашены в красновато-фиолетовый цвет), у основания б.м. округлый в диаметре до 1 см, выше по стеблю четырехгранный, сужающийся (рис. 3). Высота растения в среднем достигает 60–150 см.

**Листья** супротивные, черешковые, напоминают листья петрушки. Длина листьев может достигать 30 см, черешок составляет 1/4–1/3 часть длины листа (рис. 4). Пластинки крупных листьев часто имеют почти одинаковую длину и ширину.

Черешок, жилки и край листа очень коротко опушены простыми волосками (рис. 5).

Рис. 5. Опушение по краю листа

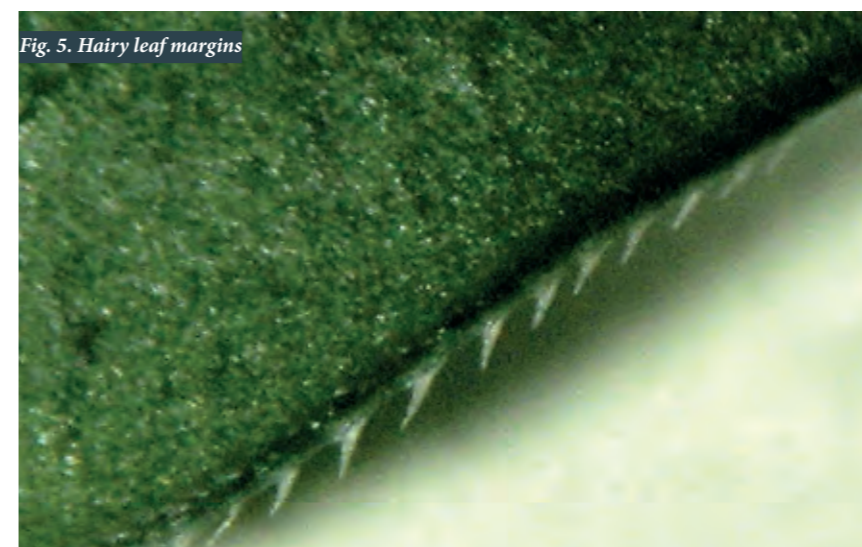


Fig. 5. Hairy leaf margins

Пластинка листа дважды перисто-рассеченная, некоторые листья на крупных растениях имеют на отдельных сегментах третий порядок рассечения (рис. 6).

Отдельные сегменты (доли листа) б.м. овально-яйцевидные, ланцетные с пильчатым краем, сужающиеся к основанию и верхушке. Верхушка обычно тупозаостренная (рис. 7).

Стебли заканчиваются отдельными соцветиями-корзинками на длинных цветоносах (рис. 1).

**Соцветие-корзинка.** Обертка корзинки состоит из одного ряда отогнутых наружу листочков. Цветки в корзинке расположены в пазухах прицветных листочков (чешуек), длина которых больше длины листочков корзинки (рис. 8).

Соцветие может состоять только из трубчатых цветков. Но обычно в корзинке по краю развиваются от 1 до 5 желтых язычковых цветков, в центре расположены многочисленные трубчатые желтые цветки (рис. 9, 10).

**Плоды.** После цветения каждое соцветие превращается в соплодие шаровидной формы. Длинные узкие плоды (семянки) торчат наружу от центра во всех направлениях (рис. 11).

Рис. 6. Третий порядок рассечения пластинки листа



Fig. 6. Three-fold pinnatisected leaf blade



После созревания плоды легко осыпаются (рис. 12) или, зацепившись прицепками за прохожих, животных и т.п., переносятся на дальние расстояния.

Как и у многих черед с игольчатыми (длинными и узкими) плодами, у череды дваждыперистой наблюдается гетерокарпия: наличие длинных и коротких плодов.

**Длинные плоды.** Плоды прямые, не уплощенные (ширина обычно равна толщине), иногда слегка изогнутые (рис. 13).

Поверхность продольно-ребристая (8 ребер). Часто 4 наиболее выпуклых ребра чередуются с 4 менее выпуклыми и более узкими. Цвет семян темно-серый, у вершины и основания плода соломенно-желтый или белый. На вершине плода формируются 2–4, обычно 3 светлых ости, каждый остевидный отросток имеет направленные к основанию ости зубцы (рис. 14). Ости расходятся под острым углом, длина остей около 3 мм. У верхушки плод сужается, ребра здесь имеют светлую окраску.

Размеры семян: длина вместе с остями 14–20 мм (ср. 17 мм), ширина 0,8–1,2 (ср. 1 мм), толщина 0,8–1,2 (ср. 1 мм). Размеры плодов (в частности почти одинаковые ширина и толщина) являются одним из важных диагностических признаков, отличающих плоды этого вида от плодов других видов череды с «игольчатыми» плодами, в том числе от плодов череды волосистой, которые по строению уплощенные, т.е. ширина больше



Fig. 7. Shapes of the blade lobes

Рис. 7. Форма сегментов пластинки

толщины примерно 1,5–2 раза. Измерение ширины и толщины следует проводить в центральной части плода, т.к. к вершине и основанию плоды несколько сужаются.

Плодовый рубчик округлый или овальный, светлый, расположен в основании плода (рис. 15).

По всей длине плода на поверхности расположены беловато-желтые плоские почти невозвышающиеся над поверхностью бородавочки, которые выглядят скорее как пятнышки (рис. 16).

Волоски малочисленные, короткие (длиной около 0,1 мм). Расположены, как правило, у основания и верхушки плода.

Рис. 8. Листочек корзинки (1), прицветные листочки (чешуйки) (2, 3, 4)



Fig. 8. Flower disk leaves (1), bracts (2, 3, 4)

В небольшом количестве на некоторых растениях образуются «короткие» плоды-семянки, они формируются из краевых цветков и имеют несколько другую морфологию.

**Короткие плоды.** В отличие от «длинных» семян, они имеют коричневатый цвет (рис. 17). Размеры семян: длина с остями 8–12 мм (ср. 10,3 мм), ширина и толщина так же, как у «длинных» семян, около 1 мм. Количество остей — 3, их длина 2–3 мм. По всей поверхности плоды имеют светлые «пятнышки» — плоские бородавочки и короткие редко расположенные волоски (рис. 18).

В работе использованы фотографии Е.М. Волковой.

Авторы благодарят В.Г. Кулакова и Ю.Ю. Кулакову за предоставленный посевной материал, полученный из Грузии.

