

КАРАНТИН РАСТЕНИЙ

НАУКА И ПРАКТИКА

МАРТ
1|11|2015

РУССКО-АНГЛИЙСКИЙ ЖУРНАЛ

**ТРИПСЫ — КАНДИДАТЫ НА ВКЛЮЧЕНИЕ
В ПЕРЕЧЕНЬ КАРАНТИННЫХ ОБЪЕКТОВ
ТАМОЖЕННОГО СОЮЗА, ОБНАРУЖИВАЕМЫЕ В ПОДКАРАНТИННОЙ
ПРОДУКЦИИ, ПОСТУПАЮЩЕЙ В КАЛИНИНГРАДСКУЮ ОБЛАСТЬ** стр. 4

**КОЛЬЧАТЫЕ КОКОНОПРЯДЫ
РОДА *MALACOSOMA* —
НОВЫЕ ОБЪЕКТЫ КАРАНТИННОГО ПЕРЕЧНЯ РФ** стр. 20

**ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ СОРНЫХ РАСТЕНИЙ** стр. 32

**THRIPS INTERCEPTED IN REGULATED ARTICLES
IMPORTED INTO KALININGRAD REGION AS CANDIDATES
FOR INCLUSION INTO THE PEST LIST OF THE CUSTOMS UNION** page 9

**TENT CATERPILLARS
OF THE GENUS *MALACOSOMA* —
NEW PESTS IN THE RUSSIAN QUARANTINE LIST** page 24

**SEARCH FOR MOLECULAR MARKERS
FOR IDENTIFICATION OF WEEDS** page 36

RUSSIAN-ENGLISH JOURNAL

PLANT HEALTH

RESEARCH AND PRACTICE

MARCH
1|11|2015

«КАРАНТИН РАСТЕНИЙ. НАУКА И ПРАКТИКА»

ДВУЯЗЫЧНЫЙ НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ №1 (11) 2015 Г.

Главный редактор:

У.Ш. Магомедов, кандидат сельскохозяйственных наук, директор ФГБУ «ВНИИКР»

Шеф-редактор:

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

Выпускающие редакторы:

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

Редакционная коллегия

журнала «Карантин растений. Наука и практика»:

Исаев А.А. — начальник

Управления фитосанитарного надзора и качества зерна

Гниненко М.Ю. — заместитель

начальника Управления фитосанитарного надзора и качества зерна

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

Учредитель: ООО «Успех», выпускается по заказу Федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский центр карантина 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.

Санин С.С. — академик РАН,

директор 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»

Мазурин Е.С. — 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 научно-методического отдела энтомологии

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 Поваляева

Корректор:

Татьяна Артемьева

Менеджер по подписке и дистрибуции:

Игорь Алпатов
+7 (925) 357 20 61

СОДЕРЖАНИЕ CONTENT

НАУЧНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ОБЛАСТИ КАРАНТИНА РАСТЕНИЙ

В.И. Рожина, ведущий биолог ФГБУ «Калининградская МВЛ»
Трипсы — кандидаты на включение в перечень карантинных объектов Таможенного союза, обнаруживаемые в подкарантинной продукции, поступающей в Калининградскую область

RESEARCH STUDIES IN PLANT QUARANTINE

Viktoria I. Rozhina, Leading Biologist at the Kaliningrad Interregional Veterinary Laboratory
Thrips Intercepted in Regulated Articles Imported into Kaliningrad Region as Candidates for Inclusion into the Pest List of the Customs Union

4 9

В.Н. Жимерикин, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»
Ю.В. Смирнов, заместитель начальника научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР»
Вероятность появления томатной огневки *Neoleucinodes elegantalis* Guenee (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae) на посевах пасленовых в России

Vladimir N. Zhimerikin, FGBU VNIKR's Leading Researcher
Yury V. Smirnov, Deputy Head of FGBU VNIKR's Entomological Research and Methodology Department
Probability of the Tomato Fruit Borer *Neoleucinodes elegantalis* Guenee (Lepidoptera: Pyraloidea) Invading Solanaceous Crops in Russia

14 17

М.М. Абасов, заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР»
А.Э. Нестеренкова, младший научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»
Кольчатые коконопряды рода *Malacosoma* — новые объекты карантинного перечня РФ

Muzafar M. Abasov, FGBU VNIKR's Deputy Director
Anastasia E. Nesterenkova, FGBU VNIKR's Junior Researcher
Tent Caterpillars of the Genus *Malacosoma* — New Pests in the Russian Quarantine List

20 24

О.Г. Волков, начальник научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР»
Н.А. Гура, старший научный сотрудник научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР»
Л.Г. Чеглик, младший научный сотрудник научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР»
А.Ф. Гостюк, лаборант научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР»
Обнаружение энтомофага червецов симферобиуса *Symphorobius* sp. (Neuroptera, Hemerobiidae) на лабораторной культуре виноградного червеца *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera, Pseudococcidae)

Oleg G. Volkov, Head of FGBU VNIKR's Entomological Research and Methodology Department
Natalia A. Gura, Senior Researcher at FGBU VNIKR's Entomological Research and Methodology Department
Liudmila Chehlik, Junior Researcher at FGBU VNIKR's Entomological Research and Methodology Department
Aurika F. Gostiuk, Technician at FGBU VNIKR's Entomological Research and Methodology Department
Detection of an Entomophage belonging to *Symphorobius* sp. (Neuroptera, Hemerobiidae) on the Laboratory Culture of the Citrus Mealybug *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera, Pseudococcidae)

28 30

Ю.Ю. Кулакова, старший научный сотрудник НЭО ФГБУ «ВНИИКР»
В.Г. Кулаков, начальник испытательного экспертного центра ФГБУ «ВНИИКР»
Е.С. Мазурин, заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР»
Поиск молекулярных маркеров для идентификации сорных растений

Yuliana Yu. Kulakova, Senior Researcher of FGBU VNIKR's Research and Testing Department
Vitaly G. Kulakov, Chief of FGBU VNIKR's Expert and Testing Department
Evgeny S. Mazurin, FGBU VNIKR's Deputy Director
Search for Molecular Markers for Identification of Weeds

32 36

Шрван Кумар, Институт сельскохозяйственных наук, Бенаресский индуистский университет, Варанаси (Индия)
Аша Синха, Институт сельскохозяйственных наук, Бенаресский индуистский университет, Варанаси (Индия)
Дханбир Сингх, Отдел фитопатологии Сельскохозяйственного университета Химачал-Прадеш, Паламтур (Индия)
Субхаши Дханхолия, Отдел фитопатологии Сельскохозяйственного университета Химачал-Прадеш, Паламтур (Индия)
Ингибирование прорастания телоспор *Neovossia indica* при помощи фильтратов культур агентов биологической борьбы

Shrvan Kumar, IAS, Banaras Hindu University, Varanasi (India)
Asha Sinha, IAS, Banaras Hindu University, Varanasi (India)
Dhanbir Singh, Department of Plant Pathology CSK HPKV (India)
Subhash Dhancholia, Department of Plant Pathology CSK HPKV (India)
Efficacy of Culture Filtrates of Bio-control Agents on Teliospores Germination Inhibition of *Neovossia indica*

40 42

И.О. Камаев, начальник научно-экспериментального отдела ФГБУ «ВНИИКР»
Е.С. Мазурин, заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР»
А.В. Шипулин, младший научный сотрудник научно-экспериментального отдела ФГБУ «ВНИИКР»

Ilya O. Kamaev, Head of FGBU VNIKR's Research and Testing Department
Evgeny S. Mazurin, FGBU VNIKR's Deputy Director
Andrey V. Shipulin, Junior Researcher of FGBU VNIKR's Research and Testing Department

Непарный шелкопряд (*Lymantria dispar*): выделение внутривидовых комплексов и молекулярно-генетические подходы к идентификации азиатского подвида

Distinguishing between the Gypsy Moth (*Lymantria dispar*) Intraspecific Groups and Molecular Genetic Approaches to the Identification of the Asian Subspecies

45 52

ТРИПСЫ — КАНДИДАТЫ НА ВКЛЮЧЕНИЕ

в перечень карантинных объектов Таможенного союза, обнаруживаемые в подкарантинной продукции, поступающей в Калининградскую область

В.И. Рожина, ведущий биолог ФГБУ «Калининградская МВЛ»

Трипсы — очень мелкие насекомые, относящиеся к отряду Бахромчатокрылые — Thysanoptera, распространенные от тропиков до крайних северных и южных широт. Это обычные обитатели покрытосеменных, голосеменных и споровых растений, в большинстве фитофаги, питающиеся на вегетативных и генеративных органах растения-хозяина (Ижевский, Ахатов, 2004).

До вступления в силу нового перечня в перечень карантинных объектов Российской Федерации были включены два представителя этого отряда — трипс Пальма — *Thrips palmi* Karny и западный цветочный (калифорнийский) трипс — *Frankliniella occidentalis* Perg., однако потенциально опасных видов, способных навредить растениям, как в открытом, так и в закрытом грунте значительно больше.

Потенциально опасными в отношении переноса трипсов товарами следует считать срезанные цветы, горшечные растения, посадочный материал (саженцы, рассаду, луковицы цветочных культур и т.д.), а также различные фрукты и овощи: томат, баклажан, перец, физалис, огурец, капусту (в особенности молодую и пекинскую), зеленую спаржу, салат, ягоды (землянику, голубику, ежевику, красную смородину и т.д.), персик, нектарин и другие.

В проект Единого перечня карантинных объектов Таможенного союза включены 11 видов представителей отряда Thysanoptera:

1. *Echinothrips americanus* Morgan — хиотрипс американский;

За последние два года зарегистрировано 8 случаев обнаружения томатного трипса в партиях роз и хризантем, поступивших в Калининградскую область из Кении и Нидерландов.

2. *Frankliniella fusca* (Hinds) — американский табачный трипс;

3. *Frankliniella insularis* (Franklin) — индийский (вест-индский) цветочный трипс;

4. *Frankliniella occidentalis* Perg. — западный цветочный (калифорнийский) трипс;

5. *Frankliniella tritici* (Fitch) — восточный цветочный трипс;

6. *Frankliniella schultzei* (Trybom) — томатный трипс;

7. *Frankliniella williamsi* Hood — кукурузный трипс;

8. *Scirtothrips citri* (Moulton) — цитрусовый трипс;

9. *Scirtothrips dorsalis* Hood — индокитайский цветочный трипс;

10. *Thrips hawaiiensis* Morgan — гавайский трипс;

11. *Thrips palmi* Karny — трипс Пальма.

Некоторые из перечисленных видов периодически встречаются в подкарантинной продукции, поступающей в Калининградскую область из стран Африки, Европы и Америки.

Один из таких видов — томатный трипс — *Frankliniella schultzei* Tryb. внесен в список А1 проекта Единого перечня карантинных объектов Таможенного союза (рис. 1).

За последние два года зарегистрировано 8 случаев обнаружения

томатного трипса в партиях роз и хризантем, поступивших в Калининградскую область из Кении и Нидерландов.

Этот вредитель африканского происхождения распространен в странах Америки, Азии, Европы, в Австралии и Океании.

Томатный трипс — широкий полифаг, повреждает 83 вида растений из 35 семейств, в том числе хлопок, арахис, бобы, томат, табак, перец, салат, кукурузу, гладиолус, хризантему (Kakkar et al.; Nickle, 2004; Chin-Ling Wang et al., 2010; Riley, 2011).

Кроме вреда, вызываемого питанием, томатный трипс наносит вред в качестве переносчика вирусов из группы тосповирусов. Тосповирус — это род фитовирусов из семейства Bunyaviridae, единственными переносчиками которых служат трипсы из семейства Thripidae и подсемейства Thripinae. *F. schultzei* может переносить такие вирусы, как тосповирус некрозов побегов хризантемы — Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV), включенный в перечень А1 карантинных организмов ЕОКЗР; вирус кольцевой пятнистости арахиса — Groundnut ringspot virus (GRSV), вирус некроза почек арахиса — Groundnut bud necrosis virus (GBNV); вирус хлоротической пятнистости томатов — Tomato

chlorotic spot virus (TCSV), вирус пятнистого увядания томатов — Tomato spotted wilt virus (TSWV), включенный в перечень А2 карантинных объектов ЕОКЗР (Riley et al., 2011).

Известны темная и светлая формы томатного трипса. В отличие от другого полиморфного вида — западного цветочного (калифорнийского) трипса *Frankliniella occidentalis*, в котором самки также встречаются двух форм, темной и светлой, а самцы обеих форм светлые, у *F. schultzei* и самцы и самки встречаются как темные, так и светлые. Изначально эти формы относили к разным видам, но поскольку никаких других морфологических отличий кроме окраски не было установлено, Маунд (Laurence Alfred Mound) объединил различные по цвету формы в единый полиморфный вид — *Frankliniella schultzei* Tryb. В 1969 году было установлено, что темные формы распространены главным образом южнее экватора, а светлые — севернее, однако были территории, на которых встречались совместные колонии (Sakimura, 1969).

На сегодняшний день, учитывая скорость инвазии трипсов из Америки и Африки, существует риск заноса в тепличные хозяйства и распространения вредителя в закрытом грунте.

Одним из диагностических признаков *Frankliniella schultzei* является расположение оснований интероцеллярных щетинок между передними краями задних глазков (рис. 1). Наличие такого признака, не характерного для других представителей рода *Frankliniella*, ранее могло позволить

На сегодняшний день, учитывая скорость инвазии трипсов из Америки и Африки, существует риск заноса в тепличные хозяйства и распространения вредителя в закрытом грунте.

отнести исследуемый образец к роду *Kakothrips*. Однако существуют и другие признаки, отличающие род *Kakothrips* от рода *Frankliniella*: соотношение длин щетинок на передне-спинке (рис. 2) (щетинки S1 на переднем и заднем крае передне-спинки всегда длиннее щетинок S2); наличие зубчика на вершине передних лапок, отсутствие ктенидий на V-VI тергите брюшка и слабо развитые ктенидии на VII-VIII тергите (Ижевский, Аха-



Fig. 1. Head. Common blossom thrips — *Frankliniella schultzei* Tryb. (interocular setae between the anterior ends of the hind ocelli) (photo by V.I. Rozhina)

Рис. 1. Голова. Томатный трипс — *Frankliniella schultzei* Tryb. (интероцеллярные щетинки расположены между передними краями задних глазков) (фото В.И. Рожиной)

тов, 2004; Определитель, 1986; Kakkar et al., Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/11).

Для рода *Frankliniella* характерно: усики восьмичлениковые, 3-4 членик усиков с вильчатой сенсиллой, передне-спинка с пятью парами макрохет, ктенидии на V-VIII тергите брюшка развиты, первая жилка крыла с полным рядом щетинок без перерыва

(Ижевский, Ахатов, 2004; Определитель, 1986). Основные морфологические характеристики *F. schultzei*, отличающие его от близких видов:

1. Основания интероцеллярных щетинок располагаются между передними краями задних глазков (рис. 1);

2. Заглазная щетинка 4-й пары равна 2/3 длины интероцеллярной щетинки;

3. Две микрохеты между передними макрохетами (рис. 2);

4. Колоколовидные сенсиллы на заднегруди отсутствуют;

5. Гребень развит слабо или отсутствует (рис. 3) (Kakkar et al., Nickle, 2004; Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/11, Chin-Ling Wang et al., 2010).

Отличия некоторых других видов этого рода: разноядный трипс — *Frankliniella intonsa* Tryb. — интероцеллярные щетинки располагаются на краю глазкового треугольника, гребень на VIII тергите хорошо развит, с микротрихиями, выходящими из треугольных оснований (рис. 4); тонкоусый трипс — *Frankliniella tenuicornis* Karny — голова вытянута за вершины глаз, основания интероцеллярных щетинок располагаются на краю глазкового треугольника, иногда вне глазкового треугольника, и все заглазные щетинки короткие, гребень на VIII тергите у этого вида также развит слабо, иногда представлен лишь основанием без микротрихий (рис. 10) (Ижевский, Ахатов, 2004; Определитель, 1986).

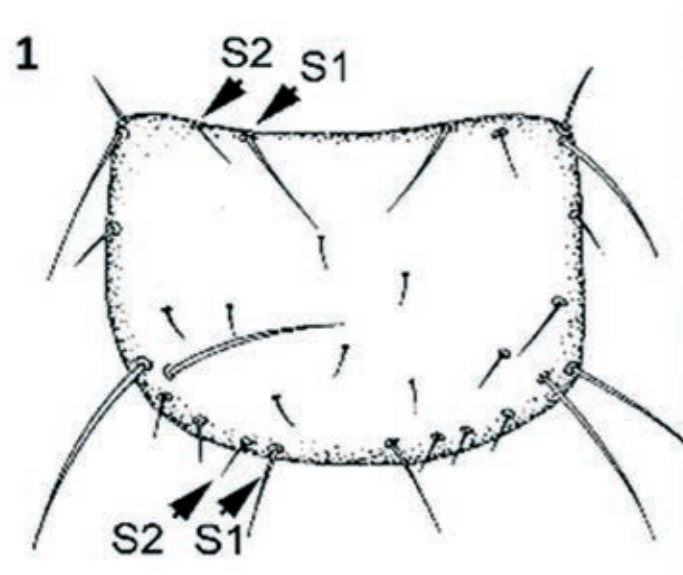


Рис. 2. Переднеспинка:
1 — Гороховый трипс — *Kakothrips robustus* Uzel.
(щетинки S1 всегда длиннее щетинок S2)
(схема Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/11 (1));
2 — Томатный трипс — *Frankliniella schultzei* Tryb.
(две микрохеты между переднекрайними макрохетами)
(фото В.И. Рожиной)

Fig. 2. Pronotum:
1 — Pea thrips — *Kakothrips robustus* Uzel.
(setae S1 always longer than setae S2)
(scheme Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/11 (1));
2 — Common blossom thrips — *Frankliniella schultzei* Tryb.
(two microchaetae between anteromarginal macrochaetae)
(photo by V.I. Rozhina)

За последние два года зарегистрировано 3 случая обнаружения в партиях хризантем, роз, алстромерий, поступающих в Калининградскую область из Нидерландов, еще одного вида трипса из проекта Единого перечня карантинных объектов Таможенного союза — эхинотрипса американского *Echinothrips americanus* Morgan. Впервые этот трипс был обнаружен в 2008 году при досмотре срезанных роз из Кении и Эквадора и с этого момента периодически обнаруживается в подкарантинной цветочной продукции, поступающей в Калининградскую область.

E. americanus является представителем североамериканской фауны, в начале 1990-х годов был занесен на территорию Европы. Зарегистрирован в таких странах Европы, как Австрия, Болгария, Великобритания, Ирландия, Италия, Нидерланды, Норвегия, Польша, РФ, Сербия, Словакия, Словения, Швеция, Хорватия, Чехия, Франция. Кроме того, обнаружен в странах Азии — Китай, Индонезия, Япония, Тайвань, Таиланд (по данным ЕОКЗР). В России был обнаружен в теплицах ботанического сада БИН РАН на драконтинуме и гибискусе в 2005 г.

Этот трипс полифаг, повреждает около 100 видов культурных и дикорастущих растений более чем из 20 семейств, например, такие как хризантема, перец, пуансетия, огурец,

томат, отмечается также заражение снежнойгодника и мимозы, предпочитает растения семейства ароидных Agaceae (спатифиллум, каладиум, аморфофаллус, алоказия и другие) (Ижевский, Миронова, 2008; Клишина, Другова, 2009).

Основные морфологические характеристики:

1. Тело темно-коричневое с красным пигментом между абдоминальными сегментами (рис. 5);

2. Усики восьмичлениковые, I-II сегменты — темно-коричневые, III-IV сегменты — светлее, с простой сенсиллой, V сегмент со светлой базальной частью;

3. Передние крылья затемненные с более светлыми основаниями и вершиной, без резкого расширения в основании;

4. Срединные дорсальные щетинки расположены близко друг к другу, на боках сегментов брюшка имеются ряды микротрихий (рис. 5);

5. Ноги коричневые с желтыми основаниями бедер, вершинами голени и лапками;

6. Ячейки на голове поперечно-вытянутые, ячейки на средней части переднеспинки округло-граненные (рис. 6) (Ижевский, Ахатов, 2004; Masami, 2010; Karedjova, Krumov, 2003).

Представители морфологически близкого рода *Hercinothrips* отличаются наличием вильчатых сенсилл

на III-IV членике усиков, примерно одинаковыми по форме ячейками на голове и переднеспинке (рис. 7) и сравнительно далеко расположенными друг от друга дорсальными щетинками брюшка (Определитель, 1986; Ижевский, Ахатов, 2004).

В проект Единого перечня карантинных объектов Таможенного союза включены два представителя рода *Scirtothrips*. Это цитрусовый трипс — *Scirtothrips citri* Moulton и индокитайский цветочный трипс — *Scirtothrips dorsalis* Hood., последний вид включен в новый перечень карантинных объектов РФ. В Калининградской области было 2 случая выявления трипсов рода *Scirtothrips* в алстромерии из Кении и хризантемах из Нидерландов, в том числе индокитайского цветочного трипса — *Scirtothrips dorsalis* Hood.

S. dorsalis предпочитает растения семейства Бобовые — Fabaceae, может повреждать и другие культуры: актинидию, арахис, перец сладкий и острый, цитрусовые, хлопчатник, землянику, виноград, гортензию, розу, лук. Способность этого трипса повреждать плодовоовощные культуры предполагает возможность его проникновения и распространения в закрытом грунте Российской Федерации (Data Sheets).

Индокитайский цветочный трипс широко распространен в Азии, а так-

же в Австралии и Океании, Америке, Африке. На территории Европы впервые обнаружен в мае 2008 г. в трех теплицах ботанического сада на юге Великобритании.

Представителей рода *Scirtothrips* можно отличить от представителей других родов трипсов по строению желтому телу со слабыми затемнениями, 8-члениковым усикам, переднеднеспинке с тонкой густой

Scirtothrips dorsalis Hood морфологически близок к *Scirtothrips aurantii* Faure и *Scirtothrips oligochaetus* (Karny). У всех этих видов стерниты брюшка полностью покрыты микротрихиями, не исключая центральную область (рис. 10-1). Однако у *S. aurantii* интероцеллярные щетинки располагаются между передними краями задних глазков, в то время как у *S. oligochaetus* и *S. dorsalis* между

В Калининградской области было 2 случая выявления трипсов рода *Scirtothrips* в алстромерии из Кении и хризантемах из Нидерландов, в том числе индокитайского цветочного трипса — *Scirtothrips dorsalis* Hood.