Рис. 9. Соцветие – корзинка



Fig. 9. Disk flower



Рис. 10. Строение язычкового (1) и трубчатого (2) цветков

Fig. 10. Structure of ray (1) and tubular (2) flowers



Рис. 11. Плоды на растении

Fig. 11. Fruit

## SPANISH NEEDLES *BIDENS BIPINNATA* L. — a Quarantine Weed Species on the New List of Quarantine Pests Absent from the Russian Federation

Elena M. Volkova, Chief of FGBU VNIKR's Weed Laboratory

Yury R. Kochnev, Junior Researcher at FGBU VNIKR's Weed Laboratory

As per Order № 501 of the Russian Ministry of Agriculture Adoption of Lists of Quarantine Pests dated 12 December 2014, *Bidens bipinnata* L., Spanish Needles, is a quarantine weed absent from the Russian Federation. Previously, this plant was on the List of Pests, Plant Diseases and Weeds of Quarantine Concern for the USSR adopted on 6 August 1986, as a pest of group III, i.e. a potentially dangerous species.

The Spanish Needles is an annual herbaceous weed of the family Asteraceae. The plant is native to North America.

The Spanish Needles is distributed worldwide (<http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Bidens+bipinnata>):

**Asia:** India, Yemen, China, Nepal, South Korea, Japan.

**America:** Anguilla, Brazil, Canada, Colombia, Costa Rica, Nicaragua, United States, Ecuador.

**Africa:** Benin, Botswana, Burkina Faso, Ghana, Guinea, Egypt, Cape Verde, Cameroon, Comoros, Congo, Côte d'Ivoire, Madagascar, Mali, Namibia, Senegal, Sudan, Equatorial Guinea.

**Europe:** Austria, Great Britain, Germany, Spain, Italy, France, Switzerland, Sweden.

**Oceania:** Australia, New Caledonia, Papua New Guinea.

*B. bipinnata* is potentially very invasive. It is particularly prevalent in disturbed habitats such as cultivated fields, wastelands, roadside verges, along the railways, riversides, etc.

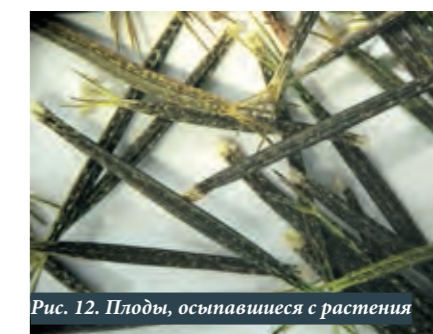


Рис. 12. Плоды, осыпавшиеся с растения

Fig. 12. Fruit shed from plants

Since February 2015, FGBU VNIKR's Weed Laboratory has been rearing *B. bipinnata* with the aim of investigating its morphology. *B. bipinnata* is a short-day plant. Under natural conditions, the blooming period occurs



Рис. 13. Плоды-семянки («длинные»)

Fig. 13. Fruit achenes (long)



Рис. 14. Верхняя часть плода

Fig. 14. Tip of the fruit

since late summer till early fall, for instance in Illinois, USA.

Indoors, a portion of sawn seeds germinated into short plants that flowered and yielded fruit in early spring (Fig. 1). The remaining seeds sawn at the same time germinated into large nonblooming plants (Fig. 2) up to 160 cm high.

**The Spanish Needles is an annual herbaceous weed of the family Asteraceae. The plant is native to North America.**

**The root system** consists of a branching taproot.

**The stem** is erect, glabrous green with certain areas sometimes purple reddish and branching. At the base, it is up to 1 cm in diameter, 4-angled, tapering (Fig. 3). On the average, plants are 60–150 cm high.

**Leaves** are opposite, petiolar, resembling those of parsley. The leaves reach up to 30 cm in length; petiole takes up 1/4–1/3 of the leaf length (Fig. 4). Blades of larger leaves are often as long as wide.

Petiols, veins and leaf margins are slightly hairy (Fig. 5).

Leaf blades are twice pinnatisected; leaves of larger plants may be locally three-fold pinnatisected (Fig. 6).

Certain leaf lobes may be oviform, lanceolate with serrate margins tapering towards the base and tip. The tip is usually bluntly pointed (Fig. 7).

At the end the stems, flower heads — disk flowers — are present (Fig. 1).

**Disk flowers.** The outer layer of the flower head consists of a single row of outwardly bent leaves. Flowers are surrounded by outer bracts which are longer than the leaves in the flower head (Fig. 8).



Рис. 15. Основание плода

Fig. 15. Base of the fruit

The flower head may consist only of tubular flowers. But usually 1 to 5 yellow ray flowers develop, as well. Numerous tubular yellow flowers are located around the periphery (Fig. 9, 10).

**Fruit.** After flowering, compound fruit are formed from each flower head. Long narrow fruit (achenes) stick outwardly from the center in all directions (Fig. 11).

Upon maturing, fruit easily shed (Fig. 4), or spread over long distances by hitching on to people passing by, animals etc.

As many other related species with needlelike fruit, the Spanish Needles has both longer and shorter fruit. This phenomenon is called heterocarpy.

**Long fruit.** Fruit are erect, not flattened with width usually equal to the thickness, sometimes slightly curved (Fig. 13).

The surface is longitudinally ribbed (8 ribs). Usually, four most raised ribs alternate with four narrower and less raised ribs. Achenes are dark gray, yellow or white at the tip and base of the fruit. At the tip of the fruit 2–4 usually 3 bright spines are formed each with teeth directed to the base of the spine (Fig. 14). Spines are about 3 mm long diverging at an acute angle. The fruit tapers towards the tip. The ribs at the tip are of lighter color.

Size of achene: 14–20 mm long with spines (on average, 17 mm), 0.8–1.2 mm wide (on average, 1 mm), 0.8–1.2 mm thick (on average, 1 mm). Size of the fruit (particularly, as wide as thick) is an important diagnostic feature that distinguishes this type of fruit from fruit of other species with needlelike fruit including those of *Bidens pilosa* which are flattened, i.e., width is greater than thickness by about 1.5–2 times. Thick-