поперечной морщинистостью (рис. 8) и по бокам тергитов, покрытых густыми рядами микротрихий (рис. 9) (Ижевский, Ахатов, 2004; Определитель, 1986; Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/56).

Основные морфологические характеристики:

1. Тело желтое с темным антерокастальным швом на тергитах и стернитах и небольшой коричневой областью в середине (рис. 10-1);

2. Усики восьмичлениковые;

3. Основания интероцеллярных щетинок располагаются между задними глазками;

4. Колоколовидные сенсиллы на заднегруди отсутствуют.

5. Стерниты полностью покрыты рядами микротрихий, тергиты покрыты на 1/3 рядами микротрихий с боков. Микротрихальные поля несут по 3 щетинки (рис. 10-2).

Отличаются же два последних вида по количеству щетинок на микротрихальных полях тергитов. У *S. dorsalis* 3 щетинки (рис. 10-2), у *S. oligochaetus* 4–5 щетинок (Hoddle, Mound, 2003; Mound, Stiller, 2011, Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/56).

Своевременное выявление вредителя в поступающей подкарантинной продукции — единственный способ предотвращения его заноса и распространения на территории Российской Федерации.

Литература

1. Ижевский С.С., Ахатов А.К. (ред.) Защита тепличных и оранжерейных растений от вредителей. — М: Товарищество научных изданий КМК, 2004, 307 с.

2. Определитель насекомых Дальнего Востока СССР. Том 1 Первич-

нобескрылые, древнекрылые с неполным превращением — Л.: Наука, 1986, 452 с.

3. Ижевский С.С., Миронова М.К. Первые находки эхинотрипса американского *Echinothrips americanus* Morgan (Thysanoptera: Thripidae) на территории России. // Российский журнал биологических инвазий, № 8, 2008.

4. Клишина И.С., Другова Е.В. Американский трипс — новый вредитель закрытого грунта. // Защита и карантин растений, № 4, 2009. С. 35–37.

5. Sakimura K.A. (1969) A comment on the color forms of *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae) in relation to transmission of the tomato-spotted wilt virus // Pacific Insects Vol. 11, nos3-4 Доступ: [http://hbs.bishopmuseum.org/pi/pdf/11\(3\)-761.pdf](http://hbs.bishopmuseum.org/pi/pdf/11(3)-761.pdf).

6. Kakkar G., Daksina R., Kumar V. Common blossom thrips, *Frankliniella schultzei* Trybom (Insecta: Thysanoptera: Thripidae). Доступ: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN86000.pdf>.

7. Nickle D.A. Commonly intercepted thrips (Thysanoptera) from Europe, the Mediterranean, and Africa at U.S. ports-of-entry. Part II. *Frankliniella Karny* and *Iridothrips Priesner* (Thripidae). // Proc. Entomol. Soc. Wash. 2004, 106 (2). С. 438–452. Доступ: <http://biostor.org/reference/55449>.

Рис. 3. VIII тергит. Томатный трипс — *Frankliniella schultzei* Tryb. (реберно развит слабо или отсутствует) (фото В.И. Рожиной)

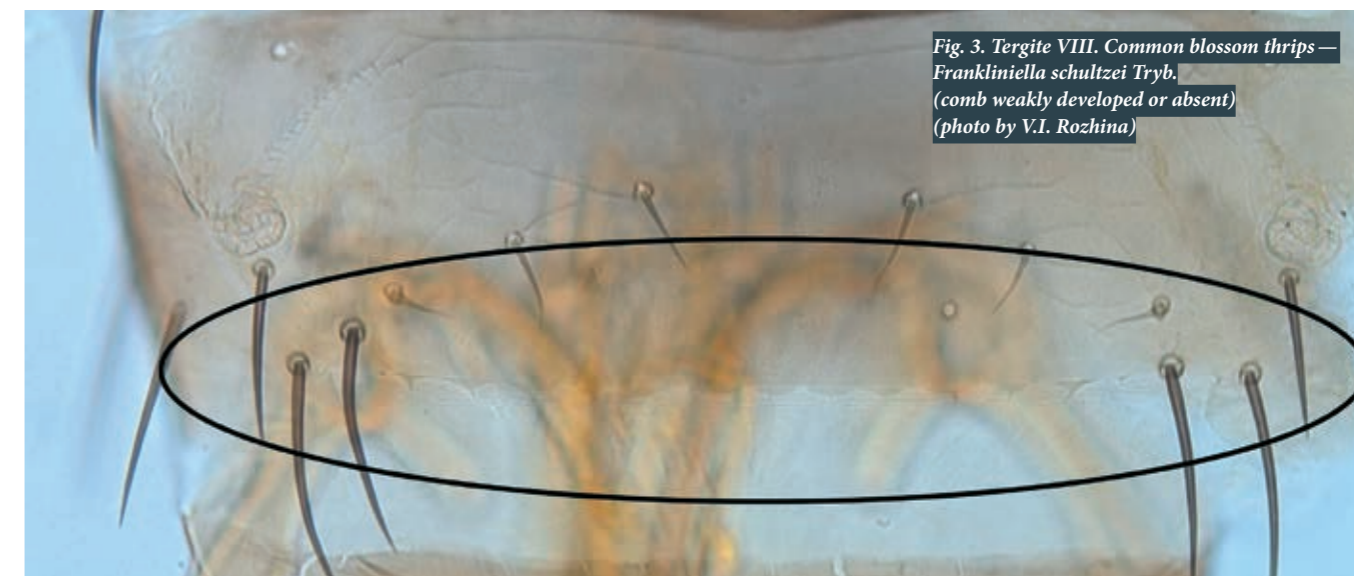


Fig. 3. Tergite VIII. Common blossom thrips — *Frankliniella schultzei* Tryb. (comb weakly developed or absent) (photo by V.I. Rozhina)

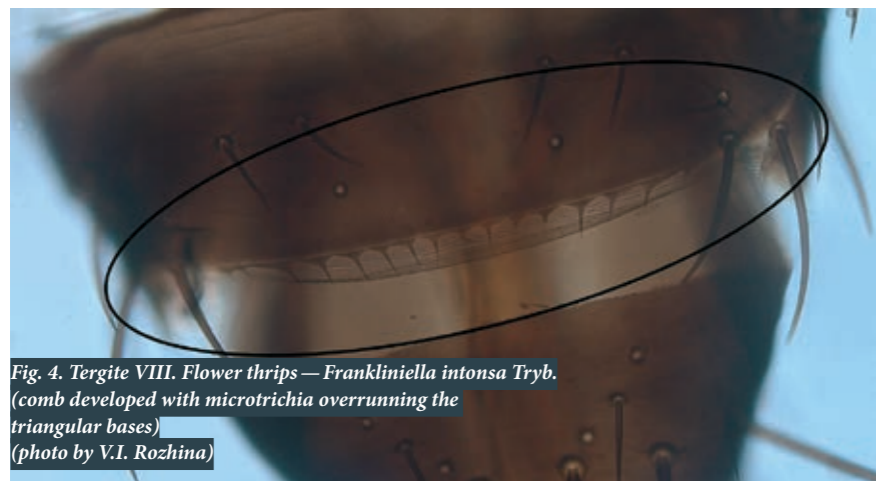


Fig. 4. Tergite VIII. Flower thrips — *Frankliniella intonsa* Tryb. (comb developed with microtrichia overrunning the triangular bases) (photo by V.I. Rozhina)

Рис. 4. VIII тергит. Разноядный трипс — *Frankliniella intonsa* Tryb. (гребень развит с микротрихиями, выходящими из треугольных оснований) (фото В.И. Рожиной)

8. Data Sheets on Quarantine Pests. *Scirtothrips dorsalis*. Режим доступа: https://www.eppo.int/QUARANTINE/insects/Scirtothrips_dorsalis/SCITDO_ds.pdf.

9. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/11 (1) *Frankliniella occidentalis*. Доступ: [http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM7_DIAGNOS/pm7-11\(1\).pdf](http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM7_DIAGNOS/pm7-11(1).pdf).

10. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/56 *Scirtothrips aurantii*, *Scirtothrips citri* and *Scirtothrips dorsalis*. Доступ: [http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM7_DIAGNOS/pm7-56\(1\).pdf](http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM7_DIAGNOS/pm7-56(1).pdf).

archives.eppo.int/EPPOStandards/PM7_DIAGNOS/pm7-56(1)%20SCITSP%20web.pdf.

11. Karedjova O., Krumov V. *Echinothrips americanus* Morgan (Thysanoptera: Thripidae), a new pest of the Bulgarian greenhouses (2003) Доступ: [http://www.researchgate.net/publication/249322406_Echinothrips_americanus_Morgan_\(Thysanoptera_Thripidae\)_a_new_pest_of_the_Bulgarian_greenhouses](http://www.researchgate.net/publication/249322406_Echinothrips_americanus_Morgan_(Thysanoptera_Thripidae)_a_new_pest_of_the_Bulgarian_greenhouses).

12. Masami M. Key to Genera of the Subfamily Thripinae (Thysanoptera:

Thripidae) Associated with Japanese Plant Quarantine. // Bull. Pl. Prot. Japan № 46 стр. 25-46 (2010) Доступ: http://www.maff.go.jp/pps/j/guidance/r_bulletin/pdf/rb046_004.pdf.

13. Chin-Ling Wang, Feng-Chyi Lin, Yi-Chung Chiu, Hsien-Tzung Shih. Species of *Frankliniella* Trybom (Thysanoptera: Thripidae) from the Asian-Pacific Area. // Zoological Studies 49 (6). С. 824-838 (2010) Доступ: <http://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/49.6/824.pdf>.

14. Hoddle M., Mound L.A. The genus *Scirtothrips* in Australia (Insecta, Thysanoptera, Thripidae) // Zootaxa 268: 1-40 (2003). Доступ: <http://iphylo.org/~rpage/afd/id/606750b6-f419-46f5-83fb-bce5cb6dac71>.

15. Riley D.G., Joseph S.V., Srinivasan R., Diffie S. (2011) Thrips vectors of Tospoviruses // Journal of Integrated Pest Management vol. 1. Доступ: http://www.tomatospottedwiltinfo.org/documents/thrips_vectors_of_tospoviruses.pdf.

16. Mound L.A. & Stiller M. (2011) Species of the genus *Scirtothrips* from Africa (Thysanoptera, Thripidae) Zootaxa 2786: 51-61 Доступ: [www.researchgate.net/profile/Laurence_Mound/publication/228505043_Species_of_the_genus_Scirtothrips_from_Africa_\(Thysanoptera_Thripidae\)/links/0deec518c0f3cedd3](http://www.researchgate.net/profile/Laurence_Mound/publication/228505043_Species_of_the_genus_Scirtothrips_from_Africa_(Thysanoptera_Thripidae)/links/0deec518c0f3cedd3).

Рис. 5. Тергиты брюшка. Эхинотрипс американский — *Echinothrips americanus* Morg.:

1 — ряды микротрихий на боках тергитов;
2 — дорсальные щетинки (фото В.И. Рожиной)



Fig. 5. Abdominal tergites. Poinsettia thrips — *Echinothrips americanus* Morg.: 1 — rows of microtrichia on the edges of tergites; 2 — dorsal setae (photo by V.I. Rozhina)

THRIPS INTERCEPTED IN REGULATED ARTICLES IMPORTED INTO Kaliningrad Region as Candidates for Inclusion into the Pest List of the Customs Union

Viktoria I. Rozhina, Leading Biologist at the Kaliningrad Interregional Veterinary Laboratory

Thrips are very small insects belonging to the order Thysanoptera widely distributed from the tropics to the northernmost and southernmost latitudes. They are typical pests of angiospermous, gymnospermous and spore plants, mainly phytophagous, feeding on vegetative and reproductive organs of a host plant (Izhevsky, Akhatov, 2004).

Before the new version of the List of pests quarantine for the Russian Federation came into effect, it contained two species of this order: *Thrips palmi* Karny and *Frankliniella occidentalis* Perg.; however, there are many more potentially dangerous species capable of damaging plants both in protected and unprotected cultivation.

The potential spread of thrips can occur with such consignments as cut flowers, potted plants, plants for planting (nursery plants, seedlings, bulbs of floricultural crops, etc.), and various fruits and vegetables: tomato, aubergine, pepper, cape gooseberry, cucumber, cabbage (particularly, young and Chinese cabbage), green asparagus, lettuce, berries (strawberry, blueberry, dewberry, red currant, etc.), peach, nectarine and others.

The draft List of pests quarantine for the Customs Union includes 11 Thysanoptera species:

1. *Echinothrips americanus* Morgan — poinsettia thrips;
2. *Frankliniella fusca* (Hinds) — tobacco thrips;
3. *Frankliniella insularis* (Franklin) — flower thrips;
4. *Frankliniella occidentalis* Perg. — western flower thrips;

5. *Frankliniella tritici* (Fitch) — eastern flower thrips;

6. *Frankliniella schultzei* (Trybom) — common blossom thrips;

7. *Frankliniella williamsi* Hood — corn thrips;

8. *Scirtothrips citri* (Moulton) — citrus thrips;

9. *Scirtothrips dorsalis* Hood — yellow tea thrips;

10. *Thrips hawaiiensis* Morgan — banana flower thrips;

11. *Thrips palmi* Karny — melon thrips.

Some of the abovementioned species are frequently found in regulated articles imported into Kaliningrad region from the countries of Africa, Europe, and America.

One of these species, the common blossom thrips *Frankliniella schultzei* Tryb., is on the A1 List of pests quarantine for the Customs Union (Fig. 1).

In Kaliningrad region, the common blossom thrips was found in consignments of roses and chrysanthemums from Kenya and the Netherlands eight times over the past two years.

This pest of African origin has spread in the countries of America, Asia, Europe, in Australia and Oceania.

The common blossom thrips is broadly polyphagous. It damages 83 species of plants from 35 families including cotton, peanut, beans, tomato, tobacco, pepper, lettuce, corn, swordgrass lily, and chrysanthemum (Kakkar et al.; Nickle, 2004; Chin-Ling Wang et al., 2010; Riley, 2011).

The common blossom thrips causes damage not only by feeding; it is also hazardous being a vector of tospovirus-

es. The tospoviruses are a genus of plant infecting viruses of the Bunyaviridae family and are exclusively vectored by thrips belonging to the subfamily Thripinae of the family Thripidae. *F. schultzei* can transmit such viruses as Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV) included in the EPPO A1 List, Groundnut ringspot virus (GRSV), Groundnut bud necrosis virus (GBNV), Tomato chlorotic spot virus (TCSV), Tomato spotted wilt virus (TSWV) included in the EPPO A2 List (Riley et al., 2011).

The common blossom thrips manifests pale and dark color forms. In contrast with another polymorphous species — the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* whose females

In Kaliningrad region, the common blossom thrips was found in consignments of roses and chrysanthemums from Kenya and the Netherlands eight times over the past two years.

can also be pale and dark, and males of the both forms are pale — males and females of *F. schultzei* can be both dark and pale. Initially, these forms were considered to be different species. However, since the color was identified as the only morphological difference, Laurence Alfred Mound categorized the morphs different in color as one polymorphic species — *Frankliniella schultzei* Tryb. In 1969, dark morphs were found to be spread to the south of equator and pale ones — to the north. However,

mixed colonies of the both color forms were reported in some areas (Sakimura, 1969).

At present, taking into consideration the speed of thrips invasion from America and Africa, there's a risk of their introduction into greenhouses and spread in protected cultivation.

One of *Frankliniella schultzei* diagnostic features is the interocellar setae arising between the anterior ends of the hind ocelli (Fig. 1). This feature is not typical of other *Frankliniella* spp., and it used to be the characteristic by which a specimen under study could be identified as belonging to the genus *Kakothrips*. However, there are other features distinguishing the genus *Kakothrips* from the genus *Frankliniella*: the correlation of setae length on the pronotum (Fig. 2) (setae S1 on the front and back side of the pronotum are always longer than setae S2); a denticle on top of the front legs, lack of ctenidia on abdominal tergites V-VI and poorly developed ctenidia on tergites VII-VIII (Izhevsky, Akhatov, 2004; Identification Manual, 1986; Kakkar et al., Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/11).

The genus *Frankliniella* is characterized by 8-segmented antennae, the 3-4th antennal segment has a forcipate sensillum, pronotum is with five pairs of macrochaetae, ctenidia on abdominal tergites V-VIII are developed, the first wing vein has a setal row almost uninterrupted (Izhevsky, Akhatov, 2004; Identification Manual, 1986).

Key morphological characteristics distinguishing *F. schultzei* from its related species are as follows:

1. The base of interocellar setae is found between the anterior ends of the hind ocelli (Fig. 1);

2. A postocular seta of the 4th pair is 2/3 of the length of an interocellar seta;

3. There are two microchaetae between anteromarginal macrochaete (Fig. 2);

4. There are no campaniliform sensilla on the metathorax;

5. The comb is weakly developed or absent (Fig. 3) (Kakkar et al., Nickle, 2004; Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/11, Chin-Ling Wang et al., 2010).

Distinctive features of other species of this genus are as follows: *Frankliniella intonsa* Tryb. — interocellar setae arising on anterior margin of ocellar triangle, comb on tergite VIII well developed with microtrichia overrunning

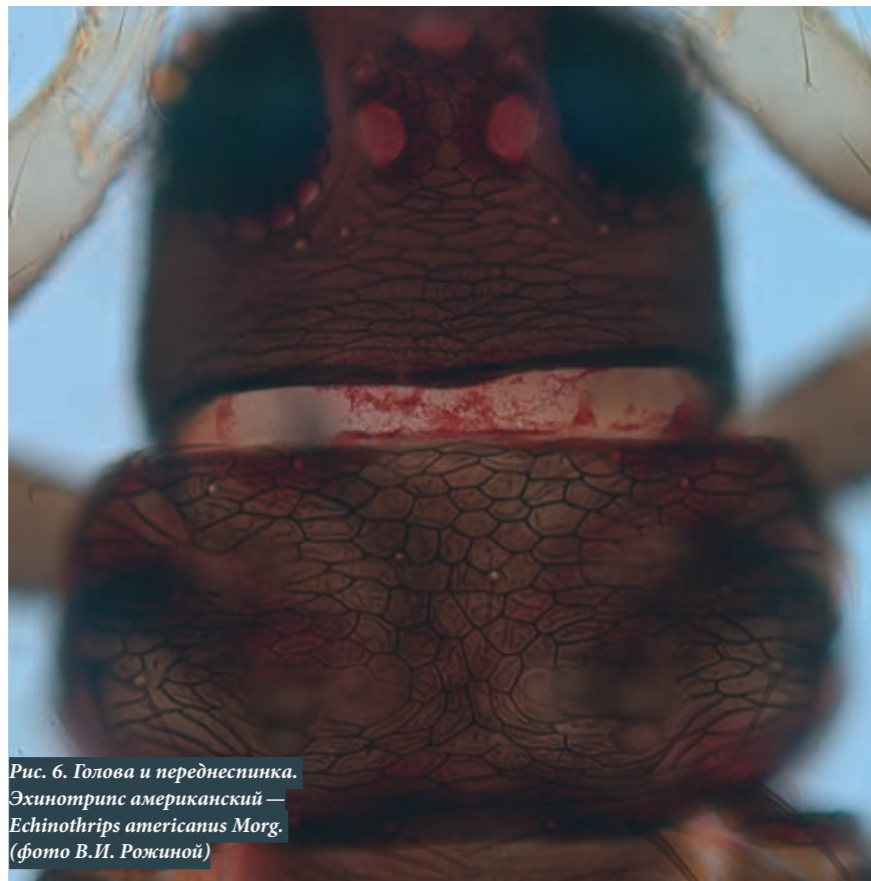


Рис. 6. Голова и переднеспинка. Эхинотрипс американский — *Echinothrips americanus* Morg. (фото В.И. Рожиной)

Fig. 6. Head and pronotum. Poinsettia thrips — *Echinothrips americanus* Morg. (photo by V.I. Rozhina)

the triangular bases (Fig. 4); *Frankliniella tenuicornis* Karny — head projecting in front of eyes, interocellar setae arising on the margin of the ocellar triangle, sometimes outside the ocellar triangle, all postocular setae short, comb on tergite VIII weakly developed in this species, as well, sometimes only having a base with no microtrichia (Fig. 10) (Izhevsky, Akhatov, 2004; Identification Manual, 1986).

Over the past two years, another thrips species — *Echinothrips americanus* Morgan — was intercepted thrice in consignments of chrysanthemums, roses, alstroemerias imported into Kaliningrad region from the Netherlands. This thrips species is also included into the draft List of pests quarantine for the Customs Union. This thrips was first detected in 2008 during the inspection of cut roses from Kenya and Ecuador. Since then it has been frequently intercepted in consignments of flowers imported into Kaliningrad region.

E. americanus belongs to the North American fauna. In early 1990s, it was introduced into Europe. It is reported in such European countries as Austria,

These are *Scirtothrips citri* Moulton and *Scirtothrips dorsalis* Hood. In Kaliningrad region, thrips of the genus *Scirtothrips* were intercepted twice in alstroemerias from Kenya and chrysanthemums from the Netherlands.

Bulgaria, the UK, Ireland, Italy, the Netherlands, Norway, Poland, Russia, Serbia, Slovakia, Slovenia, Sweden, Croatia, the Czech Republic, and France. Besides, it has been found in the following Asian countries — China, Indonesia, Japan, Taiwan, Thailand (according to EPPO). In Russia, it was found on dracontium and hibiscus in the greenhouses of the Saint Petersburg Botanical Garden in 2005.

This thrips is polyphagous damaging about 100 species of cultivated and wild plants of over 20 families, for instance, chrysanthemum, pepper, poinsettia, cucumber, tomato. It is also known to attack snowberry and mimosa preferring plants of the family Araceae (*Spathiphyllum*, *Caladium*, *Amorphophallus*, *Alocasia*, etc.) (Klishina, Drugova, 2009; Izhevsky, Mironova, 2008).



Рис. 7. Голова и переднеспинка. Декоративный трипс — *Hercinothrips femoralis* Reut. (фото В.И. Рожиной)

Fig. 7. Head and pronotum. Sugarbeet thrips — *Hercinothrips femoralis* Reut. (photo by V.I. Rozhina)

Key morphological characteristics are as follows:

1. The body is dark brown with red pigment between the abdominal segments (Fig. 5);

2. Antennae are 8-segmented, segments I-II are dark brown, segments III-IV are lighter with a simple sensillum, segment V has a light basal part;

3. Forewings are dark with lighter base and top, without sharp widening at the base;

4. Median dorsal setae are closely spaced, rows of microtrichia are on the edges of abdominal segments (Fig. 5);

5. Legs are brown with yellow femoral bases, tibiae and tarsi;

6. Reticules on the head are transversally elongate, reticules on the central part of the pronotum are rounded and faceted (Fig. 6) (Izhevsky, Akhatov, 2004; Masami, 2010; Karedjova, Krumov, 2003).

At present, taking into consideration the speed of thrips invasion from America and Africa, there's a risk of their introduction into greenhouses and spread in protected cultivation.



Рис. 8. Переднеспинка *Scirtothrips*. Фазовый контраст (фото В.И. Рожиной)

Fig. 8. Pronotum in *Scirtothrips*. Phase contrast (photo by V.I. Rozhina)

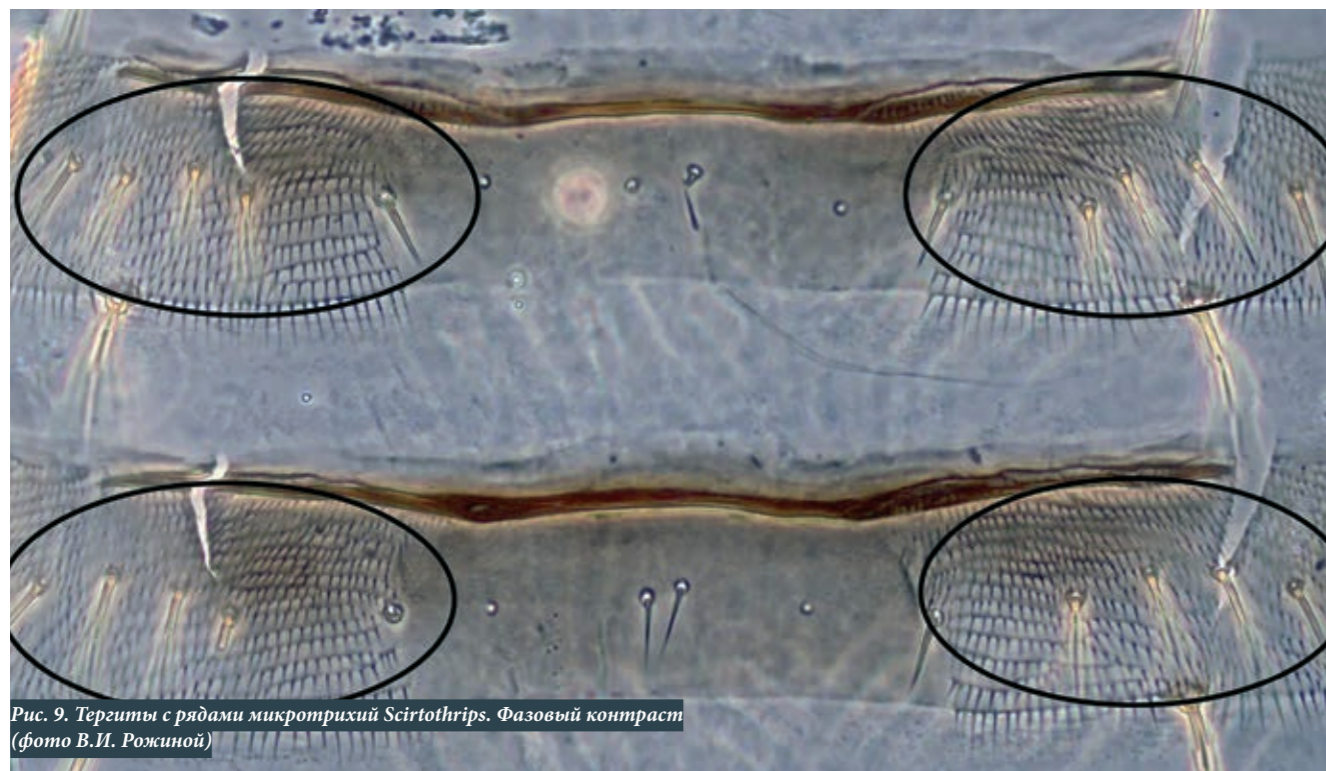


Рис. 9. Тергиты с рядами микротрихий *Scirtothrips*. Фазовый контраст (фото В.И. Рожной)

Fig. 9. Tergites with rows of microtrichia in *Scirtothrips*. Phase contrast (photo by V.I. Rozhina)

Specimens of the morphologically close genus *Hercinothrips* are distinguished by the presence of forcipate sensilla on antennal setae III-IV, reticules of approximately the same shape on the head and pronotum (Fig. 7) and abdominal setae arising comparatively remotely from one another (Izhevsky, Akhatov, 2004; Identification Manual, 1986).

The draft List of pests quarantine for the Customs Union contains two species of the genus *Scirtothrips*. These are *Scirtothrips citri* Moulton and *Scirtothrips dorsalis* Hood., the latter being on the new List of pests quarantine for the Russian Federation. In Kaliningrad region, thrips of the genus *Scirtothrips* were intercepted twice in alstroemerias from Kenya and chrysanthemums from the Netherlands.

S. dorsalis prefers plants of the family Fabaceae. It can damage other crops: actinidia, peanut, sweet and chili pepper, citrus fruit crops, cotton plant, strawberry, grapevine, hydrangea, rose and onion. The ability of this thrips to damage horticultural crops implies its potential introduction and spread in protected cultivation in Russia (Data Sheets).

S. dorsalis is widely distributed in Asia, Australia, Oceania, America, and

Africa. In Europe, the first detection took place in three greenhouses of a botanical garden in the south of Great Britain in May 2008.

Scirtothrips species can be distinguished from other thrips genera by their slender yellow body with slightly darkened areas, 8-segmented antennae, pronotum with closely spaced transversal fine lines (Fig. 8) and by the sides of tergites covered with closely spaced rows of microtrichia (Fig. 9) (Izhevsky, Akhatov, 2004; Identification Manual, 1986; Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/56).

Key morphological characteristics are as follows:

1. The body is yellow with dark antecostal ridge on tergites and sternites and a small brown area medially (Fig. 10-1);
2. Antennae are 8-segmented;
3. Interocellar setae arise between hind ocelli;
4. There are no campaniliform sensilla on the metathorax;
5. Sternites are completely covered with rows of microtrichia, 1/3 of the surface of tergites is laterally covered with rows of microtrichia. Microtrichial fields carry 3 setae each (Fig. 10-2).

Scirtothrips dorsalis Hood is morphologically close to *Scirtothrips aurantii* Faure and *Scirtothrips oligo-*

chaetus (Karny). In all of these species, abdominal sternites are completely covered by microtrichia, the central part being no exclusion (Fig. 10-1). However, in *S. aurantii* interocellar setae arise between the anterior edges of hind ocelli, while in *S. oligochaetus* and *S. dorsalis* — between hind ocelli. The two latter species differ in the number of setae on tergite microtrichial fields. In *S. dorsalis* there are three setae (Fig. 10-2) and in *S. oligochaetus* — 4–5 setae (Hoddle, Mound, 2003; Mound, Stiller, 2011, Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/56).

Timely detection of the pest in imported regulated articles is the only option for preventing its introduction and spread in the Russian Federation.

References

1. Izhevsky S.S., Akhatov A.K. (editor). Protection of Greenhouse and Conservatory Plants from Pests. — M: Tovarishestvo nauchnykh izdaniy KMK, 2004, 307 pp.
2. Identification Manual for Insects of the USSR Far East. Vol. 1 Apterygota, Hemimetabolous Palaeoptera — L.: Nauka, 1986, 452 pp.
3. Izhevsky S.S., Mironova M.K. First occurrences of *Echinothrips americanus* Morgan (Thysanoptera: Thripidae) in

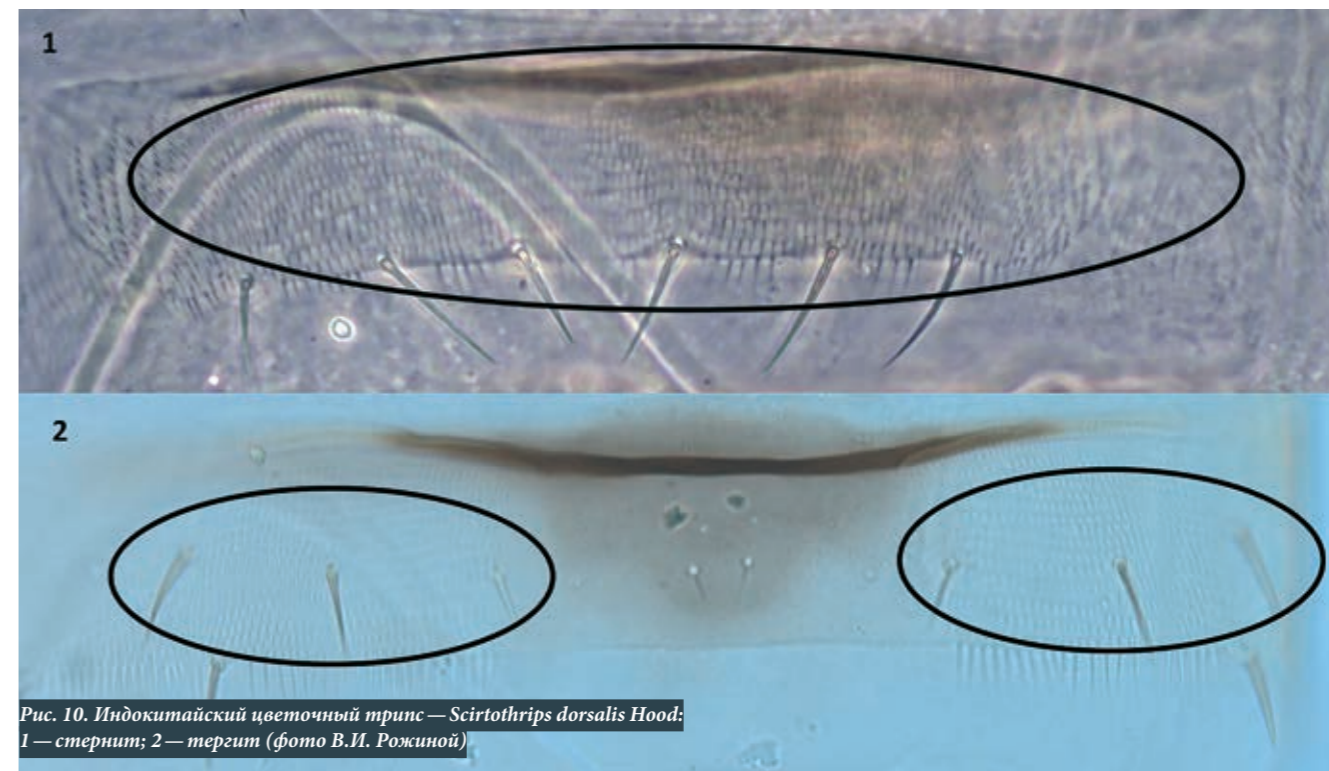


Рис. 10. Индокитайский цветочный трипс — *Scirtothrips dorsalis* Hood: 1 — стернит; 2 — тергит (фото В.И. Рожной)

Fig. 10. Yellow tea thrips — *Scirtothrips dorsalis* Hood: 1 — sternite; 2 — tergite (photo by V.I. Rozhina)

Russia. // The Russian Journal of Biological Invasions, № 8, 2008.

4. Klishina I.S., Drugova E.V. *Echinothrips americanus* — a new pest in protected cultivation. // Plant Protection and Quarantine Journal, № 4, 2009. P. 35–37.

5. Sakimura K.A. (1969) A comment on the color forms of *Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae) in relation to transmission of the tomato-spotted wilt virus // Pacific Insects Vol. 11. Accessed at: [http://hbs.bishop-museum.org/pi/pdf/11\(3\)-761.pdf](http://hbs.bishop-museum.org/pi/pdf/11(3)-761.pdf).

6. Kakkar G., Daksina R., Kumar V. Common blossom thrips, *Frankliniella schultzei* Trybom (Insecta: Thysanoptera: Thripidae). Accessed at: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/IN/IN86000.pdf>.

7. Nickle D.A. Commonly intercepted thrips (Thysanoptera) from Europe, the Mediterranean, and Africa at U.S. ports-of-entry. Part II. *Frankliniella* Karny and *Iridothrips* Priesner (Thripidae). // Proc. Entomol. Soc. Wash. 2004, 106 (2). P. 438–452. Accessed at: <http://biostor.org/reference/55449>.

8. Data Sheets on Quarantine Pests. *Scirtothrips dorsalis*. Accessed at: https://www.eppo.int/QUARANTINE/insects/Scirtothrips_dorsalis/SCITDO_ds.pdf.

9. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/11 (1) *Frankliniella occiden-*

talis. Accessed at: [http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM7_DIAGNOS/pm7-11\(1\).pdf](http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM7_DIAGNOS/pm7-11(1).pdf).

10. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/56 *Scirtothrips aurantii*, *Scirtothrips citri* and *Scirtothrips dorsalis*. Accessed at: [http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM7_DIAGNOS/pm7-56\(1\)%20SCITSP%20web.pdf](http://archives.eppo.int/EPPOStandards/PM7_DIAGNOS/pm7-56(1)%20SCITSP%20web.pdf).

11. Karedjova O., Krumov V. *Echinothrips americanus* Morgan (Thysanoptera: Thripidae), a new pest of the Bulgarian greenhouses (2003). Accessed at: [http://www.researchgate.net/publication/249322406_Echinothrips_americanus_Morgan_\(Thysanoptera_Thripidae\)_a_new_pest_of_the_Bulgarian_greenhouses](http://www.researchgate.net/publication/249322406_Echinothrips_americanus_Morgan_(Thysanoptera_Thripidae)_a_new_pest_of_the_Bulgarian_greenhouses).

12. Masami M. Key to Genera of the Subfamily Thripinae (Thysanoptera: Thripidae) Associated with Japanese Plant Quarantine. // Bull. Pl. Prot. Japan № 46, P. 25–46 (2010). Accessed at: http://www.maff.go.jp/pps/j/guidance/r_bulletin/pdf/rb046_004.pdf.

13. Chin-Ling Wang, Feng-Chyi Lin, Yi-Chung Chiu, Hsien-Tzung Shih. Species of *Frankliniella* Trybom (Thysanoptera: Thripidae) from the Asian-Pacific Area. // Zoological Studies 49 (6) P. 824–838 (2010). Accessed at: <http://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/49.6/824.pdf>.

14. Hoddle M., Mound L.A. The genus *Scirtothrips* in Australia (Insecta, Thysanoptera, Thripidae) // Zootaxa 268: 1-40 (2003). Accessed at: <http://iphylo.org/~rpage/afd/id/606750b6-f419-46f5-83fb-bce5cb6dac71>.

15. Riley D.G., Joseph S.V., Srinivasan R., Diffie S. (2011) Thrips vectors of Tospoviruses // Journal of Integrated Pest Management vol. 1. Accessed at: http://www.tomatospottedwiltinfo.org/documents/thrips_vectors_of_tospoviruses.pdf.

16. Mound L.A. & Stiller M. (2011) Species of the genus *Scirtothrips* from Africa (Thysanoptera, Thripidae) Zootaxa 2786: 51-61. Accessed at: [www.researchgate.net/profile/Laurence_Mound/publication/228505043_Species_of_the_genus_Scirtothrips_from_Africa_\(Thysanoptera_Thripidae\)/links/0deec518c0f3ceddd3](http://www.researchgate.net/profile/Laurence_Mound/publication/228505043_Species_of_the_genus_Scirtothrips_from_Africa_(Thysanoptera_Thripidae)/links/0deec518c0f3ceddd3).

ВЕРОЯТНОСТЬ ПОЯВЛЕНИЯ ТОМАТНОЙ ОГНЕВКИ *Neoleucinodes elegantalis* Guenee (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae) на посевах пасленовых в России

В.Н. Жимерикин, ведущий научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»

Ю.В. Смирнов, заместитель начальника научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР»

Томаты, имеющие южноамериканское происхождение, широко распространены в мире. В настоящее время это самая популярная и повсеместно распространенная овощная культура, по своей популярности превосходящая бананы — для тропических стран важнейшее пищевое растение и главная статья экспорта. Производство бананов приближается к 100 млн т, тогда как томатов — к 150 млн т (<http://www.foodmarket...>). Привлекают томаты своими пищевыми и лекарственными свойствами. Особенно хороши томаты, выращенные специалистами (селекционерами), над которыми не довели «не только требования промышленного производства: дружность созревания и устойчивость к болез-

ням, но и современной торговли: глянец и транспортабельность» (<https://sad6sotok.ru>).

Выращенные из сортовых семян где-нибудь в глубинке без пестицидного пресса в природных условиях такие томаты — большая редкость. Мало кто знает их истинную, еще не познанную ценность. Лишь интуитивное стремление видеть такие томаты на своем столе рождает спрос и является мощным стимулом увеличения производства.

Основными производителями томатов в мире являются Китай (50 млн т), Индия (17,5 млн т), США (13,2 млн т), Турция (11,3 млн т), Египет (8,6 млн т). Россия производит 2,4 млн т томатов. В Европе основным производителем томатов являются страны Средиземноморского бассейна. Многие страны ввозят томаты, в том числе страны товарного произ-

водства этих плодов. По данным 2011 года, США ввозят 1,49 млн т, Россия — 0,73; Германия — 0,70; Франция — 0,52; Великобритания — 0,41; Нидерланды — 0,21 (<http://faostat...>).

Значительную часть томатов США импортирует из стран Южной Америки. Многие из этих стран являются местообитанием томатной огневки *Neoleucinodes elegantalis*, среди них Аргентина, Бразилия, Венесуэла, Колумбия, Парагвай, Перу, Уругвай, Эквадор. В регионе ЕОКЗР, в том числе и в России, вредитель отсутствует.

Neoleucinodes elegantalis питается плодами пасленовых культур, в том числе таких экономически важных видов, как томаты *Solanum lycopersicum*, баклажан *S. melongena*, перец *Capsicum annuum* и другие тропические виды этого семейства: *S. aethiopicum* (гило), *S. quitoense* (наранхилья), *S. betaceum* (томатное дерево),

S. sessiliflorum (кокона). Вредитель также питается сорными и дикими видами рода *Solanum*: *S. acerifolium*, *S. atropurpureum*, *S. crinitum*, *S. torvum*, *S. hirtum*, *S. lycocarpum*, *S. viarum*, *S. sisymbriifolium*. *N. elegantalis* выявлена на более чем тридцати растениях, относящихся в основном к семейству пасленовых (<http://idtools.org/>).

Бабочка томатной огневки имеет размах крыльев 15–33 мм, самки больше самцов (Obando Melo, 2011) (рис. 1). Крылья белые, слегка прозрачные, переднее крыло имеет три коричневых неправильных по форме кляксообразных пятна, а задние крылья — рассеянные черные точки.

Имаго активны ночью, в дневное время прячутся в укрытиях. Продолжительность стадии имаго составляет около 6 дней.

Вредитель дает несколько генераций в год. При 27 °С полный цикл

Основными производителями томатов в мире являются Китай (50 млн т), Индия (17,5 млн т), США (13,2 млн т), Турция (11,3 млн т), Египет (8,6 млн т).

развития происходит в течение 34 дней, при 20 °С — 51 день. Развитие прекращается при температурах ниже 14,7 °С и выше 34,5 °С.

Яйца (белые, овальные 0,5 × 0,3 мм) откладываются поодиночке или небольшими кучками на черешки и чашелистики цветов и в средней части небольших плодов диаметром 12–20 мм. В случае высокой плотности вредителя яйца могут быть отложены на листья. Каждая самка может отложить около 160 яиц.

После выхода из яйца гусеницы проникают внутрь молодого плода, проделывая небольшие малозаметные отверстия и питаясь семенами и мякотью плода. Длина гусениц старших возрастов составляет 12–15 мм.

Достаточно одной гусеницы в плоде, чтобы томат потерял свои товарные качества. В случае сильного заражения в плоде может насчитываться до 18 гусениц вредителя.

Перед окукливанием гусеницы покидают плод, делая при этом большое отверстие, через которое могут проникать грибные и бактериальные инфекции. Окукливание может происходить в сложенном листе на растении, в почве или растительных остатках.

Заражение плодов приводит к их преждевременному опаданию. Наибольшее повреждение наблюдается к моменту сбора урожая. В поврежденных плодах количество семян может уменьшаться на 30–100%, по сравнению с неповрежденными плодами.

N. elegantalis считается серьезным вредителем пасленовых в Бразилии, Колумбии, Венесуэле, а снижение урожая томатов в этих странах достигает 50–90% (Reporting service, 2012).

Можно предполагать, что *N. elegantalis* сможет успешно развиваться в странах Средиземноморского бассейна, а в РФ — в зонах субтропического климата и в умеренном климате, где температура самого холодного месяца положительная, или она положительная в почве, растительных остатках, где перезимовыва-

Венесуэлы, Эквадора, Перу. Около 60% всех выявлений приходилось на Бразилию (Molet, 2012).

По данным FAVIR (2012), США ввозят томаты, баклажан, перец более чем из десяти стран Центральной и Южной Америки, в которых присутствует вредитель. Для этих товаров в США в последнее время существуют ограничения для каждого вида, смысл которых заключается в том, что ввоз производится из стран, где поврежденность плодов вредителем минимальная. Так, для перца *Capsicum* spp. разрешается ввоз из стран, где поражение *N. elegantalis* минимальное: Гренада, Гвиана, Ямайка, Тринидад и Тобаго. В настоящее время в соответствии с FAVIR (2012) томаты, баклажан и перец из Бразилии, Венесуэлы, Эквадора и Перу не ввозятся.

В Европе в 2012 году *N. elegantalis* была обнаружена в трех случаях в Нидерландах на импортируемых баклажанах из Суринама и при проверке багажа пассажиров в аэропорту Схипхол (Schiphol) (<http://www.scoop...>).

В настоящее время РФ ввозит около 1 млн т плодов, потенциально поражаемых томатной огневкой, в том числе 829 тыс. т томатов и 161 тыс. т перца (<http://www.fruitnews...>). По оценке аналитиков «Технологии роста», абсолютным лидером среди импортеров свежих томатов в Россию в течение многих лет является Турция — на ее долю приходится от 45 до 50%. Второе место стабильно занимает Китай (9%). Страны на третьей позиции меняются из года в год, но чаще всего ими являются Украина, Нидерланды, Азербайджан и Марокко. Импортируемые товары в зимне-весенний период занимают до 95% российского рынка.