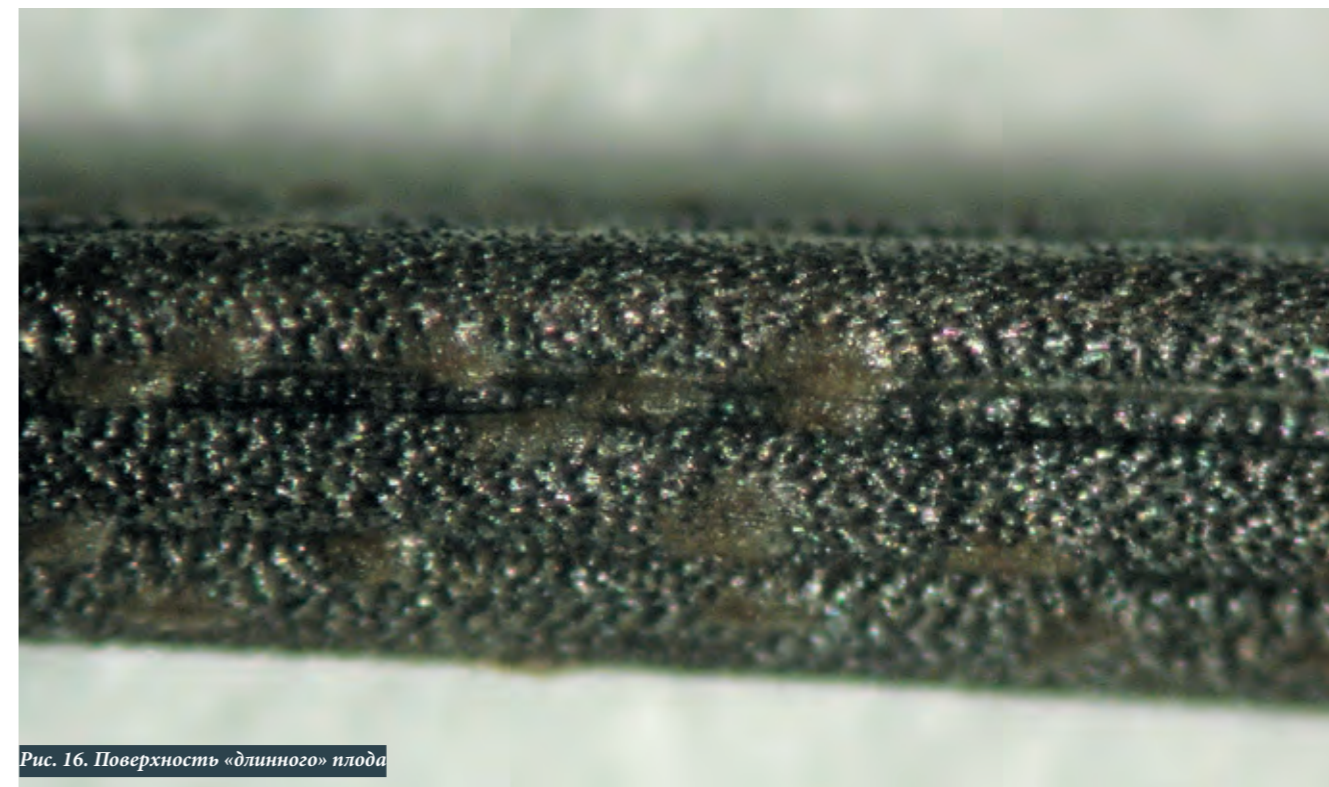


Рис. 16. Поверхность «длинного» плода

Fig. 16. Surface of the long fruit

ness and width should be measured at the central part of fruit since they somewhat taper to the tip and base.

Raphe is round or oval, light-colored, located in the center of the fruit (Fig. 15).

Whitish-yellow flat almost nonraised warts looking more like spots are present over the entire length of the fruit surface (Fig. 16).

Hairs are abundant, short (about 0.1 mm long), usually found at the base or tip of the fruit.

**Since February 2015, FGBU VNIKRR's Weed Laboratory has been rearing *B. bipinnata* with the aim of investigating its morphology. *B. bipinnata* is a short-day plant.**

A few short fruit-achenes are formed in certain plants from ray flowers. These have slightly different morphology.

**Short fruit.** Unlike “long” achenes, short fruit are brown-colored (Fig. 17). Size of achenes: 8–12 mm long with spines (on average, 10.3 mm), with width and thickness of about 1 mm similar to “long” achenes. There are three 2–3 mm spines. Bright “spots” — flat warts — and short sparse hairs cover the entire fruit surface (Fig. 18).

In the present paper, images by E.M. Volkova are used.

The authors express their gratitude to V.G. Kulakov and Yu.Yu. Kulakova for seed material collected in Georgia.

Fig. 17. Fruit achenes (short)

Рис. 17. Плоды-семянки («короткие»)



Fig. 18. Surface of the short fruit

Рис. 18. Поверхность «короткого» плода

# ДИАГНОСТИКА ВИРОИДА ВЕРЕТЕНОВИДНОСТИ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

С.Б. Абросимова, м.н.с. научно-методического отдела  
фитопатологии ФГБУ «ВНИИКР»

Ю.Н. Приходько, начальник научно-методического отдела  
фитопатологии ФГБУ «ВНИИКР»



Fig. 1. Potato plants infected with PSTVd  
(photo by Beltsville Agricultural Research  
Centre, USDA, USA)

Рис. 1. Растение картофеля,  
зараженное PSTVd  
(фото: Beltsville Agricultural Research  
Centre, USDA, США)

Вироид веретеновидности клубней картофеля (PSTVd) представляет серьезную угрозу для сельского хозяйства Европы, поэтому внесен в Список А2 карантинных объектов ЕОКЗР и Российской Федерации.

Впервые веретеновидность клубней картофеля была описана в штате Нью-Джерси (США) в 1922 г. под названием *Potato spindle tuber* (веретеновидный клубень картофеля).

В Европе, по данным сайта EPPO PQR (2015), PSTVd распространен

в Австрии, Азербайджане, Белоруссии, Бельгии, Великобритании, Венгрии, Германии, Греции, Грузии, Испании, Италии, Мальте, Нидерландах, Польше, Российской Федерации (Центрально-Европейский и Южный регионы, Дальний Восток), Словении, Украине, Турции, Хорватии, Чехии.

PSTVd выявлен также в Афганистане, Бангладеш, Израиле, Индии, Иране, Китае, Японии, Египте, Нигерии, США, Перу, Коста-Рике, Мексике, Венесуэле, Австралии и Новой Зеландии (EPPO PQR, 2015).

В 30-е годы XX века на Украине было описано заболевание, назван-

ное «готика картофеля», сопровождающееся образованием клубней веретеновидной и грушевидной формы (Терещенко, 1937). В последние годы это заболевание было отмечено и в ряде других регионов СССР (Поволжье, Закавказье, Средняя Азия). Было установлено, что «готика картофеля» вызывается PSTVd (Леонтьева, 1971).