Достаточно одной гусеницы в плоде, чтобы томат потерял свои товарные качества.

Основной ввоз томатов происходит из стран, в которых отсутствует томатная огневка. Ввоз другой сельскохозяйственной продукции из стран, где она вредоносна, опасности не представляет. Так, довольно масштабный ввоз фруктов (свыше 0,6 млн т) происходит из Эквадора,

Рис. 1. Бабочки томатной огневки (из статьи А.Е. Diaz et al., 2010)



где вредоносность огневки хорошо известна, но случаев заноса с поврежденной растительной продукцией не отмечено. Поэтому в настоящее время проникновение томатной огневки на территорию РФ маловероятно.

В то же время процесс импортозамещения предполагает расширение площадей посевов томатов в Российской Федерации. В ближайшие пять лет согласно прогнозам аналитиков «Технологии роста» посевные площади этой культуры должны увеличиться на 20%. Эмбарго России на растительную продукцию рождает массу предложений, в том числе ввоз томатов из стран распространения томатной огневки. В качестве примера можно привести Мексику, которая наряду с другими товарами готова экспортировать томаты в РФ, при одновременном экспорте их в США и Канаду. Бразилия, Ко-

Эмбарго России на растительную продукцию рождает массу предложений, в том числе ввоз томатов из стран распространения томатной огневки.

лумбия, Эквадор готовы расширить спектр и объем поставок растительной продукции в РФ, в том числе и томатов.

И все-таки риск заноса *N. elegantalis* в РФ остается маловероятным, поскольку ввоз основного количества томатов происходит из стран Средиземноморского бассейна или ввоз их может происходить в зимнее время.

Занос вредителя может произойти по типу томатной моли *Tuta absoluta*, т.е. вначале произойдет его проникновение в страны Средиземноморского бассейна, затем в страны с умеренным климатом, а также в теплицы. Теплицы могут выступать в качестве «инфекционного» начала,

благоприятствуя появлению временных (транзитных) очагов в климатических зонах, где *N. elegantalis* не сможет перезимовывать.

Вредоносность вида будет проявляться в РФ на побережье Черного и Каспийского морей и в умеренном климате с положительной зимней температурой. Периодическая вредоносность может наблюдаться в Краснодарском, Ставропольском крае и юге Ростовской области, где средняя температура самого холодного месяца колеблется от +1 до -2,8 °C. В этой зоне выращивается около 45–50% томатов РФ.

При периодической вредоносности в открытом грунте в этих регионах предполагаемая вредоносность будет наблюдаться на площади 10 тыс. га. При урожае 16 тонн/га и стоимости 40 тыс. руб. за одну тонну ущерб составит около 6,4 млрд руб.

В защищенном грунте РФ на об-

ных вредных организмов, отсутствующих на территории стран ЕОКЗР как карантинный вредитель (EPPO A IList, версия 2014-09).

Литература

1. AQAS (2012) All *Neoleucinodes elegantalis* interceptions. Accessed April 11, 2012. from: <https://moks14.aphis.usda.gov/aqas/HomePageIList.do>.
2. Diaz A.E., Solis A., Brochero H.L. (2011) Distribucion geografica de *Neoleucinodes elegantalis* (Lepidoptera: Crambidae) en Colombia. Rev. Colomb., v. 37, n. 1.
3. EPPO Reporting service 2012/052 *Neoleucinodes elegantalis*, a borer of solanaceous fruit: addition to the EPPO Alert List. Pp. 5–7.
4. FAVIR (2012) Fruits and vegetables import requirements (FAVIR). United States department of agriculture, animal and plant health inspection service (APHIS). Accessed April 10 and 11, 2012 from: <https://epermits.aphis.usda.gov/manual/index.cfm?action=pubHome>.
5. Molet T. (2012) CPHST Pest datasheet for *Neoleucinodes elegantalis*. USDA-APHIS-PRQ-CPHST.
6. Obando Melo V.P. (2011) Variabilidad morfometrica de *Neoleucinodes elegantalis* (Guenee): perforador de fruto de solanaceas de importancia economica. Master Thesis. Universidad Nacional de Colombia, Medellin, 88 pp.
7. <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>.
8. <http://www.fruitnews.ru/homepage/analitic/38138-import-fructov-i-ovoshchej-v-ross>.
9. <http://idtools.org/id/leps/lepintercept/elegantalis.html>.
10. <http://www.scoop.it/t/pest-alerts/p/1586734396/2012/04/12/eppo-alert-list-addition-of...>
11. <http://www.foodmarket.spb.ru/current.ph>.
12. <http://sad6sotok.ru>.

щей площади томатов 760 га, урожайности 20 кг/м² и стоимости плодов 40 руб./кг при 25% потери урожая ущерб, причиненный томатной молью в закрытом грунте, может превысить 1,5 млрд рублей в год.

Если не учитывать защитные мероприятия по томатной моли, то потенциальные потери от томатной огневки, исчисляемые несколькими миллиардами рублей, представляют фитосанитарную опасность для территории Российской Федерации и свидетельствует о необходимости проведения анализа фитосанитарного риска *N. elegantalis* для территории Российской Федерации.

В настоящее время томатная огневка входит в Перечень карантин-

PROBABILITY OF THE TOMATO FRUIT BORER *Neoleucinodes elegantalis* Guenee (Lepidoptera: Pyraloidea) Invading Solanaceous Crops in Russia

Vladimir N. Zhimerikin, FGBU VNIKR's Leading Researcher

Yury V. Smirnov, Deputy Head of FGBU VNIKR's Entomological Research and Methodology Department

Originating from South America, tomatoes have widely spread throughout the world. At present, it is the most popular crop cultivated in every country. Tomatoes surpass bananas in popularity, notwithstanding the fact that the latter are the most important and a chief export crop. Banana production is nearing 100 million tons while that of tomatoes is almost 150 million tons (<http://www.foodmarket...>). Tomatoes have good food, flavoring and medicinal properties. Particularly attractive are tomatoes grown by specialists (plant selection breeders) as their production is not dominated merely by commercial requirements of simultaneous ripening and disease resistance, as well as modern trade requirements of polish and transportability (<https://sad6sotok.ru>).

Knowing no pesticide pressure, tomatoes grown naturally from certified seeds somewhere in a remote region are a rarity. Very few people are aware of their true and yet-to-be-learned value. Only intuitive urge to have them on the table brings forth demand and gives impetus to increase their production.

Major tomato producers include China (50 million tons), India (17.5 million tons), US (13.2 million tons), Turkey (11.3 million tons), and Egypt (8.6 million tons). Russia produces 2.4 million tons of tomatoes. In Europe, major tomato producers are concentrated in the Mediterranean region. Tomatoes are imported by many coun-

tries including tomato producing ones. In 2011, the US imported 1.49 million tons, Russia — 0.73, Germany — 0.70, France — 0.52, the UK — 0.41, and the Netherlands — 0.21 (<http://faostat...>).

A considerable part of imported tomatoes originates from South American countries. The tomato fruit borer *Neoleucinodes elegantalis* is indigenous to many of these countries including Argentina, Brazil, Venezuela, Colombia, Paraguay, Peru, and Ecuador. This pest is absent from the EPPO region including Russia.

Neoleucinodes elegantalis feeds on fruit of solanaceous crops including such hosts of economic importance as tomato *Solanum lycopersicum*, aubergine *S. melongena*, pepper *Capsicum annuum* and other tropical species of this family: *S. aethiopicum* (gilo), *S. quitoense* (naranjilla), *S. betaceum* (tree tomato), *S. sessiliflorum* (cocoona). The pest also feeds on weeds and wild *Solanum* species: *S. acerifolium*, *S. atropurpureum*, *S. crinitum*, *S. torvum*, *S. hirtum*, *S. lycocarpum*, *S. viarum*, *S. sisymbriifolium*. Totally, *N. elegantalis* is found on over 30 plants belonging predominantly to the family Solanaceae (<http://idtools.org/...>).

Wings of the tomato fruit borer moth have the span of 15–33 mm; females are larger than males (Obando Melo V.P., 2011) (Fig. 1). Wings are white, slightly transparent. There are three irregular brown blotches on anterior wings and scattered black dots on posterior wings.



Рис. 2. Плод томата, поврежденный томатной огневкой (фото А.Е. Дياز)

Fig. 2. Damage to tomato caused by *N. elegantalis* (photo by A.E. Diaz)

Major tomato producers include China (50 million tons), India (17.5 million tons), US (13.2 million tons), Turkey (11.3 million tons), and Egypt (8.6 million tons).

Imagoes are active at night. In the daytime, they hide. The imago stage lasts about 6 days.

The pest produces several generations a year. At 27 °C, the pest completes its life cycle in 34 days; and at 20 °C, the life cycle is 51 days. Development discontinues below 14.7 °C and above 34.5 °C.

Eggs (white, oval, 0.5 × 0.3 mm) are laid singly or in small masses on petioles

and calyxes or in the middle of small fruit 12–20 mm in diameter. If the pest population abounds, eggs may be laid on leaves. Every female can lay about 160 eggs.

After emergence, larvae enter green fruit making small, nearly visible holes and feeding on seeds and pulp. A mature larva is 12–15 mm long.

One larva in a fruit is enough for tomatoes to lose their commercial quality. In cases of heavy infestation, up to 18 larvae of the pest are found in a fruit.

Before pupation, larvae leave the fruit making a large exit hole in it. This hole can serve as a gate for fungal and bacterial infections. Pupation can occur in a folded leaf on the plant, in soil and plant debris.

Fruit infestation leads to their premature fall. The most severe damage is observed prior to harvesting. Damaged fruit may have the number of seeds reduced by 30–100% as compared with the undamaged ones.

N. elegantalis is considered an important pest of solanaceous crops in Brazil, Columbia, and Venezuela. Yields drop by 50–90% in these countries (EPPO Reporting Service 2012/052).

It can be assumed that *N. elegantalis* will be able to successfully develop in Mediterranean countries and in areas of Russia with subtropical and moderate climates when the temperature of the coldest month is above zero or remains positive in soil or plant debris where the pest overwinters. The tomato fruit borer will cause damage in protected agriculture.

This species can spread naturally through its own flight, with air flows or can be transported over long distances with infested fruit or soil. It can also move with plants for planting, particularly with ornamentals, although many EPPO countries prohibit import of plants for planting from third countries.

Nevertheless, the risk of the pest introduction into European countries remains high as the pest can be found inside tomato, aubergine and pepper fruit. The initial stage of infestation doesn't allow detecting damaged fruit as an entrance hole in a damaged fruit doesn't exceed 0.5 mm.

According to AQAS (April, 2012), the pest was found in US air and sea ports over 1,500 times, with the majority of interceptions (1,082 cases) occurring on extensively imported tomatoes and peppers from the countries with

the wide distribution of the pest – Brazil, Venezuela, Ecuador, and Peru. Approximately 60% of all interceptions are reported on imports from Brazil (Molet, 2012).

According to FAVIR (2012), the US imports tomato, aubergine and pepper from over 10 countries of Central and South America where the pest is known to be present. Recently, the US has imposed restrictions for each of these plant species, i.e. imports are allowed from countries where the minimal damage of fruit is observed. For instance, import of pepper *Capsicum* spp. is permitted from countries where *N. elegantalis* causes minimum damage: Grenade, Guiana, Jamaica, and Trinidad and Tobago. At present, tomato, aubergine and pepper are not imported from Brazil, Venezuela, Ecuador, and Peru (FAVIR, 2012).

In Europe, in 2012 there were three cases of *N. elegantalis* detection in aubergines imported to the Netherlands

One larva in a fruit is enough for tomatoes to lose their commercial quality.

from Suriname and during the inspection of passengers' luggage at the Schiphol airport (<http://www.scoop...>).

At present, Russia imports about 1 million tons of fruit potentially affected by the tomato fruit borer, specifically, 829 thousand tons of tomatoes and 161 thousand tons of peppers (<http://www.fruitnews...>). The Consulting Company "Tekhnologii Rosta (Growth Technolo-

gy)" estimates that for many years Turkey has been the ultimate leader among the exporters of fresh tomatoes to Russia, its share being between 45 and 50%. The second largest tomato exporter to Russia is China (9%). Year after year, the third position in this rating belongs to different countries, most often to Ukraine, the Netherlands, Azerbaijan, and Morocco. In winter and spring, imported goods occupy almost 95% of the Russian market.

Tomatoes are mainly imported from countries where the tomato fruit borer is absent. Imports of other agricultural products from countries where the pest causes damage don't present any threat. For instance, a large amount of fruits (over 0.6 million tons) is imported from Ecuador where the tomato fruit borer is well known to cause damage, however, no cases of the pest introduction with undamaged plant products have been reported. For this reason, the entry of the tomato fruit borer into Russia is of low probability.

At the same time the phase-out of imports presupposes the increase of areas under tomato cultivation in the Russian Federation. According to the Consulting Company "Tekhnologii Rosta", the cultivation area under this crop shall increase by 20%. Russia's embargo on imports of plant products gives rise to slew of proposals including tomato imports from countries where the tomato fruit borer is present. Mexico can be taken as an example. The country is eager to

export inter alia tomatoes to Russia, simultaneously exporting them to the US and Canada. Brazil, Columbia, and Ecuador are eager to expand the range and volume of plant exports to Russia including exports of tomatoes.

However, the risk of *N. elegantalis* introduction into Russia still remains unlikely as tomatoes are mainly imported from Mediterranean countries or they are imported in winter.

The scenario of the pest introduction can be similar to that of *Tuta absoluta*, i.e. it will first invade Mediterranean countries and then countries with moderate climate, as well as greenhouses. Greenhouses can serve as the source of infestation favoring the occurrence of temporary (transient) outbreaks in climates where *N. elegantalis* will not be able to overwinter.

In Russia, the species will cause damage along the coasts of the Black and Caspian seas and in moderate climates

Russia's embargo on imports of plant products gives rise to slew of proposals including tomato imports from countries where the tomato fruit borer is present.

with positive winter temperatures. It can frequently cause damage in Krasnodar, Stavropol krais and in the south of Rostov region where the mean temperature of the coldest month varies between +1

and –2.8 °C. Approximately 45–50% of Russian tomato production is located in this area.

If causing damage frequently, the pest is likely to affect the area of 10 thousand hectares. With the harvest being 16 tons per hectare and the cost – 40 thousand rubles per ton, the loss will amount to 6.4 billion rubles.

In protected cultivation, if the total crop area is 760 ha, the crop yield is 20 kilograms per square meter and the cost of tomatoes is 40 rubles per kilo, 25% of harvested fruit damaged by the tomato fruit borer may result in the loss of over 1.5 billion rubles a year.

Taking no account of protective measures against the tomato leaf miner, the potential damage caused by the tomato fruit borer and amounting to several billion rubles poses a phytosanitary threat to the territory of the Russian Federation, thus indicating the need to conduct a PRA for *N. elegantalis* for Russia.

At present, the tomato fruit borer is on the EPPO A1 List (2014-09) of pests absent from the EPPO region and recommended for regulation as quarantine pests.

References

1. AQAS (2012) All *Neoleucinodes elegantalis* interceptions. Accessed on April 11, 2012 at: <https://mokcs14.aphis.usda.gov/aqas/HomePagelnit.do>.
2. Diaz A.E., Solis A., Brochero H.L. (2011) Distribucion geografica de *Ne-*

oleucinodes elegantalis (Lepidoptera: Crambidae) en Colombia. Rev. Colomb., v. 37, n. 1.

3. EPPO Reporting service 2012/052 *Neoleucinodes elegantalis*, a borer of solanaceous fruit: addition to the EPPO Alert List. Pp. 5-7.

4. FAVIR (2012) Fruits and vegetables import requirements (FAVIR). United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS). Accessed on April 10 and 11, 2012 at: <https://eppermits.aphis.usda.gov/manual/index.cfm?action=pubHome>.

5. Molet T. (2012) CPHST Pest data-sheet for *Neoleucinodes elegantalis*. USDA-APHIS-PRQ-CPHST.

6. Obando Melo V.P. (2011) Variabilidad morfométrica de *Neoleucinodes elegantalis* (Guenee): perforador de fruto de solanaceas de importancia económica. Master Thesis. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, 88 pp.

7. <http://faostat.fao.org/site/342/default.aspx>.

8. <http://www.fruitnews.ru/homepage/analitic/38138-import-fructov-i-ovoshchej-v-ross>.

9. <http://idtools.org/id/leps/lepintercept/elegantalis.html>.

10. <http://www.scoop.it/t/pest-alerts/p/1586734396/2012/04/12/epo-alert-list-addition-of>.

11. <http://www.foodmarket.spb.ru/current.ph>.

12. <https://sad6sotok.ru>.



Fig. 3. A tomato fruit borer larva

Рис. 3. Гусеница томатной огневки



КОЛЬЧАТЫЕ КОКОНОПРЯДЫ РОДА *MALACOSOMA* — новые объекты карантинного перечня РФ

М.М. Абасов, заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР»

А.Э. Нестеренкова, младший научный сотрудник ФГБУ «ВНИИКР»

Во исполнение Федерального закона от 21.01.2014 г. № 206-ФЗ «О карантине растений», который вступил в силу с 1 января 2015 года, а также в связи со вступлением в состав Российской Федерации Республики Крым и образованием в составе РФ новых субъектов, в соответствии с приложением к Приказу МСХ № 501 от 15 декабря 2014 года был утвержден новый перечень карантинных объектов РФ, который включает в себя 175 вредных организмов. В их число входят кольчатые коконопряды рода *Malacosoma*.

Коконопряды — крупные или средней величины бабочки, с плотным телом, толстым брюшком, покрытым густыми длинными волосками. Хоботок короткий или совсем отсутствует, взрослые бабочки не питаются, но их гусеницы весьма прожорливы — многие виды коконопрядов в период вспышек массового размножения вредят сельскому и лесному хозяйству. В качестве классического примера можно привести сибирского коконопряда (*Dendrolimus sibiricus*), гусеницы которого способны оголять таежные хвойные леса на площади в миллионы гектаров. В мировой фауне известно около 1 200 видов коконопрядов.

Одной из наиболее характерных особенностей коконопрядов рода *Malacosoma*, или кольчатых коконопрядов, является кладка яиц, имеющая вид кольца, плотно охватывающего тонкие веточки кормовых

В новый Перечень карантинных объектов РФ включены три вида кольчатых коконопрядов: горный кольчатый коконопряд *Malacosoma parallela* Stgr., американский кольчатый коконопряд *Malacosoma americanum* Fabr. и лесной кольчатый коконопряд *Malacosoma disstria* Hb.

растений (рис. 1б, 2б). Зимуют диapaузирующие яйца. Ранней весной, к моменту распускания почек, из яиц выходят молодые гусеницы (рис. 3б). Сразу после выхода из яиц гусеницы в развилке около кладки сооружают общее гнездо, сплетая его из шелковины, в котором они прячутся в жару и непогоду, а также линяют (рис. 2в). Обедая листья вокруг убежища, они интенсивно питаются по утрам до полудня и вечером. Колония гусениц, происходящих из одной кладки, со временем иногда разделяется, но чаще сооружается новое, более обширное гнездо, а если обьеден весь куст или дерево, то сообщество мигрирует на соседние растения. Гусеницы старших возрастов покидают шелковинные убежища и живут одиночно, линяя за пределами гнезд, которые при недостатке корма пустеют раньше. К этому времени длина взрослой гусеницы может достигать 55 мм, а ветви сильно пораженного дерева иногда бывают почти сплошь покрыты паутиной. Гусеница голубовато-серая, с яркой белой продольной полосой (цельной или посегментно рассеченной) на

спинной части и парными чередующимися оранжево-коричневыми, черными и голубоватыми полосами по бокам (рис. 1в, 2г, 3в). В зависимости от погодных условий стадия гусеницы может длиться до полутора-двух месяцев. Окукливается гусеница в плотном светлом (белом или желтоватом) коконе (рис. 1г), расположенном в развилках ветвей, в трещинах коры или среди опутанных паутиной листьев. Через две — три недели из куколок вылетают бабочки. Спаривание происходит, как правило, через несколько часов после выхода из куколки. Самцы погибают почти сразу после спаривания, самки живут в течение нескольких дней до окончания яйцекладки. Цикл развития у кольчатых коконопрядов одногодичный (за год развивается одно поколение).

На территории России наиболее широко распространен обыкновенный кольчатый коконопряд *Malacosoma neustria* L. (рис. 1а), известный вредитель плодовых садов (в основном яблони) и, реже, других лиственных деревьев (Плавильщиков, 1994). Встречается почти

В мировой фауне известно около 1 200 видов коконопрядов.

повсеместно в Европе, на Кавказе, в Сибири и на Дальнем Востоке. Бабочка желтовато-коричневая, на переднем крыле с темно-коричневой поперечной полосой неправильной формы, расширяющейся к передней части крыла. Размах крыльев бабочки 28–42 мм. Самки обычно крупнее и темнее самцов. Длина взрослой гусеницы 50–55 мм.

В новый Перечень карантинных объектов РФ включены три вида кольчатых коконопрядов: горный кольчатый коконопряд *Malacosoma parallela* Stgr., американский кольчатый коконопряд *Malacosoma americanum* Fabr. и лесной кольчатый коконопряд *Malacosoma disstria* Hb.

Горный кольчатый коконопряд обитает в Восточном Казахстане, Средней Азии и Закавказье, а также в Турции, Сирии, Иране, Афганистане и Китае; на территории России отмечен для Республики Дагестан и Чеченской Республики (Dubatolov,

Zolotuhin, 1992; *Malacosoma parallela*, 2005). Предпочитает высоты от 1000 до 1 800 м над уровнем моря, но может встречаться на высоте до 2 400 м. Ранее горный кольчатый коконопряд рассматривался учеными как подвид обыкновенного кольчатого шелкопряда, морфологически и биологически эти виды очень сходны. Отличается горный кольчатый коконопряд тем, что поперечная перевязь на переднем крыле бабочки имеет неправильную форму, а остается параллельносторонней на всем своем протяжении. Размах крыльев бабочки 30–45 мм. Плодовитость самки — от 100 до 400 яиц. Кладку яиц самка горного коконопряда прикрывает секретом придаточных желез. Застывшая, серебристо-серый секрет предохраняет яйца от высыхания и иных неблагоприятных воздействий окружающей среды (Ашимов, 2010). В садах горный кольчатый коконопряд повреждает розоцветные (Rosaceae), а в предгорных и горных лесах сильно вредит дубам (*Quercus* sp.) и кленам (*Acer* sp.). Вспышки массового размножения вредителя развиваются в течение семи лет.

Американский кольчатый коконопряд встречается повсеместно на востоке США, а также на юге Канады. Бабочки красновато- или желтовато-коричневые с двумя поперечными кремовыми полосами на каждом переднем крыле (рис. 2а). Заднее крыло однотонное. Размах крыльев бабочки 37–50 мм. Средняя плодовитость самки — от 200 до 300 яиц (рис. 2б). Длина взрослой гусеницы может достигать 50 мм (рис. 2г). Гусеницы чаще всего повреждают яблони (*Malus* sp.) и сливы (*Prunus* sp.), реже другие розоцветные (Rosaceae), однако полный список повреждаемых растений включает множество других лиственных пород: клен (*Acer*

Рис. 1. Обыкновенный кольчатый коконопряд *Malacosoma neustria* L.: а — бабочка; б — кладки яиц; в — гусеница; г — кокон (фото: В.Л. Пономарев; интернет-сайты animalkingdom.ru, insectamo.ru)

Fig. 1. The lackey moth *Malacosoma neustria* L.: а — moth; б — egg masses; в — caterpillar; г — cocoon (photo by V.L. Ponomarev; web-sites: animalkingdom.ru, insectamo.ru)

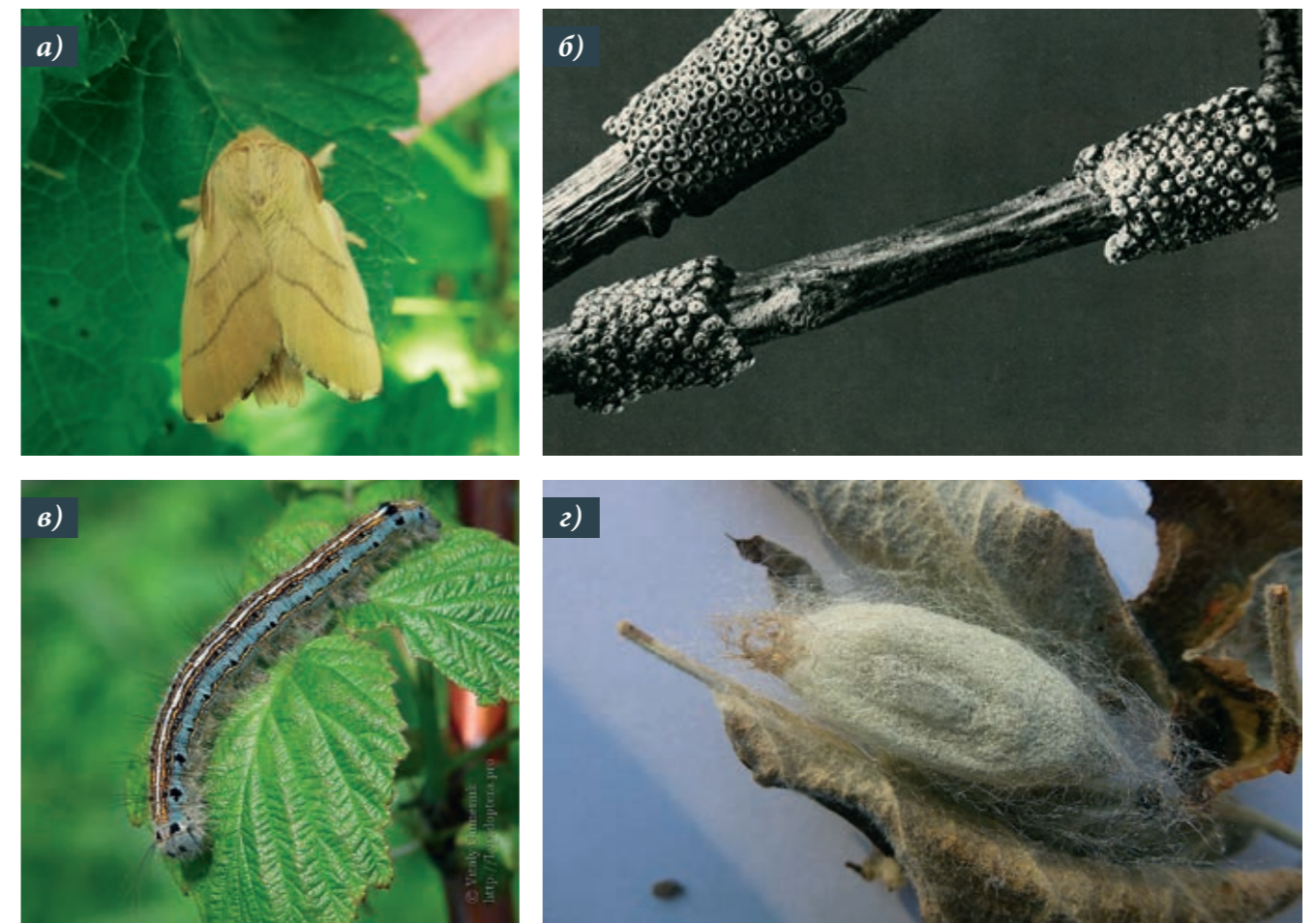




Рис. 2. Американский кольчатый коконопряд *Malacosoma americanum* Fabr.: а — бабочка; б — самка возле свежей кладки; в — гнездо с гусеницами; г — гусеница (privet.ru, forum.upscavenger.com, www.invasive.org, www.dknature.com)

Fig. 2. The eastern tent caterpillar *Malacosoma americanum* Fabr.: а — moth; б — female near freshly laid eggs; в — tent with caterpillars; г — caterpillar (privet.ru, forum.upscavenger.com, www.invasive.org, www.dknature.com)

сп.), ольху (*Alnus* sp.), *Amelanchier* sp., барбарис (*Berberis* sp.), березу (*Betula* sp.), *Carya* sp., орешник (*Corylus* sp.), боярышник (*Crataegus* sp.), бук (*Fagus* sp.), ясень (*Fraxinus* sp.), *Liquidambar* sp., *Nyssa* sp., тополь (*Populus* sp.), дуб (*Quercus* sp.), иву (*Salix* sp.), рябину (*Sorbus* sp.), липу (*Tilia* sp.), вяз (*Ulmus* sp.).

Лесной кольчатый коконопряд широко распространен на территории США и на юге Канады. Бабочки светло-коричневые, с двумя четкими поперечными темно-коричне-

выми полосами на каждом переднем крыле (рис. 3а). Размах крыльев 25–37 мм. Плодовитость самки — до 350 яиц. Длина взрослой гусеницы около 40 мм (рис. 3в). К числу основных особенностей лесного кольчатого коконопряда относится способность самок располагать кладку яиц не только в виде обычного для представителей данного рода кольца, опоясывающего веточку дерева, но и в виде продольной массы на ветвях и других частях растения. Яйца защищены черно-коричневым блестящим секретом. На юге Канады и на севере США лесной кольчатый коконопряд предпочитает клен (*Acer saccharum*), березу (*Betula papyrifera*) и тополь (*Populus tremuloides*), на юге США основными кормовыми растениями являются различные виды дуба (*Quercus macrocarpa*, *Q. nigra*, *Q. phellos*), а также *Nyssa aquatica*, *Nyssa sylvatica*, *Liquidambar styraciflua*. Список растений, которые могут подвергаться дефолиации под воздействием лесного кольчатого коконопряда, включает также ольху (*Alnus* sp.), *Amelanchier* sp., дерен (*Cornus* sp.), орешник (*Corylus* sp.), боярышник

(*Crataegus* sp.), *Cydonia* sp., ясень (*Fraxinus* sp.), яблоню (*Malus* sp.), *Ostrya* sp., сливу (*Prunus* sp.), грушу (*Pyrus* sp.), розу (*Rosa* sp.), иву (*Salix* sp.), рябину (*Sorbus* sp.), липу (*Tilia* sp.), вяз (*Ulmus* sp.). Кроме того, важным фактором, существенно повышающим вредоносность, является способность гусениц лесного кольчатого коконопряда развиваться на многих хвойных растениях (рис. 4г) — пихте (*Abies* sp.), лиственнице (*Larix* sp.), ели (*Picea* sp.), псевдотсуге (*Pseudotsuga* sp.). Вспышки массового размножения лесного кольчатого коконопряда могут продолжаться три-четыре года (рис. 3г).

Экономический ущерб от деятельности кольчатых коконопрядов рода *Malacosoma* в зоне их естественного обитания очень велик. В период вспышек массового размножения дефолиации могут подвергаться территории в тысячи квадратных километров. В случае однократной (кратковременной) дефолиации растения, как правило, способны восстановить свои функции, но при этом потери годового прироста древесины могут составлять до 58%, потери урожая

плодовых также неминуемы (Анон., 1985; Gross, 1991). В случае многолетних вспышек массового размножения возможно полное усыхание поврежденных лесных массивов, особенно чувствительны в этой ситуации деревья хвойных пород. Большой экологический и социальный ущерб приносит повреждение и дефолиация лесодекоративных насаждений и различных рекреационных территорий (рис. 4).

Естественное распространение кольчатых коконопрядов рода *Malacosoma* обеспечивается за счет разлета бабочек в поисках мест для яйцекладки и расплозания гусениц старших возрастов в поисках питания. Однако наиболее важное значение, как и для подавляющего большинства лесных карантинных

Для контроля численности кольчатых коконопрядов рода *Malacosoma* могут быть весьма успешно использованы методы интегрированной защиты растений.

организмов, имеет распространение в процессе международной торговли: кладки яиц, гусеницы всех возрастов, а также коконы с куколками могут быть легко занесены в новые регионы и даже на новые континенты вместе с саженцами, неокоренной древесиной, корой и другими необработанными лесоматериалами.

Для контроля численности кольчатых коконопрядов рода *Malacosoma* могут быть весьма успешно использованы методы интегрированной защиты растений. В частности, яйца, гусеницы и куколки эффективно уничтожаются паразитоидами из числа двукрылых (Diptera) и перепончатокрылых (Hymenoptera) (Knight et al., 1991). Заметно снижают численность вредителя хищники. Хорошие результаты дают обработки поврежденных деревьев препаратами на основе *Bacillus thuringiensis* (Bernier, 1990) и вируса ядерного полиэдроза (Keddie, Erlandson, 1995). Проводятся работы по получению сортов растений, устойчивых к поражению коконопрядами: например, методами генной инженерии с применением эндотоксина *Bacillus*

thuringiensis получены сорта *Populus*, устойчивые к *Malacosoma disstria* (Robison, Raffa, 1994).

По своим климатическим и экологическим требованиям горный кольчатый коконопряд, американский кольчатый коконопряд и лесной кольчатый коконопряд способны успешно акклиматизироваться на большей части Европы, в том числе — и на территории России, где произрастает достаточное количество пригодных для вредителей кормовых растений. В связи с этим все три вида входят в карантинный перечень ЕОКЗР: американский кольчатый коконопряд *Malacosoma americanum* Fabr. и лесной кольчатый коконопряд *Malacosoma disstria* Hb. — в список А1, а горный кольчатый коконопряд *Malacosoma parallela* Stgr. — в список А2 (*Malacosoma parallela*, 2005; *Malacosoma americanum*, 1997; *Malacosoma disstria*, 1997). В целях обеспечения фитосанитарной безопасности согласно рекомендациям ЕОКЗР все грузы лесоматериалов, поступающие из регионов распространения кольчатых коконопрядов *Malacosoma parallela* Stgr., *Malacosoma americanum* Fabr. и *Malacosoma disstria* Hb., должны тщательно досматриваться и, в случае выявления вредителей, подвергаться соответствующей обработке. Посадочный материал повреждаемых кольчатыми коконопрядами пород должен производиться только в питомниках, для которых подтверждено отсутствие вредителей в течение последнего вегетационного сезона (ОЕПП/ЕРРО Specific quarantine requirements, 1990). Эти же требования распространяются и на места отгрузки («свободное место производства»).

С целью научно-методического обеспечения Перечня карантинных объектов РФ в настоящее время отделом лесного карантина ФГБУ «ВНИИИКР» в соответствии с планом проводятся работы по анализу фитосанитарного риска американского кольчатого коконопряда *Malacosoma americanum* Fabr., лесного кольчатого коконопряда *Malacosoma disstria* Hb. и горного кольчатого коконопряда *Malacosoma parallela* Stgr.

Литература

1. Ашимов К.С. Факторы снижения экологической устойчивости

орехово-плодовых лесов. Бишкек, 2010. С. 21–23.

2. Плавильщиков Н.Н. Определитель насекомых. Москва, Изд. «Топпикал», 1994. С. 487–488.

3. Anon. (1985) Insects of eastern forests. Miscellaneous Publication No. 1426. USDA Forest Service, Washington, USA.

4. Bernier R.L., Jr., Gannon D.J., Mose G.P., Mazzarello M., Griffiths M.M., Guest P.J. (1990) Development of a novel Bt strain for the control of forestry pests. In: Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases. 1990, P. 245–251. British Crop Protection Council, Thornton Heath, UK.

5. Dubatolov V.V., Zolotuhin V.V. (1992) A list of the Lasiocampidae from the territory of the former USSR (Insecta, Lepidoptera). Atalanta, Wurzburg, P. 531–548.

6. Gross H.L. (1991) Dieback and growth loss of sugar maple associated with defoliation by the forest tent caterpillar. Forestry Chronicle, 67, P. 33–42.

7. Keddie A., Erlandson M. (1995) Characterization of a nuclear polyhedrosis virus from the forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria*. Journal of Invertebrate Pathology, 65, P. 43–47.

8. Knight G.A., Lavigne R.J., Pogue M.G. (1991) The parasitoid complex of forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria* in eastern Wyoming shelterbelts. Great Lakes Entomologist, 24, P. 255–261.

9. *Malacosoma parallela*. Data sheets on quarantine pests. Bulletin OEPP/EPPO. 2005. Bulletin 35, P. 431–433.

10. *Malacosoma americanum*. EPPO/CABI (1997) In Quarantine pests for Europe (eds. Smith I.M., McNamara D.G., Scott P.R., Holderness M.). pp. 388–391. CAB International, Wallingford.

11. *Malacosoma disstria*. EPPO/CABI (1997) Quarantine Pests for Europe 2nd Edition (eds. Smith I.M., McNamara D.G., Scott P.R. & Holderness M.) CAB International, Wallingford (GB).

12. OEPP/EPPO Specific quarantine requirements. EPPO Technical Documents No. 1008. 1990.

13. Robison D.J., Raffa K.F. (1994) Characterization of hybrid poplar clones for resistance to the forest tent caterpillar. Forest Science, 40, P. 686–714.

TENT CATERPILLARS OF THE GENUS *MALACOSOMA* — New Pests on the Russian Quarantine List

Muzafar M. Abasov, FGBU VNIKR's Deputy Director

Anastasia E. Nesterenkova, FGBU VNIKR's Junior Researcher

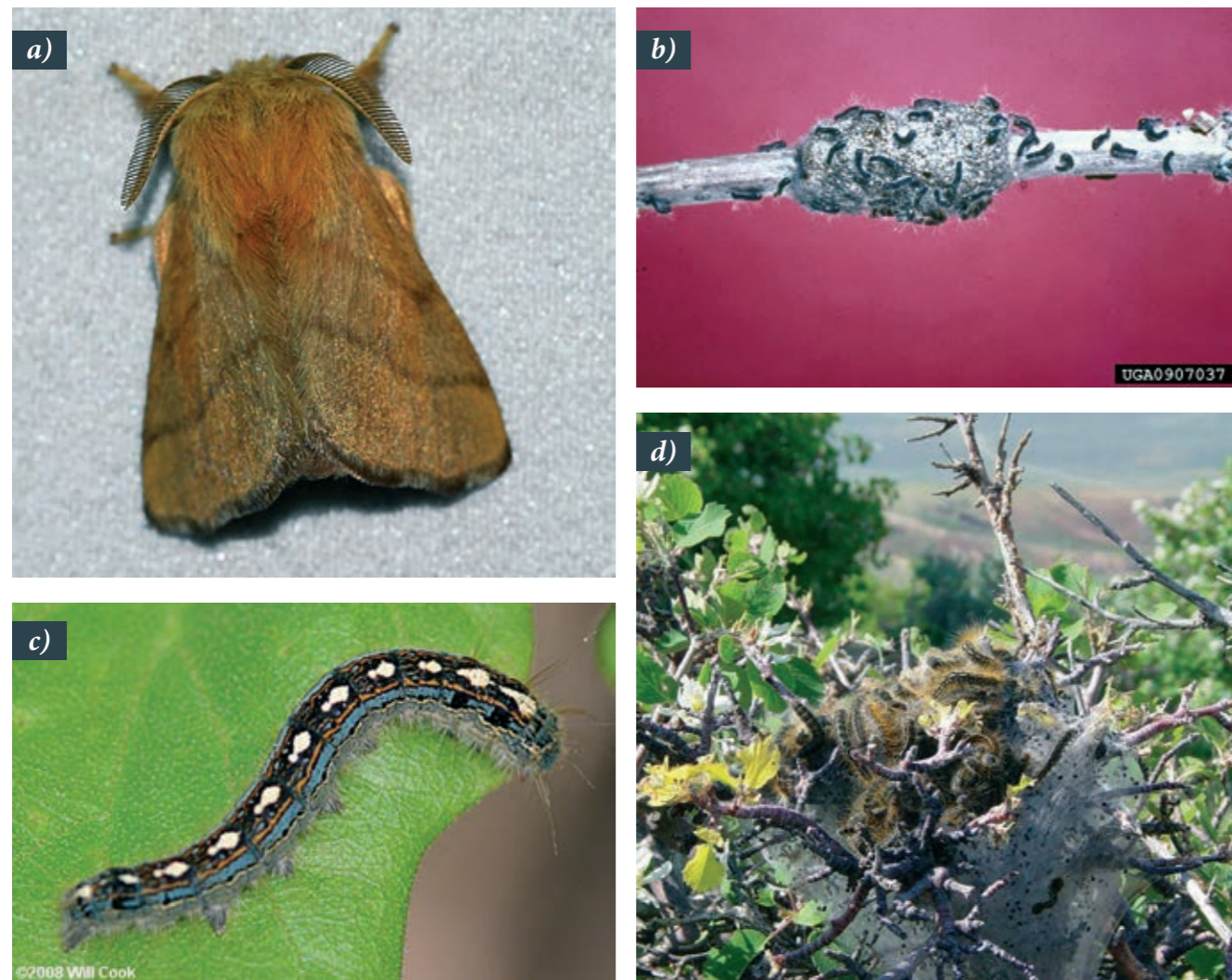


Fig. 3. The forest tent caterpillar *Malacosoma disstria* Hb.: a — moth; b — young caterpillars; c — adult caterpillars; d — tent in a tree crown (bugguide.net, wiki.bugwood.org, www.carolinanature.com, www.free-photos.biz)

Рис. 3. Лесной кольчатый коконопряд *Malacosoma disstria* Hb.: а — бабочка; б — молодые гусеницы; в — взрослая гусеница; г — гнездо в кроне (bugguide.net, wiki.bugwood.org, www.carolinanature.com, www.free-photos.biz)

In compliance with the Federal Law on Plant Quarantine 206-FZ of 21 January 2014 effective from 1 January 2015, in view of the accession of the Republic of Crimea to the Russian Federation and taking into account the new constituent entities of the Russian Federation, the updated List of pests quarantine for the Russian Federation was approved in accordance with Order 501 of the

Ministry of Agriculture of 15 December 2014. The List now comprises 175 pests including caterpillars of the genus *Malacosoma*.

A tent caterpillar is a large or medium sized moth. The body is stout and thickly covered with setae; abdomen is fleshy. Proboscis is short or absent. Adult moths do not feed, but caterpillars are voracious eaters, i.e. many

Malacosoma species cause significant damage to agriculture and forestry during massive outbreaks. This is patently exemplified by Siberian caterpillar, *Dendrolimus sibiricus*, caterpillars of which are capable of stripping off millions of hectares of coniferous forests in the taiga. There are about 1,200 tent caterpillar species known worldwide.

Deposition of ring-like egg masses tightly encircling the host plant twigs is one of the most characteristic features of the *Malacosoma* species (Fig. 1b, 2b). The pests overwinter as diapausing eggs. Young caterpillars emerge by the time of bud break in early spring (Fig. 3 b). Im-

There are about 1,200 tent caterpillar species known worldwide.

mediately after emergence, caterpillars form a communal tent of silk threads between the twigs. The tent serves as a shelter from heat and poor weather conditions as well as for molting (Fig. 2c). Caterpillars actively feed on leaves around the shelter from early morning till noon and in the evening. Sometimes, a caterpillar colony originating from the same egg mass may eventually divide, but more often it builds a bigger tent; having completely consumed a bush or a tree, the colony will migrate onto adjacent plants. Final instars molt outside the tents. They abandon the silky tents and live singly. The tents may sometimes empty out earlier due to lack of food. By the final stage of development, the caterpillar may grow up to 55 mm, and twigs of the colonized tree may be almost entirely covered in web. The final instar is bluish-gray with a bright

The new List of pests quarantine for the Russian Federation now includes three *Malacosoma* species: the mountain ring silk moth *Malacosoma parallela* Stgr., the eastern tent caterpillar *Malacosoma americanum* Fabr., and the forest tent caterpillar *Malacosoma disstria* Hb.

white dorsal longitudinal stripe (whole or segmented) and double alternating orange-brown, black and bluish lateral stripes (Fig. 1c, 2d, 3c). Depending on weather conditions, the caterpillar stage may last up to one and a half or two months. Caterpillars pupate in a thick light (white or yellow) cocoon (Fig. 1d) found between the twigs, bark crevices or among webbed leaves. In two to three

weeks, moths emerge from the pupae. Mating occurs usually within a few hours after leaving the pupa. Males die shortly after mating; females live for a few days until the end of egg laying. The development cycle in the *Malacosoma* species takes a year to complete (i.e. one generation develops per year).

In Russia, the lackey moth *Malacosoma neustria* (Fig. 1a) is most widespread. It is well known as a pest of orchards, mainly apple and more rarely other deciduous trees (Plavilshchikov, 1994). The pest occurs almost throughout Europe, in the Caucasus, Siberia and the Far East. A moth is yellowish-brown with an irregular horizontal stripe on the forewing which extends to the front of the wing. The wingspan of the moth is 28–42 mm. Females are usually larger and darker than males. The length of an adult caterpillar is 50–55 mm.