**Впервые веретеновидность клубней картофеля была описана в штате Нью-Джерси (США) в 1922 г. под названием *Potato spindle tuber* (веретеновидный клубень картофеля).**

В конце 80-х — начале 90-х годов прошлого века в Российской Федерации было отмечено распространение PSTVd с семенными клонами картофеля высших репродукций, размноженных методом культуры *in vitro* и не подвергавшихся целевой

проверке на наличие этого патогена. В частности, зараженные растения были выявлены в коллекциях меристемных культур картофеля ВНИИ картофельного хозяйства и Биолого-почвенного института ДВНЦ (Кастальева и др., 1992; Можаяева и др., 1995; Романова, Леднева, 1995; Дрыгин и др., 1996).

PSTVd неоднократно выявляли также в посадках картофеля в Белоруссии. По результатам обследований 1995-1997 гг., было установлено, что PSTVd повсеместно распространен в Белоруссии, заражая на отдельных полях до 30% растений карто-

феля. В наиболее высокой степени оказались зараженными сорта Ласунок, Сантэ, Темпо и Орбит (Blotskaya, Berlinchik, 1998).

PSTVd имеет широкий круг растений-хозяев. Экспериментальный круг растений-хозяев включает 156 видов растений (из которых 139 видов относятся к семейству Solanaceae), представляющих 12 семейств (Singh, 1973). Основным растением-хозяином PSTVd является картофель — *Solanum tuberosum*. Кроме этого, данный вириод поражает томат — *Lycopersicon esculentum* (Puchta et al., 1990; Можаяева и др., 1996), баклажан — *Solanum*

*melongena*, перец — *Capsicum annuum* (Lebas et al., 2005), физалис — *Physalis peruviana* (Verhoeven et al., 2009), авокадо — *Persea americana* (Querci et al., 1995), пегино — *Solanum muricatum* (Puchta et al., 1990; Verhoeven, Roenhorst, 1995).

PSTVd выявляли также на растениях *Brugmansia suaveolens*, *Brugmansia candida*, *Brugmansia flava*, *Brugmansia sanguinea*, *Brugmansia* spp. (Verhoeven et al., 2008a, 2010a; Mertelik et al., 2009), *Cestrum aurantiacum*, *C. elegans*, *C. nocturnum* (Luigi et al., 2011), *Licanthes rantonnetii*, *Solanum rantonnetii* (Di Serio, 2007), *Petunia hybridum*, *Solanum muricatum* (Mertelik et al., 2009), *Solanum jasminoides* (Di Serio, 2007; Verhoeven et al., 2008a; Mertelik et al., 2009), *Streptosolen jamesonii* (Verhoeven et al., 2008b), *Datura* sp. (Verhoeven et al., 2010a), *Solanum laxum*, *Ipomoea batatas*, *Dahlia* spp. (EPPO PQR, 2013).

При исследовании коллекции пасленовых культур во Всероссийском институте растениеводства (г. Санкт-Петербург) PSTVd был выявлен на следующих дикорастущих видах рода *Solanum*: *S. bertaultii* Hawk., *S. leptopyes* Bitt., *S. neozossii* Hawk.,

*S. okadae* Hawk., *S. oplocense* Hawk., *S. sparsipilum* Bitt., *S. acaule* Bitt., *S. acroscopicum* Ochoa., *S. medians* Bitt., *S. demissum* Lindl., *S. jamesii* Torr., *S. pinnatisectum* Dun. (Краснова, 2000).

Ранее возбудителя веретеновидности клубней картофеля относили к вирусам. В 1967 г. было установлено, что возбудитель не является вирусом, т.к. представляет собой низкомолекулярную некапсидированную РНК, присутствующую в ядерной фракции клеток (Diner, Raimer, 1967).

В настоящее время известно, что вириод веретеновидности клубней картофеля (PSTVd) является инфекционной бескапсидной кольцевой одноцепочечной РНК, имеющей вторичную структуру, способной к автономной репликации после заражения растения-хозяина.

PSTVd является представителем рода *Pospiviroid* семейства *Pospiviroidae*.

В инфицированных растениях картофеля РНК вириода обычно состоит из 359 нуклеотидов (Gross et al., 1978), реже 358 или 360 нуклеотидов (Herold et al., 1992). Частицы PSTVd размером 356 нуклеотидов

были обнаружены на диких видах *Solanum* (Behjatnia et al., 1996) и на томате (Puchta et al., 1990). Частицы размером 356 и 357 были зарегистрированы на растениях пегино (*Solanum muricatum*) (Puchta et al., 1990; Shamloul et al., 1997) и *Solanum jasminoides* (Verhoeven et al., 2010a).

Проведенное сравнение первичной структуры генома изолятов PSTVd из коллекции ВНИИ фитопатологии и сиквенсов изолятов этого вириода, депонированных в Генбанк NCBI, показало, что все известные изоляты PSTVd образуют четыре филогенетические группы (Кастальева и др., 2011).

По реакции растений картофеля дифференцируют три штамма PSTVd: суровый (*severe*) — вызывающий потери урожая до 65%, промежуточный (*intermediate*) и мягкий (*mild*) — с потерей урожая в пределах 15–25% (Puchta et al., 1990). В Российской Федерации преимущественно распространены суровый и мягкий штаммы PSTVd (Можаяева и др., 1989; Краснова, 2000).

PSTVd имеет разнообразные пути распространения. На большие расстояния вириод распространяется с зараженными настоящими семенами и клубнями картофеля, а также с рассадой, плодами и семенами других растений-хозяев (EPPO/CABI, 1997).

Перенос вириода с настоящими семенами картофеля зависит от со-

Рис. 2. Симптомы заражения PSTVd клубней картофеля:  
здоровый клубень (слева) и клубни, пораженные PSTVd (3 справа)  
(фото: William M. Brown Jr., США)

Fig. 2. PSTVd symptoms on potato tubers:  
A healthy tuber (on the left) and PSTVd-infected tubers (3 on the right)  
(photo by William M. Brown Jr., USA)





Fig. 3. Potato tubers of the Panda variety infected with a PSTVd isolate. Chernigov-06 ARRIF (2014, photo by the authors)

Рис. 3. Клубни картофеля сорта Панда, зараженные изолятом PSTVd Чернигов-06 ВНИИФ (2014 г., фото авторов)

рта и варьирует от 0 до 100% (Singh, 1970). Для семян томата уровень инфекции был оценен в 7,9–11,1% (Fernow et al., 1970). На картофеле установлена также возможность распространения вириода с пыльцой (Fernow et al., 1970; Singh et al., 1992), но практическое значение данной способности пока не оценивалось.

Обычным является распространение PSTVd механическим путем при контакте растений посредством сельскохозяйственной техники и инвентаря (EPPO/CABI, 1997). Интенсивность механического переноса зависит от целого ряда факторов: вида растения-хозяина и сорта, количества зараженных растений, агротехнической практики, концентрации вириода в растениях и температуры. Вириод способен сохранять жизнеспособность в высохшем соке растений, заражая тем самым сельскохозяйственную технику, инвентарь и хранилища (явление контаминации) (OEPP/EPPO, 2011).

Установлено распространение вириода с питательным раствором при совместном выращивании зараженных и здоровых растений томата на

гидропонных установках (Можаева и др., 1996). Заражение вириодом здоровых растений томата происходило через 5 дней после помещения зараженных растений в питательный раствор, а инфекционность питательного раствора сохранялась на протяжении трех дней (Гирсова, 2003).

В качестве переносчиков PSTVd указывались большая картофельная тля (*Macrosiphum euphorbiae*), перси-

**Основными источниками проникновения вириода на территорию Российской Федерации и распространения его внутри страны являются инфицированные клубни, семена, плоды и рассада растений-хозяев.**

ковая тля (*Myzus persicae*), а также другие сосущие и листогрызущие виды насекомых (*Dysonia triangularis*, *Empoasca flavescens*, *Epitrix cucumeris*, *Eupteryx atropunctata*, *Lygus pratensis*, *Leptinotarsa deselineata*, *Melanoplus* spp., *Systena elongate*) (Fernow et al., 1970; Werner-Solska, 1983). В то же время было установлено, что трипсы (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), а также пчелы (*Apis mellifera*) и шмели (*Bombus terrestris*) не могут передавать вириод (Lykke Nielsen et al., 2012).

При этом перенос PSTVd персиковой тлей (*Myzus persicae*) происхо-

дит только в случае капсулирования РНК вириода белком вируса скручивания листьев картофеля — PLRV. Эффективность передачи PSTVd тлями зависит от сорта картофеля, используемого в качестве источника инфекции и в качестве заражаемого тест-растения, распространенности PLRV и варьирует от 0 до 55% (Salazar et al., 1995; Querci et al., 1997).

Основными источниками проникновения вириода на территорию Российской Федерации и распространения его внутри страны являются инфицированные клубни, семена, плоды и рассада растений-хозяев. Дополнительным путем распространения вириода могут являться бессимптомные меристемные культуры и тепличные растения картофеля.

Высокие температуры стимулируют размножение PSTVd и проявление симптомов, низкие — сохраняют инфицированность клубней на одном уровне. Болезнь быстрее распространяется во влажных ус-

ловиях, чем в сухих. Установлено, что концентрация вириода была существенно более высокой у растений, содержащихся при температуре 30 °C, чем при температуре 25 °C (Morris, Smith, 1977).

Молекула вириода имеет до 70% спаренных оснований, что придает ей устойчивость к внешним условиям и воздействию различных химических веществ. Было установлено, что вириод сохраняет инфекционность при хранении в течение 22 лет при –20 °C в составе препарата частично очищенной РНК (Гирсова, 2003) и до шести лет — в лиофилизированных листьях (Singh, Finnie, 1977). Было показано также, что инфекционность вириода сохраняется в высушенных листьях, хранящихся при комнатной температуре на протяжении двух лет, а в лиофильно высушенных листьях при температуре –20 °C — до 13 лет (Гирсова, 2003).

PSTVd сохранял инфекционность в настоящих семенах картофеля, хранящихся при комнатной температуре в течение 12 лет (Grasmick et al., 2011) и 21 года (Singh et al., 1991), а в семенах томата, хранящихся при том же режиме, — в течение 23 лет (Гирсова, 2003). В то же время вириод не сохраняется в почве и в зимующих в естественных условиях рас-

тительных остатках (Diener, Raimer, 1971; Гирсова, 2003).

Экономические потери из-за заражения PSTVd связаны со снижением продуктивности растений и ухудшением товарного качества клубней и плодов поражаемых культур. У картофеля уменьшение продуктивности растений под влиянием PSTVd происходит за счет уменьшения массы клубней и уменьшения их количества.

Потери урожая зависят от штамма вириода и концентрации патогена в растениях. Так, на томатах потери составляют в среднем 10–20%, однако возможно снижение урожая до 40–50%, со значительным снижением товарного вида плодов. При сильной инфекции потери урожая картофеля могут достигать 65% вследствие уменьшения размера и количества клубней. Качество клубней при этом также серьезно страдает (EPPO/CABI, 1997).

У зараженных вириодом растений картофеля сорта Резерв вес клубней снижался в 4,3 раза, а количество клубней — в 4,2 раза. У зараженных растений сорта Невский количество клубней снижалось вдвое, а вес клубней — на 26% (Кастальева и др., 1992). В Северо-Западном регионе РФ в результате заражения PSTVd масса клубней картофеля снижалась от 10,8 до 63,3% (Краснова, 2000).

На пятый год после заражения вириодом продуктивность растений

картофеля сортов Невский, Луговской, Прибрежный и Утенок снизилась соответственно на 46,9; 36,4; 35,6 и 18,1%. При этом у сорта Луговской все образовавшиеся клубни были нетоварными (Гирсова, 2003).

В Республике Беларусь было установлено, что на второй год после заражения PSTVd вызывает снижение массы клубней растений картофеля сортов Сантэ, Темпо, Ласунок и Орбит соответственно на 75,7; 66,6; 40 и 36,8% (Blotskaya, Berlinchik, 1998).

При условии удаления зараженных семенных клонов, соблюдения комплекса карантинных мероприятий и внедрения эффективных методов диагностики существует реальная возможность искоренения этого патогена или сведения его ущерба до минимального уровня. О фактах полного искоренения PSTVd в коллекционных насаждениях картофеля или же даже в рамках всей национальной системы семеноводства этой культуры сообщалось в частности из Австралии (Catley, 1989; Mackie et al., 2002) и Канады (Singh, Crowley, 1985).

Для выявления и идентификации PSTVd ЕОКЗР рекомендует использовать комплекс отборочных и подтверждающих тестов.

Первичное выявление вириода осуществляют по наличию симптомов на растениях-хозяевах.