The new List of pests quarantine for the Russian Federation now includes three *Malacosoma* species: the mountain ring silk moth *Malacosoma parallela* Stgr., the eastern tent caterpillar *Malacosoma americanum* Fabr., and the forest tent caterpillar *Malacosoma disstria* Hb.

The mountain ring silk moth occurs in Eastern Kazakhstan, Central Asia and the Caucasus, as well as in Turkey, Syria, Iran, Afghanistan, and China. In Russia, it was reported from the Republic of Dagestan and the Chechen Republic (Dubatolov, Zolotuhin, 1992; *Malacosoma parallela*, 2005). This species prefers altitudes between 1,000 and 1,800 meters above sea level but may occur at the altitude of up to 2,400 m.

Earlier, scientists considered the mountain ring silk moth as a subspecies of the lackey moth: these species

drying and other adverse environmental effects (Ashimov, 2010). In orchards, the pest damages plants of the family Rosaceae; and in montane and submontane forests, it causes serious damage to oak (*Quercus* sp.) and maple (*Acer* sp.). The outbreaks of the pest mass reproduction last seven years.

The eastern tent caterpillar occurs throughout the eastern United States, as well as southern Canada. Moths are reddish or yellowish-brown with two transverse cream colored stripes on each forewing (Fig. 2a). The hindwing is single-colored. The wingspan of the moth is 37–50 mm. On average, a female lays 200 to 300 eggs (Fig. 2b). The length of an adult caterpillar can reach up to 50 mm (Fig. 2d). Caterpillars often damage apple (*Malus* sp.) and plum (*Prunus* sp.) and more rarely other Rosaceae plants, but the comprehensive list of damaged plants includes many other hardwoods: maple (*Acer* sp.), alder (*Alnus* sp.), *Amelanchier* sp., barberry (*Berberis* sp.), birch (*Betula* sp.), *Carya* sp., hazel (*Corylus* sp.), hawthorn (*Crataegus* sp.), beech (*Fagus* sp.), ash (*Fraxinus* sp.), *Liquidambar* sp., *Nyssa* sp., poplar (*Populus* sp.), oak (*Quercus* sp.), willow (*Salix* sp.), mountain ash (*Sorbus* sp.), linden (*Tilia* sp.), elm (*Ulmus* sp.).

The forest tent caterpillar is widely distributed in the USA and southern Canada. Moths are light-brown with two dark-brown transversal strips on each forewing (Fig. 3a). The wingspan is 25–37 mm. A female lays up to 350 eggs. An adult caterpillar reaches about 40 mm in length (Fig. 3c). Unlike other representatives of the species of this genus characterized by laying only ring-like egg masses encircling host plant twigs, this species is also capable of laying egg masses along twigs and other plant parts. Eggs are protected by shiny dark-brown secretion. In southern Canada and the northern US, the pest prefers maple (*Acer saccharum*), birch (*Betula papyrifera*) and poplar (*Populus tremuloides*); in the southern US, it mostly feeds on various oak species (*Quercus macrocarpa*, *Q. nigra*, *Q. phellos*), as well as *Nyssa aquatica*, *Nyssa sylvatica*, and *Liquidambar styraciflua*. Alder (*Alnus* sp.), *Amelanchier* sp., dogwood (*Cornus* sp.), hazel (*Corylus* sp.), hawthorn (*Crataegus* sp.), *Cydonia* sp., ash (*Fraxinus* sp.), apple (*Malus* sp.), *Ostrya* sp., plum (*Prunus* sp.), pear (*Pyrus* sp.), rose (*Rosa* sp.), willow (*Salix* sp.), mountain ash (*Sorbus* sp.), linden (*Til-*



Fig. 4. Population explosion of tent caterpillars (USA) (rusmediabank.ru, www.digital-librarian.com, bugguide.net, www.nrcan.gc.ca)

Рис. 4. Вспышка массового размножения кольчатых коконопрядов в США (rusmediabank.ru, www.digital-librarian.com, bugguide.net, www.nrcan.gc.ca)

ia sp.), and elm (*Ulmus* sp.) are among plants that may be defoliated by the forest tent caterpillar. Furthermore, the ability of caterpillars to develop on many coniferous plants (Fig. 4d) — fir (*Abies* sp.), larch (*Larix* sp.), spruce (*Picea* sp.), Douglas-fir (*Pseudotsuga* sp. — significantly increases the damage. Population explosions of the forest tent caterpillar may last three to four years (Fig. 3d).

The *Malacosoma* species cause significant damage to their habitats. During population explosions, areas of thousands of square kilometers may be defoliated. After a single (short-term) defoliation, the plant is usually capable of regaining its functionality, however, annual wood production may decrease by up to 58%; fruit yield losses are inevitable, as well (Anon., 1985; Gross, 1991). Long lasting population explosions may lead to complete dieback of woodlands; coniferous trees are particularly susceptible to damage. The feeding of pests and defoliating of ornamental and recreational plantings lead to immeasurable environmental and social consequences (Fig. 4).

The eastern tent caterpillar occurs throughout the eastern United States, as well as southern Canada.

The forest tent caterpillar is widely distributed in the USA and southern Canada.

The natural spread of the *Malacosoma* species occurs through adult moths flying in search of egg laying sites and adult caterpillars crawling in search of food. However, as with the majority of forest quarantine pests, the spread in the process of international trade is of utmost importance: egg masses, caterpillars of all stages as well as cocoons with pupae may be easily introduced into new areas and even new continents with nursery stock, non-debarked wood, bark and other untreated forest products.

Integrated plant protection measures can be effectively used to control the prevalence of the *Malacosoma* species. For instance, eggs, caterpillars and pupae are controlled using *Diptera* and *Hymenoptera* parasitoids (Knight et al., 1991). Predators significantly reduce the number of the pests. Treatment of damaged trees with products based on *Bacillus thuringiensis* (Bernier, 1990) and nuclear polyhedrosis virus is effective (Keddie, Erlandson, 1995). *Malacosoma* resistant plant cultivars are being bred, for instance, *Populus* cultivars

Integrated plant protection measures can be effectively used to control the prevalence of the *Malacosoma* species.

resistant to *Malacosoma disstria* have been genetically engineered using *Bacillus thuringiensis* endotoxin (Robison, Raffa, 1994).

In terms of environmental and climatic conditions, the mountain ring silk moth, eastern tent caterpillar and forest tent caterpillar are capable of establishing in the major portion of Europe including Russia where their suitable hosts are present in sufficient numbers. Therefore, these species are on the EPPO lists: A1 — *Malacosoma americanum* Fabr. and *Malacosoma disstria* Hb., and A2 — *Malacosoma parallela* Stgr. (*Malacosoma parallela*, 2005; *Malacosoma americanum*, 1997; *Malacosoma disstria*, 1997). To safeguard plant health in accordance with the EPPO recommendations, all consignments coming from the areas where *Malacosoma parallela* Stgr., *Malacosoma amer-*

icanum Fabr., and *Malacosoma disstria* Hb. occur are subject to inspections and, in cases of pest interceptions, appropriate treatments. Plants for planting of host species should only be grown in nurseries found to be free from the pests during the last growth season (OEPP/EPPO Specific quarantine requirements, 1990). These requirements also cover places of dispatch (free places of production).

With a view to provide scientific justification of the current List of pests quarantine for the Russian Federation, FGBU VNIKR's Forest Quarantine Department is now performing pest risk analyses for *Malacosoma americanum* Fabr., *Malacosoma disstria* Hb. and *Malacosoma parallela* Stgr.

References

1. K.C. Ashimov. Factors Decreasing Ecological Stability of Fruit and Nut Orchards. Bishkek. 2010. P. 21–23.
2. N.N. Plavalshikov. Insect Identifier. "Topical" Publishing House. Moscow. 1994. P. 487–488.
3. Anon. (1985) Insects of eastern forests. (1985) Miscellaneous Publication No. 1426. USDA Forest Service, Washington, USA.
4. Bernier R.L., Jr., Gannon D.J., Moser G.P., Mazzarello M., Griffiths M.M., Guest P.J. (1990) Development of a novel Bt strain for the control of forestry pests. In: Brighton Crop Protection Conference, Pests and Diseases — 1990, P. 245–251. British Crop Protection Council, Thornton Heath, UK.
5. Dubatolov V.V., Zolotuhin V.V. (1992) A list of the Lasiocampidae from the territory of the former USSR (Insecta, Lepidoptera). Atalanta, Wurzburg, P. 531–548.
6. Gross H.L. (1991) Dieback and growth loss of sugar maple associated with defoliation by the forest tent caterpillar. *Forestry Chronicle*, 67, P. 33–42.
7. Keddie A., Erlandson M. (1995) Characterization of a nuclear polyhedrosis virus from the forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65, P. 43–47.
8. Knight G.A., Lavigne R.J., Pogue M.G. (1991) The parasitoid complex of forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria* in eastern Wyoming shelterbelts. *Great Lakes Entomologist*, 24, P. 255–261.
9. *Malacosoma parallela*. Data sheets on quarantine pests. Bulletin OEPP/EPPO. 2005. Bulletin 35, P. 431–433.
10. *Malacosoma americanum*. EPPO/CABI (1997) In Quarantine pests for Europe (eds. Smith I.M., McNamara D.G., Scott P.R., Holderness M.). pp. 388–391. CAB International, Wallingford.
11. *Malacosoma disstria*. EPPO/CABI (1997) *Quarantine Pests for Europe* 2nd Edition (eds. Smith I.M., McNamara D.G., Scott P.R. & Holderness M.) CAB International, Wallingford (GB).
12. OEPP/EPPO Specific quarantine requirements. EPPO Technical Documents No. 1008. 1990.
13. Robison D.J., Raffa K.F. (1994) Characterization of hybrid poplar clones for resistance to the forest tent caterpillar. *Forest Science*, 40, P. 686–714.

ОБНАРУЖЕНИЕ ЭНТОМОФАГА ЧЕРВЕЦОВ симферобиуса *Symphorobius* sp. (Neuroptera, Hemerobiidae) на лабораторной культуре виноградного червеца *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera, Pseudococcidae)

О.Г. Волков, начальник научно-методического отдела
энтомологии ФГБУ «ВНИИКР»

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

Л.Г. Чеглик, младший научный сотрудник
научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР»

А.Ф. Гостюк, лаборант
научно-методического отдела энтомологии ФГБУ «ВНИИКР»

В феврале 2015 года на лабораторной культуре виноградного червеца *Planococcus citri*, содержащейся в ФГБУ «ВНИИКР» на ростках картофеля (рис. 1), было обнаружено сетчатокрылое насекомое — энтомофаг симферобиус *Symphorobius* sp. На клубнях картофеля с червецом имелись все стадии развития симферобиуса: имаго (рис. 2) — самки и самцы, куколки в коконах (рис. 3), личинки (рис. 4) и яйца энтомофага в овисаках червцов (рис. 5). Просмотр клубней под стереомикроскопом выявил большой урон от действия энтомофага — множество погибших червцов, от которых остались одни шкурки.

Симферобиус принадлежит к сетчатокрылым насекомым семейства гемеробIIDae. Для представителей этого семейства было предложено русское название «полуденники» (Горностаев, 1999). Взрослые и личинки видов этого семейства хищники, преимущественно афидофаги. Например, микромуса угольчатого *Micromus angulatus* Steph. используют для борьбы с тлями в теплицах (Штерншис, 2004). Некото-

рые виды рода *Symphorobius* показали высокую эффективность в качестве энтомофагов для контроля различных видов червцов (Захваткин, 2001). Еще в 1939 году с Ближнего Востока (Палестина) в Абхазию был завезен симферобиус (симферобий) *Symphorobius amicus* Navas для борьбы с виноградным червецом (Рубцов, 1954). По другим данным (Мянцева,

Харченко, 1989; Ижевский, 1990), из Палестины был интродуцирован другой вид — *Symphorobius sanctus* Tjeder, а *S. amicus* был интродуцирован в СССР из Малой Азии. В 1940 году симферобиус для борьбы с виноградным червецом из Закавказья

Рис. 1. Виноградный червец *Planococcus citri*
(фото Н.А. Гура)

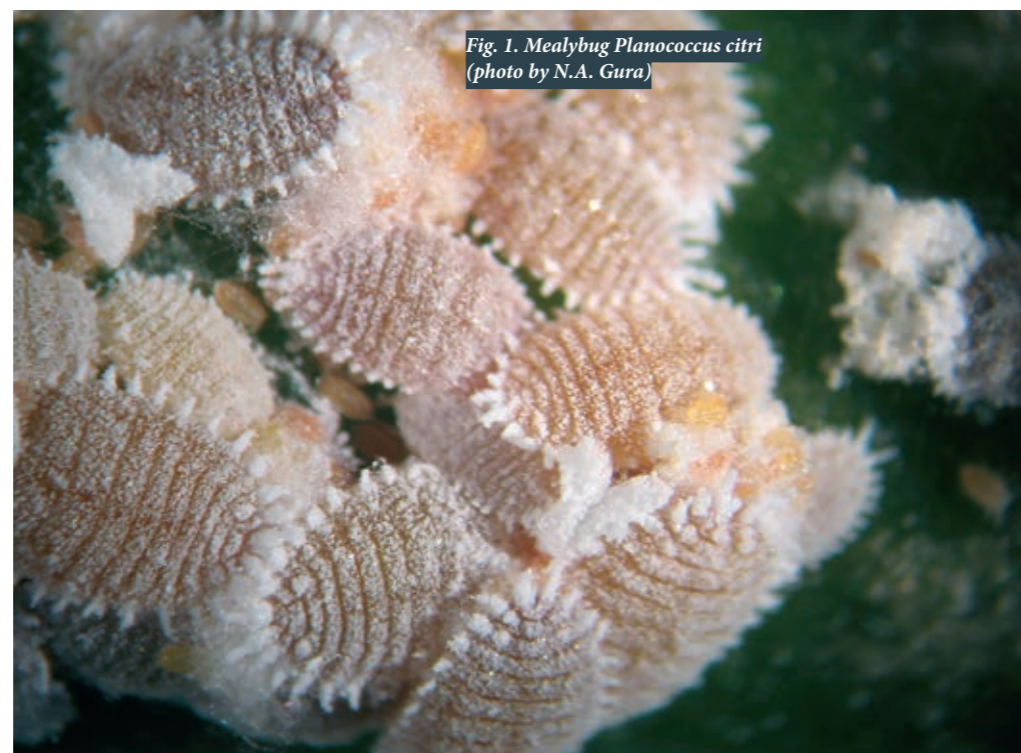


Fig. 1. Mealybug *Planococcus citri*
(photo by N.A. Gura)



Fig. 2. An imago of *Symphorobius* sp.
(photo by L. Chelvik)

Рис. 2. Имаго сетчатокрылого
насекомого симферобиуса
Symphorobius sp. (фото Л.Г. Чеглик)

был интродуцирован в Туркмению, а в 1942–1943 гг. — для борьбы с червецом Комстока *Pseudococcus comstocki* Kuwana в Узбекистан и Таджикистан. Энтомофаг везде показал высокую эффективность, в частности, в Ташкентской области Узбекистана при весеннем расселении симферобиуса в очагах червца Комстока к осени наблюдалась почти полная

Червцов и щитовок (кокцид) традиционно считают одними из наиболее благоприятных объектов для биологического контроля.

ликвидация вредителя. Однако фактов перезимовки отмечено не было и сложилось мнение, что акклиматизация обоих видов не состоялась из-за неблагоприятных климатических условий в местах интродукции, а симферобиус может быть применен для контроля червцов в закрытом грунте и в открытом грунте — методом сезонной колонизации (Ижевский, 1990). В 1956 году в Узбекистане были отмечены случаи обнаружения *Symphorobius amicus* в старых очагах расселения в значительном

количестве (<http://www.ecologybook.ru/ekologiya-nasekomich-stranitsa-56>), однако в сводке по Hemerobiidae СССР (Макаркин, 1986) оба интродуцированных вида не указаны.

Червцов и щитовок (кокцид) традиционно считают одними из наиболее благоприятных объектов для биологического контроля. В теплицах инсектария бывшего Всесоюзного НИИ карантина растений круглогодично содержалось около 20 видов кокцид на более чем 120 видах растений, преимущественно тропи-

ческого и субтропического происхождения. Для биологического контроля кокцид содержали 14 видов энтомофагов, завезенных из разных стран мира (Кравченко, 1989). Этих энтомофагов расселяли на юге России и в южных республиках СССР. Целесообразно предпринять попытку создания лабораторной культуры симферобиуса с целью применения энтомофага для контроля очагов червцов в Крыму и на Черноморском побережье России, а также в закрытом грунте.

Литература

1. Горностаев Г.Н. Определитель отрядов и семейств насекомых фауны России. М.: Логос, 1999. 176 с.
2. Захваткин Ю.А. Курс общей энтомологии. М.: Колос, 2001. 376 с.
3. Ижевский С.С. Интродукция и применение энтомофагов. М.: Агропромиздат, 1990. 223 с.
4. Кравченко М.А. Итоги интродукции энтомофагов кокцид. // В кн.: «Интродукция и применение полезных членистоногих в защите растений». Л., 1989. С. 44–49.
5. Макаркин В.Н. Обзор сем. Hemerobiidae (Neuroptera) фауны СССР. II // Энтомологическое обозрение, 1986. Т. 65. С. 604–617.
6. Мянцева С.Н., Харченко Г.А. Интродукция и применение насекомых-энтомофагов для защиты растений в Туркмении. // В кн.: «Интродукция и применение полезных членистоногих в защите растений». Л., 1989. С. 31–38.
7. Рубцов И.А. Вредители цитрусовых и их естественные враги. М.-Л.: Издательство АН СССР, 1954. 270 с.
8. Штерншис М.В. (ред.). Биологическая защита растений. М.: Колос, 2004. 264 с.
9. <http://www.ecologybook.ru/ekologiya-nasekomich-stranitsa-56>.

DETECTION OF AN ENTOMOPHAGE BELONGING to *Sympherobius* sp. (Neuroptera, Hemerobiidae) on the Laboratory Culture of the Citrus Mealybug *Planococcus citri* (Risso) (Homoptera, Pseudococcidae)

Oleg G. Volkov,
Head of FGBU VNIKR's Entomological Research and Methodology Department

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

Liudmila Chehlik,
Junior Researcher at FGBU VNIKR's Entomological Research and Methodology Department

Aurika F. Gostiuk,
Technician at FGBU VNIKR's Entomological Research and Methodology Department

In February 2015, an entomophagous neuropterous insect *Sympherobius* sp. was detected on the laboratory culture of the citrus mealybug, *Planococcus citri*, maintained on potato sprouts at FGBU VNIKR (Fig. 1). All life stages of the species could be found on potato tubers infested with the citrus mealy-

bug: male and female imagoes (Fig. 2); pupae in cocoons (Fig. 3); larvae and eggs in ovisacs (Fig. 5). Stereomicroscope analysis revealed severe damage caused by the entomophage, i.e. a large number of dead mealybugs with nothing but skins left of them.

The *Sympherobius* species are neuropterous insects in the family Hemerobiidae. The Russian name "poludenniki" was proposed for the members of

Mealybugs and scale insects (Coccoidea) are generally viewed as the most susceptible to biological control.

the family (Gornostaev, 1999). Larvae and adults of Hemerobiidae species are predators, primarily aphidophagous. For instance, *Micromus angulatus* Steph is used to control aphids in greenhouses (Shternshis, 2004). Some species of the family *Sympherobius* proved to be effective entomophagous insects for controlling various mealybug species (Zakhvatkin, 2001). As early as 1939, *Sympherobius amicus* Navas was introduced from the Middle East (Palestine) into Abkhazia to control the citrus mealybug (Rubtsov, 1954). According to other sources (Myartseva, Kharchenko, 1989; Izhevsky, 1990), another species—*Sympherobius sanctus* Tjeder—was introduced from Palestine, while *S. amicus* was introduced into the USSR from Asia Minor. To control the Comstock mealybug *Pseudococcus comstocki* Kuwana, *Sympherobius* was introduced into Turkmenistan from Transcaucasia in 1940 and into Tajikistan in 1942–1943. This entomophage proved to be highly effective. Particularly, in the Tashkent region

of Uzbekistan, a *Sympherobius* species released into Comstock mealybug outbreaks in spring almost completely eradicated the pest by autumn. However, overwintering was not reported. Thus, a conclusion was made that both species didn't become established due to adverse climatic conditions into which they had been introduced, but *Sympherobius* species could be used to control scale insects in protected and unprotected cultivation by seasonal colonization (Izhevski, 1990). In 1956, a large number of *Sympherobius amicus* was intercepted in old outbreaks in Uzbekistan (<http://www.ecologybook.ru/ekologiya-nasekomich-stranitsa-56>), however, in the summarized data on Hemerobiidae in the USSR (Makarkin, 1986) the introduced species were not specified.

Mealybugs and scale insects (Coccoidea) are generally viewed as the most susceptible to biological control. In the insectarium greenhouses of the former All-Soviet Research Institute of Plant Quarantine, over twenty species of coccids were maintained on a 24-hour basis on over 120 plants species mostly of tropical and subtropical origin. Fourteen species of entomophages originating in various countries were maintained for biological control (Kravchenko, 1989). These were re-

leased in the south of Russia and the southern republics of the USSR. It is deemed practical to rear *Sympherobius* under laboratory conditions for further use to control mealybug outbreaks in the Crimea and the Black Sea coast region of Russia as well as in protected cultivation.

Fig. 5. Eggs of *Sympherobius* sp. among eggs of the mealybug (photo by L. Chehlik)



Рис. 5. Яйца симферобиуса *Sympherobius* sp. среди яиц виноградного червеца (фото Л.Г. Чеглик)

Fig. 3. A pupa of *Sympherobius* sp. in a cocoon on a potato infested with mealybugs (photo by L. Chehlik)



Рис. 3. Куколка симферобиуса *Sympherobius* sp. в коконе на картофеле с виноградным червцом (фото Л.Г. Чеглик)

Рис. 4. Личинка симферобиуса *Sympherobius* sp. (фото Н.А. Гура)

Fig. 4. A larva of *Sympherobius* sp. (photo by N. Gura)



References

- Gornostaev G.N. Identifier of Insect Orders and Families of the Russian Fauna. Moscow: Logos, 1999. 176 pp.
- Zakhvatkin U.A. General Entomology Course. Moscow: Kolos, 2001. 376 pp.
- Izhevsky S.S. Introduction and Use of Entomophagous Insects. Moscow: Agropromisat, 1990. 223 pp.
- Kravchenko M.A. Results of entomophagous insects for coccids. // Lib.: "Introduction and Use of Beneficial Arthropods in Plant Protection". L., 1989. P. 44–49.
- Makarkin V.N. Review of the Family Hemerobiidae (Neuroptera) of the USSR Fauna. II //Entomological Review. Vol. 65, 1986. P. 604–617.
- Myartseva S.N., Kharchenko G.A. Introduction and Use of Entomophagous Insects in Plant Protection in Turkmenistan // Lib.: "Introduction and Use of Beneficial Arthropods in Plant Protection". L., 1989. P. 31–38.
- Pubtsov I.A. Citrus Pests and Their Natural Enemies. M.-L.: USSR AS Publishing House, 1954. 270 pp.
- Shternshis M.V. (editor). Biological Plant Protection. M.: Kolos, 2004. P. 264.
- <http://www.ecologybook.ru/ekologiya-nasekomich-stranitsa-56>.