Читайте продолжение материала в следующем номере журнала «Карантин растений. Наука и практика» № 4(14)

Рис. 4. Этапы проявления симптомов PSTVd на томате (фото: Department of Primary Industries, США)

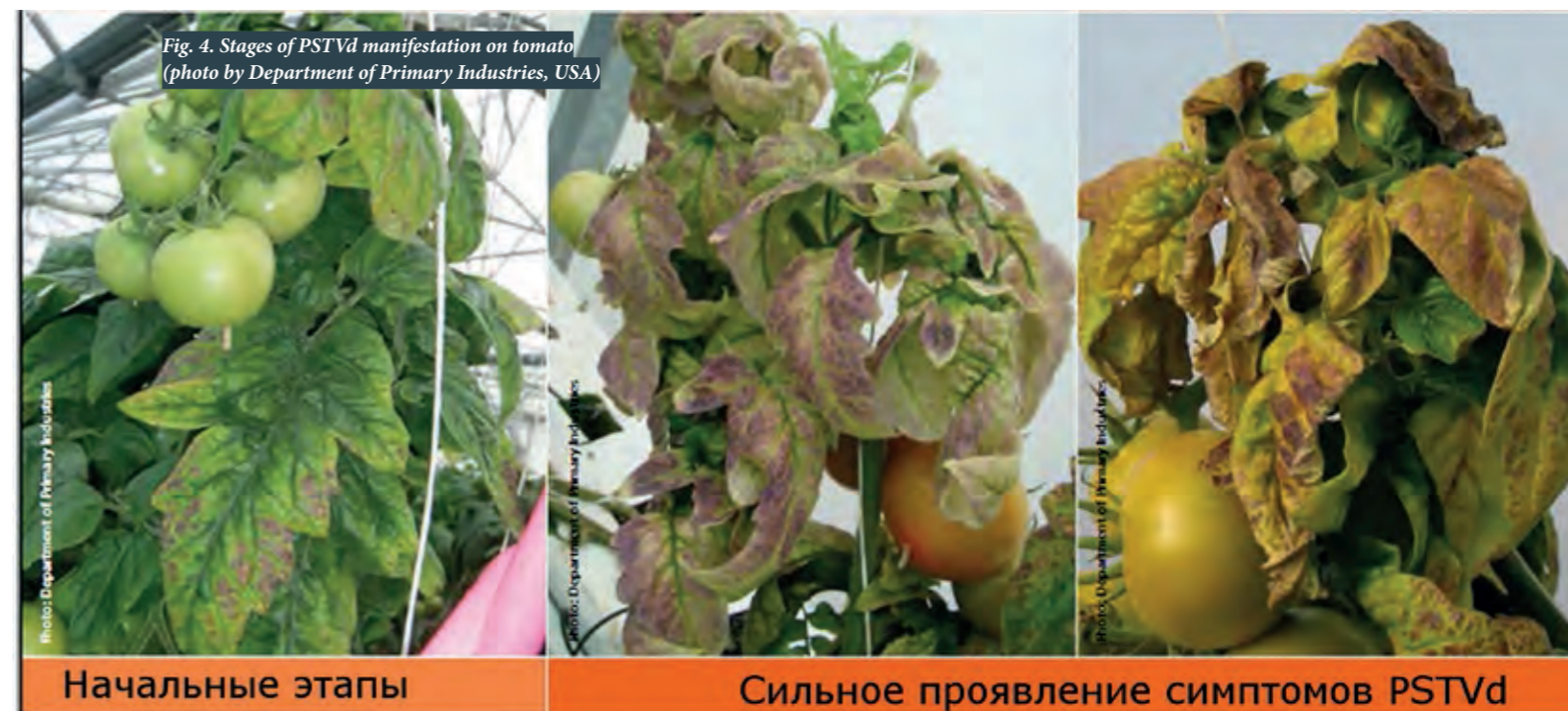


Fig. 4. Stages of PSTVd manifestation on tomato (photo by Department of Primary Industries, USA)

Начальные этапы

Сильное проявление симптомов PSTVd

# DETECTION AND IDENTIFICATION OF POTATO SPINDLE TUBER VIROID

Svetlana B. Abrosimova, Junior Researcher at FGBU VNIKR's  
Plant Pathology Research and Methodology Department

Yury N. Prikhodko, Chief of FGBU VNIKR's  
Plant Pathology Research and Methodology Department

Potato spindle tuber viroid (PSTVd) poses a serious threat to agriculture in Europe; therefore it is listed in EPPO A2 List of pests recommended for regulation as quarantine pests and the Russian List of quarantine pests.

The spindle tuber viroid was first reported in the state of New Jersey (USA) in 1922 as potato spindle tuber (spindle-shaped potato tuber) viroid.

In Europe, according to PQR (2015) – the EPPO database on quarantine pests, PSTVd is distributed in Austria, Azerbaijan, Belarus, Belgium, Great Britain, Hungary, Germany, Georgia, Greece, Spain, Italy, Malta, Netherlands, Poland, the Russian Federation (Central European and Southern regions, the Far East), Slovenia, Ukraine, Turkey, Croatia, and the Czech Republic.

PSTVd has also been detected in Afghanistan, Bangladesh, Israel, India, Iran, China, Japan, Egypt, Nigeria, the United States, Peru, Costa Rica, Mexico, Venezuela, Australia, and New Zealand (EPPO PQR, 2015).

In 1930s, the disease was described in Ukraine as “Gothic potato” causing spindle and pear-shaped tubers (Tereschenko, 1937). In subsequent years, this disease was also observed in several other regions of the USSR (the Volga region, Trans-Caucasian region, Central Asia). “Gothic potato” was found to be caused by PSTVd (Leontiev, 1971).

In the late 1980s – early 1990s, PSTVd was found to be spread in the Russian Federation via clones of high grade seed potato multiplied in vitro and not

subjected to the specific analysis for the presence of this pathogen. For instance, infested plants were found in the meristem culture collections of the State Research Institution *All-Russian Research Institute of Potato Farming* and the FEB RAS Biology Institute of Biology and Soil Science (Kastaleva et al., 1992; Mozhaeva et al., 1995; Romanova, Ledneva, 1995; Drygin et al., 1996).

PSTVd was repeatedly detected in potato plantings in Belarus. In 1995–1997, surveys revealed that PSTVd was widely distributed in Belarus and infested up to 30% of the potato plants on individual fields. Lasunok, Sante, Tempo and Orbit were the most severely infested varieties (Blotskaya, Berlinchik, 1998).

PSTVd has a wide host range. There are 156 host plant species (139 species of which belong to the family Solanaceae) in 12 families (Singh, 1973). The major

**The spindle tuber viroid was first reported in the state of New Jersey (USA) in 1922 as potato spindle tuber (spindle-shaped potato tuber) viroid.**

host is potato — *Solanum tuberosum*. PSTVd also infests tomato — *Lycopersicon esculentum* (Puchta et al., 1990; Mozhaeva et al., 1996), aubergine — *Solanum melongena*, pepper — *Capsicum annuum* (Lebas et al., 2005), Physalis — *Physalis peruviana* (Verhoeven et al., 2009), avocado — *Persea americana* (Querci et al., 1995), and pepino — *Solanum muricatum* (Puchta et al., 1990; Verhoeven, Roenhorst, 1995).