Поиск молекулярных маркеров для идентификации сорных растений

Ю.Ю. Кулакова, старший научный сотрудник НЭО ФГБУ «ВНИИКР»

В.Г. Кулаков, начальник испытательного экспертного центра ФГБУ «ВНИИКР»

Е.С. Мазурин, заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР»

Идентификация растений традиционно строится на сравнении морфологических признаков вегетативных и генеративных органов. В подкарантинной продукции обычно встречаются семена и плоды, по которым герболог проводит видовую идентификацию карантинных сорняков. И хотя в большинстве случаев особенности строения генеративных органов и их частей характеризуются высокими консервативными родо- и видоспецифичными признаками, для некоторых групп растений таких отличий пока не выявлено (например для р. *Bidens*, *Cuscuta*). Это приводит к необходимости поиска других более надежных методов идентификации.

В последние десятилетия в агробиологии широко используются ДНК-технологии (Хавкин, 1997; Гречко, 2002; Харченко, Глазко, 2006). Они позволяют секвенировать нуклеотидную последовательность, выделив ДНК из минимального фрагмента ткани изучаемого организма на любой стадии его онтогенеза. Эти методы активно применяются для идентификации организмов различных таксономических уровней от вирусов до млекопитающих и часто востребованы для идентификации криптических или близкородственных видов, где классические морфологические методы «не работают».

Идентификация карантинных сорных растений на основе генетических маркеров еще недостаточно развита (Weedy..., 2009). Отсутствуют репрезентативные ДНК-библиотеки

и полногеномные последовательно-сти, депонированные в международных генетических базы данных (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ситуация осложняется отсутствием современных таксономических обработок в мировом объеме по отдельным родам (*Bidens*, *Iropomea*, *Cuscuta*), что тормозит молекулярно-генетические исследования этих групп.

При этом в отношении высших растений существуют определенные методические трудности, связанные с особенностями этих макрообъектов. Во-первых, растения имеют изменчивые по размеру геномы (от 120

В последние десятилетия в агробиологии широко используются ДНК-технологии.

млн п.н. у *Arabidopsis thaliana* до 60 млрд п.н. у однодольных растений) (Сингер, Берг, 1998). При этом значительный объем ДНК приходится на некодирующие участки, нежели на структурные гены (так называемый «парадокс величины С»), что серьезно замедляет процесс секвенирования и картирования генов. Полногеномные нуклеотидные последовательности известны лишь для небольшого числа видов, как правило, это хозяйственно ценные культурные растения (кукуруза, рис, пшеница, ячмень и др.).

Во-вторых, в отличие от большинства других живых организмов, для многих растений широко

распространено такое явление, как полиплоидия, т.е. кратное увеличение числа хромосом в клетке или даже наличие в одной ткани клеток с разным уровнем плоидности (миксоплоидия), что вызывает определенные затруднения при анализе генетического материала.

В-третьих, не решенной до конца серьезной методической задачей является выбор единого для всех высших растений стандартного участка ДНК, пригодного для изучения генетического полиморфизма на разных таксономических уровнях. Предполагается, что такой участок должен быть консервативен в пределах одного вида (учитывая при этом возможную внутривидовую изменчивость) и иметь достоверные межвидовые отличия. В геносистематике животных обычно применяют 5' фрагмент субъединицы митохондриального белоккодирующего гена цитохром С оксидазы (COI), чья вариабельность является подходящей во многих случаях даже при изучении полиморфизма на низком таксономическом уровне (Moore, 1995). Для растений фрагмент COI не подходит в качестве молекулярного маркера в силу низкой и очень неравномерной вариабельности этой последовательности. Поэтому в настоящее время у растений используют разные участки ДНК в зависимости от целей исследования и таксономического положения объекта.

Одним из популярных ядерных участков являются ITS — Internal Transcribed Spacer (Gerbi, 1985;

Baldwin, 1992; Alvarez, Wendel, 2003; Chen, 2010). Это неотъемлемая часть генома любого эукариотического организма, представляющая собой tandemно повторенные ядерные гены рибосомных РНК. Внутри каждого повтора присутствуют эволюционно консервативные участки (18S и 28S рДНК), разделенные межгенными транскрибируемыми спейсерами, для которых характерна высокая вариабельность. В качестве генетических маркеров у растений используют внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1 и ITS2), которые характеризуются более высоким полиморфизмом по сравнению с генами рРНК. ITS используют для решения ключевых вопросов филогении растений, о чем свидетельствует большое число публикаций и нуклеотидных последовательностей. Недостатком ITS является высокая многокopiesность региона и отсутствие универсальных праймеров, позволяющих идентифицировать близкородственные виды в широком ряду сосудистых растений. Генетики продолжают поиск новых ядерных регионов, в том числе с акцентом на однокопийные локусы. Так, например, для идентификации диплоидных злаков предложен регион «knotted1», представленный в ядре одной копией (Chemisquy et al., 2010).

В последние годы внимание исследователей привлекают небольшие по размеру геномы клеточных органелл — митохондрий и хлоропластов (Шнеер, 1991; Юрина, Одинцова, 1998; Palmer, 1985, 1987; Olmstead, Palmer, 1994). Митохондриальная ДНК (мДНК) у растений отличается высоким внутривидовым полиморфизмом, что не позволяет использовать ее для филогении покрытосеменных растений (Kress et al., 2005; Антонов, 2006). При этом в мДНК удалось выявить потенциально информативные индели для идентификации до уровня трибы и рода (Ward et al., 2005).

С 90-г гг. XX века геносистематики наряду с ядерным стали использовать хлоропластный геном — уникальный источник молекулярных данных, имеющий ряд существенных преимуществ (Palmer, 1986, 1987; Downie, Palmer, 1992; Chase et al., 1993). Во-первых, типичная хлоропластная ДНК (хлДНК) наземных растений одинакова по строению у

всех сосудистых растений и представляет собой кольцевую двуцепочечную молекулу. Она имеет сравнительно небольшие размеры (не более 170 тыс. п.н.), что дает возможность тестировать ее целиком, используя анализ продуктов рестрикции или проводить полногеномное секвенирование (Антонов, 2006). Во-вторых, в отличие от ядерного генома, который является многокопийным, большинство генов хлДНК представлены единичной копией. В-третьих, хлДНК весьма консервативна как в плане строения, так и тех изменений, которые происходят в ней в ходе эволюции, и характеризуется как «эволюционно стабильная» (Kolodner, Tewari, 1975; Bedbrook, Kolodner, 1979; Wolfe, Sharp, 1987; Clegg, 1991). Количество хлДНК мо-

жет составлять до 10% от суммарной ДНК клеток растений, что позволяет выделять ее в довольно больших количествах. Обычно все хлоропласты в клетке генетически схожи между собой за небольшим исключением (Кочиева, 2004).

ХлДНК содержит информацию приблизительно о 130 генах (Bedbrook, Kolodner, 1979). Из них наиболее популярными и часто используемыми в генетическом штрих-кодировании, филогении и популяционной генетике растений являются *matK*, *rbcl*, *rpl16*, *ndhF*, межгенный спейсер *trnH-psbA* (Clegg, 1994; Chase et al., 1993; Soltis et al., 2000; Kress et al.,

Рис. 1. Ценхрус длинноколочковый (*Cenchrus longispinus*) — карантинный объект РФ



Регион	Размер, п.н.	Кодирует	Применение
matK	~ 1500	Белок, участвующий в сплайсинге интронов группы II A	Q-bank Invasive plants (http://www.q-bank.eu) Barcode of Life Data Systems (http://www.barcodinglife.org)
rbcL	~ 1500	Большую субъединицу фермента рибулозо-1,5-бифосфаткарбоксилазы	Barcode of Life Data Systems (http://www.barcodinglife.org) Филогения, геносистематика
rpl16	~ 1000	Белок большой субъединицы рибосом	Филогения, геносистематика
trnH-psbA	~ 450	тРНК	ДНК-баркодирование цветковых растений (Kress et al., 2005)
ndhF	~ 2000	Кофермент НАДФ	Филогения, геносистематика
trnL ^{UAA} - trnF ^{GAA}	~ 900	Некодирующий	Филогения, геносистематика

2005) (таблица). Недавно созданная европейская база данных «Q-bank Invasive plants» обеспечивает возможность молекулярной идентификации инвазивных растений именно по хлоропластным генам (<http://www.q-bank.eu>).

Однако в некоторых исследованиях отмечено, что кодирующие регионы очень медленно эволюционируют и непригодны для поиска нуклеотидного полиморфизма среди ортологичных генов близкородственных видов (Taberlet, 1991; Shaw et al., 2007).

В связи с этим интерес исследователей был направлен на изучение некодирующих регионов, которые занимают большую часть пластома. Первым и до сих пор популярным хлоропластным некодирующим участком является межгенный спейсер trnL^{UAA}-trnF^{GAA}, расположенный в большой субъединице хлДНК. Для него были предложены универсальные праймеры, позволяющие выявлять полиморфизм даже у близкородственных видов (Taberlet et al., 1991). За последнее время в международный генбанк по этому региону депонировано большое число нуклеотидных последовательностей по разным таксономическим группам сосудистых растений. Дальнейшее изучение хлДНК выявило новые перспективные локусы. При сравнении полногеномных хлоро-

В настоящее время у растений используют разные участки ДНК в зависимости от целей исследования и таксономического положения объекта.

пластных последовательностей у различных групп растений было отмечено, что устойчиво варьируемые участки чаще всего выпадают на определенные некодирующие регионы (Shaw et al., 2005; 2007). Среди них были выбраны потенциально информативные, т.е. участки, которые проявили высокую степень полиморфизма в широком ряду таксонов: rpl32-trnL^{UAG}, trnQ^{UUG}-rps16, 3-TrnV^{UAC}-ndhC, ndhF-rpl32, psbD-trnT^{GGU}, psbJ-petA, 3-rps16-5-trnK^{UUU}, atpI-atpH, petL-psbE и др. (Shaw et al., 2005; 2007; 2014). Эти данные согласуются с гипотезой о разной скорости эволюционных изменений, происходящих в различных частях пластома, что может быть использовано в генетических исследованиях (Антонов, 2006).

В экспериментальных работах, проводимых в ФГБУ «ВНИИКР» по поиску молекулярных маркеров для идентификации карантинного сорного растения ценхруса длинноколючкового (*Cenchrus longispinus*), были использованы вышеперечисленные участки хлоропластного генома. Предварительный поиск информации в международном генетическом банке не выявил ни одной

депонированной последовательности по данному таксону (www.ncbi.nlm.nih.gov). Задачей нашего исследования было найти нуклеотидный полиморфизм в геноме карантинного вида ценхруса, отличающий его от других морфологически схожих с ним видов (*Cenchrus spinifex* Cav., *C. echinatus* L., *C. myosuroides* Kunth., *C. ciliaris* L., *C. brownii* Roem. & Schult., *C. biflorus* Roxb.).

Работу проводили стандартными методами (выделение ДНК по методу Дойле, ПЦР, секвенирование продуктов амплификации по Сэнгеру). Для поиска межвидового полиморфизма использовали 16 некодирующих участков хлДНК. ПЦР проводили в термоциклере Veriti (Applied Biosystems, США), используя рекомендованные праймеры (Shaw et al., 2005; 2007). Продукты ПЦР разделяли электрофоретически в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием; результаты регистрировали в гель-документирующей системе Bio-Rad. Полученные продукты амплификации подвергали прямому секвенированию на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США). Анализ последовательностей полученных

сиквенсов проводили с использованием пакета программ BioEdit 7.051. Всего было секвенировано более 100 образцов.

В итоге были получены следующие результаты: 1) ПЦР-продукты удалось получить по 12 локусам; 2) по 4 «неудачным» участкам (psaI – accD, ndhF – rpl32, trnS–trnG–trnG, psbD – trnT) требуется дальнейший подбор праймеров; 3) по пяти локусам не был выявлен межвидовой полиморфизм, что свидетельствует о консервативности этих регионов в геноме рода *Cenchrus* (trnL^{UAA}-trnF^{GAA}, trnT^{UUG}-trnL^{UAA}, ndhJ-trnF, 3' rps16-trnK, rpl16); 4) по трем локусам были выявлены признаки гетерогенности матрицы (3' trnV-ndhC, TrnQ-5' rps16, atpI-atpH), что требует оптимизировать условия ПЦР и 5) лишь по одному межгенному спейсеру rpl32-trnL^{UAG} карантинный вид достоверно отличался от некарантинных по 4 нуклеотидным заменам. Данный маркер признан одним из самых потенциально информативных среди некодирующих локусов, что подтверждается многочисленными публикациями (Shaw et al., 2005; 2007; 2014).

Таким образом, учитывая, что выбор целевой ДНК-последовательности и оптимизация с ней ПЦР является самым рутинным этапом в разработке молекулярно-генетического метода *de novo*, считаем целесообразным на первом этапе скрининга использовать молекулярные маркеры на основе хлоропластной ДНК.

Литература

1. Антонов А.С. Геносистематика растений. М.: ИКЦ «Академкнига», 2006.
2. Гречко В.В. Молекулярные маркеры ДНК в изучении филогении и систематики // Генетика. 2002. Т. 38. С. 1013–1033.
3. Кочиева Е.З. Геномный полиморфизм представителей сем. Solanaceae (род *Solanum*, *Lycopersicon*, *Capsicum*). Автореф. дисс. доктора биол. наук. М. ТСХА, 2004.
4. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. М.: Мир, 1998.
5. Хавкин Э.Е. Молекулярные маркеры в растениеводстве. // С.-х. Биология. 1997. № 5. С. 3–21.
6. Харченко П.Н., Глазко В.И. ДНК-технологии в развитии агробиологии. М., 2006.

7. Шнеер В.С. Хлоропластная ДНК как источник информации для систематики и филогении высших растений // Бот. Журнал, 1991. Т. 76. С. 17–32.

8. Юрина Н.П., Одинцова М.С. Сравнительная характеристика структурной организации геномов хлоропластов и митохондрий растений. // Генетика, 1998. Т. 34. С. 5–22.

9. Alvarez I. & Wendel J.F. (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Mol. Phylogenet. Evol. № 29, P. 417–434.

10. Baldwin B.G. (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the compositae // Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 1, № 1, P. 3–16.

11. Bedbrook J.R., Kolodner R. (1979) The structure of chloroplast DNA // Annual Review Plant Physiol. Vol. 30, P. 593–620.

12. Chase M.W., Soltis D.E. Olmstead R. et al. (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene rbcL. // Annals of the Missouri Botanical Garden. 80. P. 528–580.

13. Chemisquy M.A., Giussani L.M., Scatagliini M.A., Kellogg E.A., Morrone O. (2010) Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combination in *Cenchrus*. // Annals of Botany. Vol.106. P. 107–130.

14. Chen S.L. et al. (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. // PLoS One, 5 (1).

15. Clegg M.T., Learn G.N., Golenberg E.M. (1991) Molecular evolution of chloroplast DNA // Evolution at the Molecular Level. P. 135–149.

16. Downie S.R., Palmer J.D. (1992) Use of chloroplast DNA rearrangements in reconstructing plant phylogeny // Molecular Systematics of Plants. N.Y. Chapman and Hall. P. 14–35.

17. Invasive Plant Ecology in Natural and Agricultural Systems / B. D. Booth, S. D. Murphy, C.J. Swanton / 2nd Edition, CAB International, 2010.

18. Kolodner R., Tewari K.K. (1975) The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants // Biochim. Biophys Acta. Vol. 402, P. 372–390.

19. Kress J.W., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A. and Janzen D.H. (2005) Use of DNA Barcodes to identify flowering plants. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. № 102. P. 8369–8374.

20. Moore W.S. (1995) Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial gene trees versus nuclear gene trees // Evolution. V. 49. P. 718–726.

21. Olmstead R.G., Palmer J.D. (1994) A chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis // Amer. J. Bot. Vol. 81. P. 1205–1224.

22. Palmer J.D. (1985) Comparative organization of chloroplast genomes // Annu. Rev. Genet. Vol. 19. P. 325–354.

23. Palmer J.D. (1986) Chloroplast DNA and phylogenetic relationship // DNA systematics. Plants. S.K. Dutta, Ed. Vol. 2, Boca Raton: CRC Press, P. 63–80.

24. Palmer J.D. (1987) Chloroplast DNA evolution and biosystematics uses of chloroplast DNA variation // Amer. Natur. Vol. 130. P. 6–29.

25. Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Schilling E.E., Small R.L. (2005) The Tortoise and the Hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis // American Journal of Botany. Vol. 92 (1). P. 142–166.

26. Shaw J., Lickey E. B., Edward E., Schilling, Small R.L. (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III // American Journal of Botany. Vol. 94 (3). P. 275–288.

27. Shaw J., Shafer H.L., Leonard O.R., Kovach M.J., Schorr M., Morris A.B. (2014) Chloroplast DNA sequence utility for the lowest phylogenetic and phylogeographic inferences in Angiosperms: The Tortoise and the Hare IV. // American Journal of Botany. Vol. 101 (11). P. 1–18.

28. The Tortoise and the Hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis // American Journal of Botany. 2005. Vol. 92 (1). P. 142–166.

29. Soltis D.E., Soltis P.S., Chase M.W., Mort M.E., Albach D.C., Zanis M., Savolainen V., Hahn W.H., Hoot S.B., Fay M.F. et al. (2000) Angiosperm phylogeny inferred from a combined data set of 18S rDNA, rbcL and atpB sequences. // Bot. J. Linn. Soc. № 133. P. 381–461.

30. Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // Plant Molecular Biology. Vol. 17. P. 1105–1109.

31. Ward J., Peakalla R., Gilmore S.R., Robertson J. (2005) A molecu-

lar identification system for grasses: a novel technology for forensic botany // Forensic Science International. № 152. P. 121–131.

32. Weedy and Invasive Plant Genomics / C. Neal Stewart, Jr. Blackwell Publishing 2009.

33. Wolfe K.H., Li W.H., Sharp P.M. (1987) Rates of nucleotide substitutions vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 84. P. 9054–9058.

Search for Molecular Markers FOR IDENTIFICATION OF WEEDS

Yuliana Yu. Kulakova, Senior Researcher of FGBU VNIKR's Research and Testing Department

Vitaly G. Kulakov, Chief of FGBU VNIKR's Expert and Testing Department

Evgeny S. Mazurin, FGBU VNIKR's Deputy Director

Traditionally, identification of plants relies on comparing the morphological characteristics of vegetative and generative organs. As a rule, regulated articles carry seeds and fruit by which a weed scientist identifies species of quarantine weeds. Even though the structural features of generative organs and their parts are generally marked by highly conserved genus and species specific characteristics, some groups of plants have no such distinctive features identified as yet (for instance, the genera *Bidens*, *Cuscuta*). This necessitates the search for other more reliable identification methods.

Over the past decades, DNA-based technologies have been widely used in agricultural biology (Khavkin, 1997; Grechko, 2002; Kharchenko, Glazko, 2006). They enable to determine the order of a nucleotide sequence extracting the DNA from the smallest tissue fragment of an organism under study at any stage of its ontogenesis. These methods are extensively exploited for identifying organisms of various taxonomic levels – from viruses to mammals – and are frequently in demand for identification of cryptic or closely related species when classical morphological methods are of “no use”.

Identification of quarantine weeds based on genetic markers is still underdeveloped (Weedy..., 2009). No representative DNA-libraries and whole-genome sequences deposited in international genetic databases are available (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The matter is worsened by the lack of current taxonomic processing of specific genera (*Bidens*, *Ipomoea*, *Cuscuta*) worldwide, thus, impeding molecular and genetic studies of these groups.

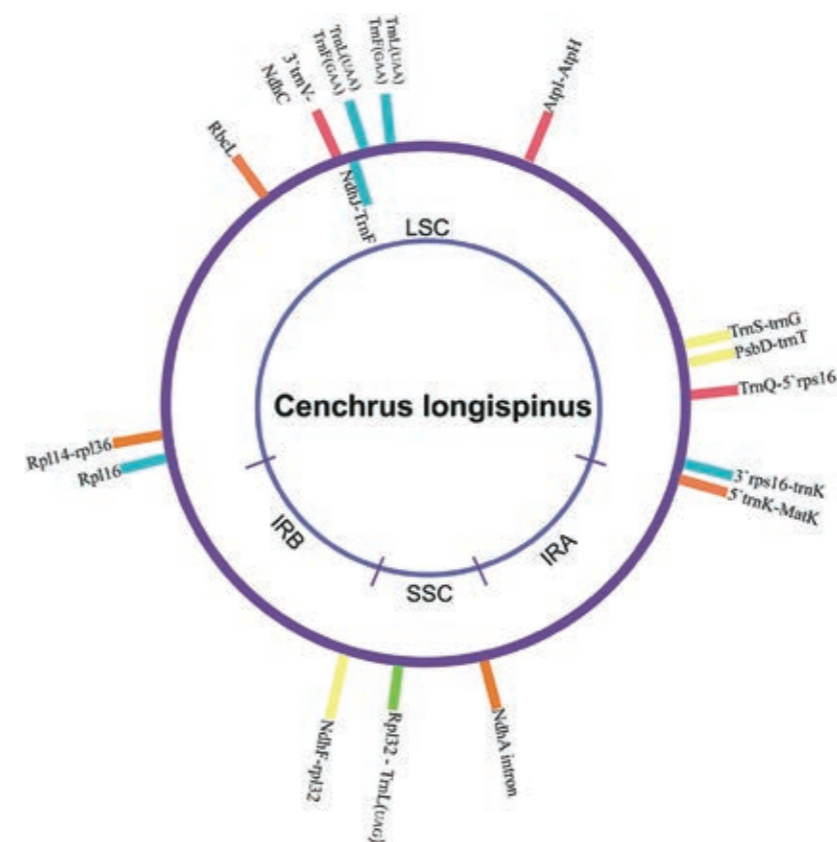
However, with regard to higher plants, certain methodological difficulties related to the peculiarities of these macro objects are encountered. Firstly, plants have genomes variable in size (between 120 million b.p. in *Arabidopsis thaliana* and 60 billion b.p. in monocotyledons) (Singer, Berg, 1998). Furthermore, a considerable part of DNA is occupied by non-coding regions rather than by structural genes (the so-called C-value paradox) and this considerably slows down the process of sequencing and gene mapping. Whole-genome nucleotide sequences are known only for a small number of species, mainly, of economically important cultivated plants (corn, rice, wheat, barley, etc.).