PSTVd has also been detected in plants of *Brugmansia suaveolens*, *Brugmansia candida*, *Brugmansia flava*, *Brugmansia sanguinea*, *Brugmansia* spp. (Verhoeven et al., 2008a, 2010a; Mertelik et al., 2009), *Cestrum aurantiacum*, *C. elegans*, *C. nocturnum* (Luigi et al., 2011), *Licanthes rantonnetii*, *Solanum rantonnetii* (Di Serio, 2007), *Petunia hybridum*, *Solanum muricatum* (Mertelik et al., 2009), *Solanum jasminoides* (Di Serio, 2007; Verhoeven et al., 2008a; Mertelik et al., 2009), *Streptosolen jamesonii* (Verhoeven et al., 2008b), *Datura* sp. (Verhoeven et al., 2010a), *Solanum laxum*, *Ipomoea batatas*, and *Dahlia* spp. (EPPO PQR, 2013).

The study of the solanaceous crops collection performed at the All-Russian Research Institute of Plant Production (St. Petersburg) revealed the PSTVd infestation in the following wild-growing

*Solanum* species: *S. bertaultii* Hawk., *S. leptopyes* Bitt., *S. neozossii* Hawk., *S. okadae* Hawk., *S. oplocense* Hawk., *S. sparsipilum* Bitt., *S. acaule* Bitt., *S. acroscopicum* Ochoa., *S. medians* Bitt., *S. demissum* Lindl., *S. jamesii* Torr., and *S. pinnatisectum* Dun. (Krasnova, 2000).

Earlier, potato spindle tuber was believed to be caused by a virus. In 1967, the causative agent was identified to be a non-encapsidated RNA of low mo-

lecular weight located in the nuclear fraction. Hence, it is not a virus (Diner, Raimer, 1967).

Currently, potato spindle tuber viroid (PSTVd) is known to be an infectious non-encapsidated, circular, single-stranded RNA containing a secondary structure and capable of independently replicating in the infested host plant.

PSTVd belongs to the genus Pospiviroid in the family Pospiviroidae.

In infested potato plants, the viroid RNA, as a rule, is 359 nucleotides in length (Gross et al., 1978), less often – 358 or 360 nucleotides (Herold et al., 1992). Nucleotide lengths of 356 have been found in wild *Solanum* spp. (Behjatnia et al., 1996) and tomato (Puchta et al., 1990). Lengths of 356 and 357 nucleotides have been reported in pepino (*Solanum muricatum*) (Puchta et al., 1990; Shamloul et al., 1997).

Comparison of the primary structure of the genome of PSTVd isolates

from the collection of the All-Russian Research Institute of Phytopathology with the PSTVd isolate sequences deposited in the NCBI GenBank has shown that the known isolates of PSTVd fall within four phylogenetic groups (Kastaleva et al., 2011).

Three PSTVd strains are differentiated by their affect on potato plants: severe, causing yield losses of up to 65%, intermediate and mild causing yield losses by 15–25% (Puchta et al., 1990). In the Russian Federation, severe and mild strains are most common (Mozhaeva et al., 1989; Krasnov, 2000).

PSTVd has a number of pathways. Over longer distances, PSTVd is transmitted in true potato seeds and tubers, as well as infested seedlings, fruits and seeds of other host plants (EPPO/CABI, 1997).

Transmission in true potato seeds is cultivar dependent and varies from 0 to 100% (Singh, 1970). The infection level in tomato seeds was estimated to

be 7.9–11.1% (Fernow et al., 1970). In potato, the viroid is also known to be transmitted by pollen (Fernow et al., 1970; Singh et al., 1992), but the practical significance of pollen transmission is yet to be estimated.

The viroid can also be transmitted mechanically by plant-machinery contact (EPPO/CABI, 1997). The extent of mechanical transmission depends on a number of factors including the host plant species or cultivar, number of infected plants, cultural practices, viroid concentration, and temperature.

**The main pathways for the entry and spread of the viroid in the Russian Federation are infected tubers, seeds, fruits and seedlings of host plants.**

It survives in dried plant sap and can contaminate machinery and storage facilities (OEPP/EPPO, 2011).

PSTVd is known to be transmitted in nutrient solution when healthy and infected tomato plants are simultaneously cultivated in plant culturing unit (Mozhaeva et al., 1996). Infection

Fig. 5. Tomato leaf of the *Mona Lisa* variety inoculated with PSTVd MT-08(2) isolate (FGBU VNIKR Quarantine greenhouse, 2015, photo by the authors)

Рис. 5. Листья растения томата сорта Мона Лиза, инокулированного изолятом PSTVd MT-08(2) (карантинная теплица ФГБУ «ВНИИКР», 2015 г., фото авторов)



of healthy tomato plants by viroid occurred in 5 days after placing the infected plants in a nutrient solution and nutrient solution retained its infectivity for three days (Girsova, 2003).

The following insects were reported as PSTVd vectors: the potato aphid (*Macrosiphum euphorbiae*), green peach aphid (*Myzus persicae*) and other sucking and leaf mining insect species (*Dysoniella triangularis*, *Empoasca flavescens*, *Epitrix cucumeris*, *Eupteryx atropunctata*, *Lygus pratensis*, *Leptinotarsa deselineata*, *Melanoplus* spp., *Systema elongate*) (Fernow et al., 1970; Werner-Solska, 1983). Whereas, thrips (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), honey bees (*Apis mellifera*) and humblebees (*Bombus terrestris*) are not capable of transmitting the viroid (Lykke Nielsen et al., 2012).

Transmission of PSTVd by the green peach aphid (*Myzus persicae*) only occurs if PSTVd RNA is encapsidated in virions of Potato leafroll virus (PLRV) with the efficiency of transmission depending on the potato cultivar used as the inoculum source and as a test plant to be infected as well as depending on the presence of PLRV. It varies from 0 to 55% (Salazar et al., 1995; Querci et al., 1997).

The main pathways for the entry and spread of the viroid in the Russian Federation are infected tubers, seeds, fruits and seedlings of host plants. Secondary pathways could be asymptomatic meristem cultures and greenhouse potato plants.

High temperatures promote PSTVd reproduction and symptom manifestation while low temperatures keep the tuber infection at the same level. The disease spreads more rapidly under humid conditions than under dry conditions. The viroid may be present at a

much higher concentration in plants grown at 30°C than at 25°C (Morris & Smith, 1977).

Viroid molecule has up to 70% of base pairs which makes it resistant to environmental conditions and the effects of various chemicals. The viroid was found to retain its infectivity for 22 years when stored at -20 °C as part of a purified RNA polymerase preparation (Girsova, 2003) and for up to six years in lyophilized leaves (Singh & Finnie, 1977). The infectivity of the viroid was also shown to retain for two years in dried leaves stored at room temperature and thirteen years in freeze-dried leaves at -20 °C (Girsova, 2003).

PSTVd retained its infectivity in true potato seeds stored at room temperature for 12 years (Grasmick et al., 2011) and 21 years (Singh et al., 1991) and for 23 years in tomato seeds stored at the same temperature (Girsova, 2003). At the same time, the viroid lost its infectivity in soil and plant debris overwintering under natural conditions (Diener, Raimer, 1971; Girsova, 2003).

Economic losses due to the PSTVd infection are associated with decreased plant productivity and deterioration of commercial quality of tubers and fruit of affected crops. Decreased plant productivity in PSTVd infected potato is the result reduction in weight and number of tubers.

Yield losses depend on the strain and viroid concentration in plants. For instance, tomato losses on average amount to 10-20%, but may be up to 40-50% with a significant reduction in the marketable condition of fruit. In severe infections, yield losses may reach up to 65% due to reduced size and number of tubers. The quality of tubers is also seriously affected (EPPO/CABI, 1997).

In infected potato plants of the Reserve variety, weight decreased by 4.3 times and the number of tubers – by 4.2 times. In infected potato plants of the Nevsky variety, the number of tubers reduced by half and their weight by 26% (Kastaleva et al., 1992). In the Northwest region of the Russian Federation, PSTVd infection caused tuber weight decrease by 10.8 – 63.3% (Krasnov, 2000).

By the fifth year of the viroid infection, the productivity of potato plants of the Nevsky Lugovskoy, Pribrezhny and Utionok varieties decreased by 46.9; 36.4; 35.6 and 18.1%. All Lugovskoy tubers were unmarketable (Girsova, 2003).

In Belarus, PSTVd was found to cause decreased tuber weight in the Sante, Tempo, Lasunok, Orbit varieties by 75.7, 66.6, 40 and 36.8%, respectively, by the second year of infection (Blotskaya, Berlinchik, 1998).

The eradication of the viroid or minimization of its impact is achievable by removing infected seed clones, applying a range of quarantine measures and effective diagnostic methods. Complete eradication of PSTVd in collection plantations or even across the national system of seed production of this crop was reported from Australia (Catley, 1989; Mackie et al., 2002) and Canada (Singh, Crowley, 1985).

To detect and identify PSTVd EPPO recommends a set of preliminary and confirmatory tests.

Primary viroid detection is carried out based on the presence of symptoms on host plants.

*The continuation of the article in the next issue of magazine «Plant Health. Research and Practice» №4 (14)*

## ЗДЕСЬ МОЖЕТ БЫТЬ ВАША СТАТЬЯ!

### Журнал «Карантин растений. Наука и практика» приглашает авторов для публикации своих научных работ

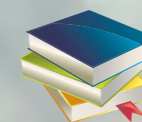
Редакция журнала «Карантин растений. Наука и практика» рада предложить Вам возможность публикации Ваших статей на страницах журнала. Наша цель – привлечение внимания к наиболее актуальным проблемам карантина растений специалистов сельского хозяйства и всех заинтересованных в этом людей.

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 «Карантин растений. Наука и практика» 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 10-12 страниц – но не менее 5 (при одинарном интервале и размере шрифта 12). Оптимальный объем статьи: до 20 тыс. знаков (включая пробелы).

#### СТРУКТУРА ПРЕДОСТАВЛЯЕМОЙ СТАТЬИ\*


1. Название статьи.
2. Имя, отчество, фамилия автора.
3. Место работы автора, должность, ученая степень, адрес электронной почты.
4. Резюме (краткое точное изложение содержания статьи, включающее фактические сведения и выводы описываемой работы): около 7–8 строк (300-500 знаков с пробелами).
5. Ключевые слова (5-6 слов, словосочетаний), наиболее точно отображающие специфику статьи.
6. Материалы и методы.
7. Результаты и обсуждения.
8. Выводы и заключение.
9. Список литературы (т. е. список всей использованной литературы, ссылки на которую даются в самом тексте статьи): Правила составления ГОСТ Р 7.05-2008.
10. Иллюстрированные материалы (фото, картинки) допускаются хорошей контрастности, с разрешением не ниже 300 точек на дюйм (300 dpi), оригиналы прикладываются к статье отдельными файлами в формате tiff или jpeg (Рисунки, не соответствующие требованиям, будут исключены из статей, поскольку достойное их воспроизведение типографским способом невозможно).
11. Рецензия на статью (доктор наук) и решение экспертной комиссии учреждения.

\*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 «вмещаться» в печатное поле страницы. Название таблицы – над таблицей; название рисунка/графика – под рисунком/графиком.

#### БОЛЕЕ ПОДРОБНЫЕ УСЛОВИЯ О ПУБЛИКАЦИИ СТАТЕЙ ВЫ МОЖЕТЕ УЗНАТЬ В НАШЕЙ РЕДАКЦИИ:

Адрес: 105122, г. Москва, Щелковское шоссе, д. 13, офис 402  
Контактное лицо: Бададгулова Юлиана Георгиевна  
Телефон: +7 915 477 78 36



# 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

- ФГБУ «ВНИИКР» — партнер международной программы по координации научных исследований в области карантина растений EUPHRESKO II (EUropean PHytosanitary RESearch COordination)

- Ведущее научно-методическое учреждение в составе Координационного совета по карантину растений государств — участников СНГ

- Головное научно-методическое учреждение по реализации Плана первоочередных мероприятий, направленных на гармонизацию карантинных фитосанитарных мер государств — членов Таможенного союза

- Ведущее учреждение в Российской Федерации по синтезу и применению феромонов для выявления карантинных вредных организмов

- В ФГБУ «ВНИИКР» создан и действует Технический комитет по стандартизации ТК 42 «Карантин и защита растений»

- Имеет 23 филиала на территории Российской Федерации

Россия, 140150, Московская область, Раменский район,  
пос. Быково, ул. Пограничная, д. 32

Тел./факс: (499) 271-38-24

e-mail: [vniikr@mail.ru](mailto:vniikr@mail.ru), <http://www.vniikr.ru>