Secondly, unlike most of other living organisms many plants experience such

phenomenon as polyploidy, i.e. multiplication of chromosomes in a cell and even presence of cells with a different level of ploidy in a single tissue (mixoploidy). This causes certain difficulties for the analysis of genetic material.

Over the past decades, DNA-based technologies have been widely used in agricultural biology.

Thirdly, a selection of a standard DNA region common for all higher plants and, thus, suitable for studying genetic polymorphism at various taxonomic levels remains a serious methodological task to be completely solved. Such a region is supposed to be conserved within one species (taking into consideration a potential intraspecies variability) and have significant interspecies differences. The genotaxonomy of animals uses 5'-fragment of the mitochondrial protein encoding cytochrome C oxidase gene subunit (COI) — its variability is suitable in many cases — even when polymorphism is studied at a low taxonomic level (Moore, 1995). For plants, the COI fragment cannot be utilized as a molecular marker due to low and



- Informative marker / Информативный маркер
- This marker revealed no interspecies polymorphism / Межвидовой полиморфизм не был выявлен по данному маркеру
- No PCR-product was detected by this marker / Отсутствие ПЦР-продукта по данному маркеру
- Features of matrix heterogeneity related to this marker / Признаки гетерогенности матрицы по маркеру
- Studies on this marker will be continued / Работа с маркером будет продолжена

Рис. 2. График-схема хлоропластной ДНК *Cenchrus longispinus*

Fig. 2. Structural diagram of *Cenchrus longispinus* chloroplast DNA

very uneven variability of this sequence. Therefore, different DNA regions in plants are currently used depending on the study purposes and taxonomic position of the object.

One of the most frequently used regions is ITS — Internal Transcribed Spacer (Gerbi, 1985; Baldwin, 1992; Alvarez, Wendel, 2003; Chen, 2010). It is an integral part of the genome in any eukaryotic organism occurring in tandem repeats of nuclear ribosomal RNA genes. Every repeat features evolutionarily conserved regions (18S and 28S rDNA) separated by intergenic transcribed spacers characterized by high variability. In plants, internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) are used as genetic markers. They are

more polymorphic than rRNA genes. ITS is used to solve the key issues of plant phylogeny as evidenced by a large number of publications and nucleotide sequences. The disadvantage of ITS is the high abundance of the region and lack of universal primers enabling to identify closely related species in a wide range of vascular plants. Geneticists are searching for new nuclear regions focusing on single-copy loci. For instance, for the identification of diploid cereals the single-copy nuclear knotted1 marker was proposed (Chemisquy et al., 2010).

In recent years, researchers have been attracted to small-sized genomes of cell organelles — mitochondria and chloroplasts (Sneer, 1991; Yurina, Odintsova, 1998; Palmer, 1985, 1987; Olmstead, Palmer, 1994). Mitochondrial DNA (mtDNA) in plants is marked by high intraspecies polymorphism which doesn't allow using it for the phylogeny of metasperms (Kress et al., 2005; Antonov, 2006). At the same time, poten-

tially informative indels for identification to the tribe and genus level were successfully found in mtDNA (Ward et al., 2005).

Since the 1990s, genotaxonomists have been using the chloroplast genome along with the nuclear genome as a unique source of molecular data with a range of substantial advantages (Palmer, 1986, 1987; Downie, Palmer, 1992; Chase et al., 1993). In the first place, typical chloroplast DNA (ctDNA) of land plants has a similar structure in all vascular plants and is a circular double stranded molecule. Its size is relatively small (not exceeding 170 thousand b.p.) which enables to test all of it using the restriction analysis or to perform the whole-genome sequencing (Antonov, 2006). In the second place, as opposed to the multi-copy nuclear genome the majority of ctDNA genes are single-copy. In the third place, ctDNA is highly conserved both with regard to its structure and changes occurring in the course of evolution and is characterized as “evolutionarily stable” (Kolodner, Tewari, 1975; Bedbrook, Kolodner, 1979; Wolfe, Sharp, 1987; Clegg, 1991). CtDNA can comprise up to 10% of the total plant cell DNA which allows for its extraction in good many volumes. As a rule, all chloroplasts in a cell are genetically similar with only a few exceptions (Kochieva, 2004).

CtDNA carries information regarding approximately 130 genes (Bedbrook, Kolodner, 1979). Genetic barcoding, phylogeny and population genetics most eagerly and frequently utilize matK, rbcL, rpl16, ndhF, intergenic spacer trnH-psbA (Clegg, 1994; Chase et al., 1993; Soltis et al., 2000; Kress et al., 2005) (Table). A recently established European database “Q-bank Invasive plants” enables to perform molecular identification of invasive plants specifically by chloroplast genes (<http://www.q-bank.eu>).

However, some studies note that coding regions evolve very slowly and are not applicable in searching for nucleotide polymorphism among orthologous genes of closely related species (Taberlet, 1991; Shaw et al., 2007).

In this context, researchers focused on non-coding regions occupying the largest part of the plastome. The first and still commonly used chloroplast non-coding region is intergenic spacer trnL^{UAA}-trnF^{GAA} located in the large ctDNA subunit. Universal primers

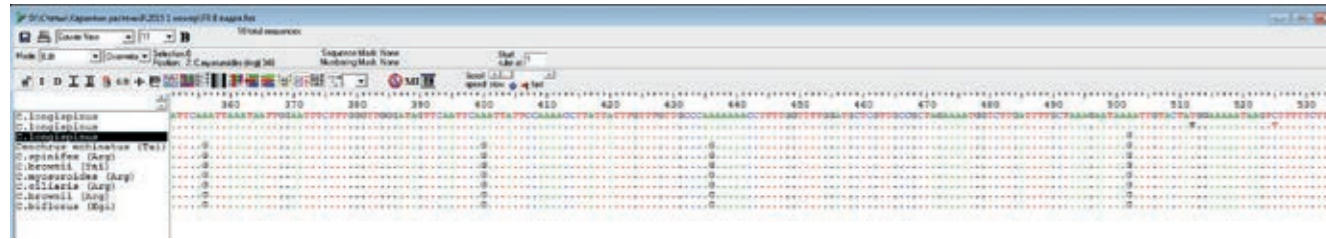


Рис. 3. Выравнивание нуклеотидных последовательностей образцов *p. Cenchrus* по межгенному спейсеру *rpl32-trnL* с заменами G/A у карантинного вида *C. longispinus* по 4 позициям

Fig. 3. Alignment of the genus *Cenchrus* sample nucleotide sequences of the intergenic spacer *rpl32-trnL* with G/A substitutions in the quarantine species *C. longispinus* at four positions

were developed for it enabling to detect polymorphism even in closely related species (Taberlet et al., 1991). Recently, a large number of nucleotide sequences of this region belonging to various taxonomic groups of vascular plants have been deposited to the international GenBank. Further studies of ctDNA revealed new potential loci. Comparing whole chloroplast genome sequences in different groups of plants showed that consistently variable regions most frequently were specific non-coding regions (Shaw et al., 2005; 2007). Among them potentially informative regions, i.e. regions showing the high level of polymorphism in a wide range of taxa,

were selected, namely: *rpl32-trnL^{UAG}*, *trnQ^{UUG}-rps16*, *3-TrnV^{UAC}.ndhC*, *ndhF-rpl32*, *psbD-trnT^{GGU}*, *psbJ-petA*, *3-rps16-5-trnK^{UUU}*, *atpI-atpH*, *petL-psbE*, etc. (Shaw et al., 2005; 2007; 2014). These data agree with the hypothesis of varying rates of evolutionary changes in various parts of the chloroplast DNA which can be employed in genetic studies (Antonov, 2006).

The above mentioned regions of the chloroplast genome were utilized in experiments on finding molecular markers for the identification of the longspine sandbur *Cenchrus longispinus* performed at FGBU VNIKR. Preliminary search in the international GenBank showed no sequences deposited for this taxon (www.ncbi.nlm.nih.gov). Our research objective was to find nucleotide polymorphism in the genome of the quarantine *Cenchrus* species distinguishing it from other morphologically similar species (*Cenchrus spinifex* Cav., *C. echinatus* L., *C. myosuroides* Kunth., *C. ciliaris* L., *C. brownii* Roem. & Schult., *C. biflorus* Roxb.).

Standard methods were applied: Doyle and Doyle DNA isolation method, PCR, and Sanger sequencing of

Different DNA regions in plants are currently used depending on the study purposes and taxonomic position of the object.

amplification products. 16 non-coding regions of ctDNA were utilized for identifying interspecies polymorphism. The PCR was performed in the Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, US) using the recommended primers (Shaw et al., 2005; 2007). The PCR-products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide; the results were recorded with the Bio-Rad gel documentation system. The obtained amplification products were directly sequenced using the ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, US). The obtained sequences were analyzed using software BioEdit 7.051. Totally, over 100 samples were sequenced.

The following results were obtained: 1) PCR products were obtained from 12 loci; 2) further development of primers for 4 “unsuccessful” regions (psaI —

accD, *ndhF* — *rpl32*, *trnS-trnG-trnG*, *psbD-trnT*) is required; 3) no interspecies polymorphism was found at 5 loci which indicates that these regions are conserved in the genome of the genus *Cenchrus* (*trnL^{UAA}-trnF^{GAA}*, *trnT^{UGU}-trnL^{UAA}*, *ndhJ-trnE*, *3`rps16-trnK*, *rpl16*); 4) features of matrix heterogeneity were found at three loci (*3`trnV-ndhC*, *TrnQ-5`rps16*, *atpI-atpH*) which necessitates the optimization of the PCR conditions; and 5) 4 nucleotide substitutions in only one intergenic spacer *rpl32-trnL^{UAG}* provided the significant difference of the quarantine species from the non-quarantine ones. This marker is recognized as the most potentially informative among non-coding loci which is confirmed by numerous publications (Shaw et al., 2005; 2007; 2014).

Thus, taking into consideration that identification of the target DNA sequence and PCR optimization using it is the most routine stage of developing *de novo* molecular genetic methods, we deem it advisable to use chloroplast DNA molecular markers.

References

- Antonov A.S. Genotaxonomy of Plants. M.: Akademkniga Publishing House, 2006.
- Grechko V.V. DNA Molecular Markers in Phylogeny and Taxonomy // Genetics. 2002. Vol. 38. P. 1013–1033.
- Kochieva E.Z. Genomic polymorphism in representatives of the family Solanaceae (genera *Solanum*, *Lycopersicon*, *Capsicum*). Author's abstract. M. Moscow Timiryazev Agricultural Academy, 2004.
- Singer M., Berg P. Genes and Genomes. M.: Mir, 1998.
- Khavkin E.E. Molecular markers in plant growing. // Agriculture. Biology. 1997. № 5. P. 3–21.
- Kharchenko P.N., Glazko V.I. DNA Technologies in the Development of Agricultural Biology. M., 2006.
- Shneer V.S. Chloroplast DNA as the source of information for taxonomy and phylogeny of higher plants // Botanical Journal, 1991. Vol. 76. P. 17–32.
- Yurina N.P., Odintsova M.S. Comparative analysis of the structural organization of plant chloroplast and mitochondrial genomes. // Genetics, 1998. Vol. 34. P. 5–22.
- Alvarez I. & Wendel J.F. (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // Mol. Phylogenet. Evol. № 29, P. 417–434.

10. Baldwin B.G. (1992) Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the compositae // Molecular Phylogenetics and Evolution. Vol. 1, № 1, P. 3–16.

11. Bedbrook J.R., Kolodner R. (1979) The structure of chloroplast DNA // Annual Review Plant Physiol. Vol. 30, P. 593–620.

12. Chase M.W., Soltis D.E. Olmstead R. et al. (1993) Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. // Annals of the Missouri Botanical Garden. 80. P. 528–580.

13. Chemisquy M.A., Giussani L.M., Scatagliini M.A., Kellogg E.A., Morrone O. (2010) Phylogenetic studies favour the unification of *Pennisetum*, *Cenchrus* and *Odontelytrum* (Poaceae): a combined nuclear, plastid and morphological analysis, and nomenclatural combination in *Cenchrus*. // Annals of Botany. Vol.106. P.107–130.

14. Chen S.L. et al. (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. // PLoS One, 5 (1).

15. Clegg M.T., Learn G.N., Golenberg E.M. (1991) Molecular evolution of chloroplast DNA // Evolution at the Molecular Level. P. 135–149.

16. Downie S.R., Palmer J.D. (1992) Use of chloroplast DNA rearrangements in reconstructing plant phylogeny // Molecular Systematics of Plants. N.Y. Chapman and Hall. P. 14–35.

17. Invasive Plant Ecology in Natural and Agricultural Systems / B. D. Booth, S. D. Murphy, C.J. Swanton / 2nd Edition, CAB International, 2010.

18. Kolodner R., Tewari K.K. (1975) The molecular size and conformation of the chloroplast DNA from higher plants // Biochim. Biophys Acta. Vol. 402, P. 372–390.

19. Kress J.W., Wurdack K.J., Zimmer E.A., Weigt L.A. and Janzen D.H. (2005) Use of DNA Barcodes to identify flowering plants. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. № 102. P. 8369–8374.

20. Moore W.S. (1995) Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial gene trees versus nuclear gene trees // Evolution. V. 49. P. 718–726.

21. Olmstead R.G., Palmer J.D. (1994) A chloroplast DNA systematics: a review of methods and data analysis // Amer. J. Bot. Vol. 81. P. 1205–1224.

22. Palmer J.D. (1985) Comparative organization of chloroplast genomes //

Annu. Rev. Genet. Vol. 19. P. 325–354.

23. Palmer J.D. (1986) Chloroplast DNA and phylogenetic relationship // DNA systematics. Plants. S.K. Dutta, Ed. Vol. 2, Boca Raton: CRC Press, P. 63–80.

24. Palmer J.D. (1987) Chloroplast DNA evolution and biosystematics uses of chloroplast DNA variation // Amer. Natur. Vol. 130. P. 6–29.

25. Shaw J., Lickey E.B., Beck J.T., Farmer S.B., Liu W., Miller J., Siripun K.C., Winder C.T., Schilling E.E., Small R.L. (2005) The Tortoise and the Hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis // American Journal of Botany. Vol. 92 (1). P. 142–166.

26. Shaw J., Lickey E. B., Edward E., Schilling, Small R.L. (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III // American Journal of Botany. Vol. 94 (3). P. 275–288.

27. Shaw J., Shafer H.L., Leonard O.R., Kovach M.J., Schorr M., Morris A.B. (2014) Chloroplast DNA sequence utility for the lowest phylogenetic and phylogeographic inferences in Angiosperms: The Tortoise and the Hare IV. // American Journal of Botany. Vol. 101 (11). P. 1–18.

28. . The Tortoise and the Hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis // American Journal of Botany. 2005. Vol. 92 (1). P. 142–166.

29. Soltis D.E., Soltis P.S., Chase M.W., Mort M.E., Albach D.C., Zanis M., Savolainen V., Hahn W.H., Hoot S.B., Fay M.F. et al. (2000) Angiosperm phylogeny inferred from a combined data set of 18S rDNA, *rbcL* and *atpB* sequences. // Bot. J. Linn. Soc. № 133. P. 381–461.

30. Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // Plant Molecular Biology. Vol. 17. P. 1105–1109.

31. Ward J., Peakalla R., Gilmore S.R., Robertson J. (2005) A molecular identification system for grasses: a novel technology for forensic botany // Forensic Science International. № 152. P. 121–131.

32. Weedy and Invasive Plant Genomics / C. Neal Stewart, Jr. Blackwell Publishing 2009.

33. Wolfe K.H., Li W.H., Sharp P.M. (1987) Rates of nucleotide substitutions vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 84. P. 9054–9058.

ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОРАСТАНИЯ ТЕЛИОСПОР *NEOVOSSIA INDICA* при помощи фильтратов культур агентов биологической борьбы

Шрван Кумар, Институт сельскохозяйственных наук, Бенаресский индуистский университет, Варанаси (Индия)

Аша Синха, Институт сельскохозяйственных наук, Бенаресский индуистский университет, Варанаси (Индия)

Дханбир Сингх, Отдел фитопатологии Сельскохозяйственного университета Химачал-Прадеш, Паламтур (Индия)

Субхаши Дханхолия, Отдел фитопатологии Сельскохозяйственного университета Химачал-Прадеш, Паламтур (Индия)

Введение

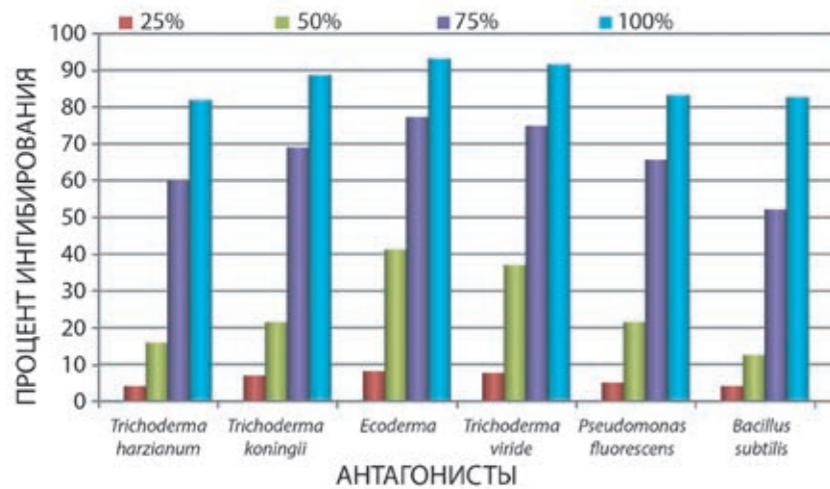
Пшеница (*Triticum aestivum* L.) — самая широко распространенная зерновая культура в мире. Она является основным продовольственным продуктом для миллионов людей. Географическая зона наиболее широкого распространения пшеницы располагается между 30–55° северной широты и 20–40° южной широты (Anonimus, 2011). Индийскую головню пшеницы, также называемую «частичной головней» (англ. «Partial

Ингибирование прорастания телиоспор *N. indica* при помощи фильтратов культур агентов биологической борьбы

Агрономы весьма обеспокоены широкой распространенностью данной болезни и ее воздействием на качество и жизнеспособность семян.

bunt»), впервые выявил М. Митра в ходе опыта в 1931 году в семенном материале пшеницы (*Triticum aestivum* L.), выращенном на ботанической станции в городе Карнал штата Харьяна, Индия. Таким образом, английское название болезни («Karnal bunt») происходит от имени города Карнал. Возбудителем индийской головни пшеницы является грибок *Neovossia indica* (Mitra) Mundkur.

Примерно семьдесят государств налагают карантинные ограничения на ввоз пшеницы из стран, в которых, по имеющимся данным, присутствует индийская головня пшеницы (Lari et al., 2006). Агрономы весьма обеспокоены широкой распространенностью данной болезни и ее воздействием на качество и жизнеспособность семян. Индийская головня пшеницы значительно сокращает объемы производства пшеницы, главным образом в Северной и Центральной Индии. Попытки побороть болезнь при помощи агротехнических методов и химических обработок не увенчались успехом. Единственным альтернативным методом борьбы с данной болезнью, обеспечивающим долгосрочные результаты, является применение агентов биологической борьбы (антагонистов). Например, было доказано, что такие вредные организмы, как *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens*, способны успешно бороться с *Neovossia indica*.



Материалы и методы

Жидкие культуры *Trichoderma harzianum* (SMA-4), *T. koningii* (JMA-11), *T. viride*-H and *T. viride* (Ecoderma) выращивали на картофельно-декстрозном бульоне, а культуры бактериальных антагонистов — *Pseudomonas fluorescens* (TNAU) и *Bacillus subtilis* (GB03) — на питательном бульоне в течение 7 дней при 25 ± 1 °C. Для получения экстракта без кусочков мицелия и спор проводилась фильтрация через два слоя ситовой ткани и центрифугирование при 3500 об/мин в течение 20 минут. Супернатант пропускали через фильтровальную бумагу Whatmann No. 41. Супернатант (100% чистую смесь) стерилизовали, пропуская его через шприц с ультратонкой фильтрующей насадкой (размер пор — 0,2 мкм) в стерильных условиях с последующим разбавлением для получения различных концентраций — 25, 50 и 75 процентов. Суспензию спор готовили в каждой концентрации. Прорастание телиоспор в стерильной дистиллированной воде служило контролем. Прорастание телиоспор регистрировали спустя семь дней после инокуляции при 20 ± 1 °C. Про-

Ингибирование телиоспор *N. indica* фильтратами культур агентов биологической борьбы

центное значение ингибирования телиоспор рассчитывали по формуле Винсента (Vincent (1947)):

$$I (\%) = \frac{(C - T)}{C} \times 100,$$

где I — это процентное значение ингибирования телиоспор, C — количество проросших телиоспор в контроле и T — количество проросших телиоспор в опыте.

Результаты

Данные о результатах воздействия фильтратов культур агентов биологической борьбы на прорастание телиоспор *N. indica* представлены в таблице и на рисунке. Данные показывают, что фильтраты культур агентов биологической борьбы приводили к значительному сокращению прорастания телиоспор по сравнению с контролем. Процентное значение ингибирования росло пропорционально увеличению концентрации фильтратов культур агентов биологической борьбы. Тем не менее, максимальное значение ингибирования прорастания (93,15%) было достигнуто в фильтрате культуры *T. viride* (Экодерма), за которым следовали фильтраты культур *T. viride* (91,64%), *T. koningii* (88,74%) и *Pseudomonas fluorescens* (83,27%) при 100%-й концентрации. *Bacillus*

subtilis и *T. harzianum* давали 82,77 и 81,95 процентов ингибирования соответственно. Минимальное ингибирование прорастания телиоспор наблюдалось в фильтрате культуры *B. subtilis* при 50%-й концентрации.

Обсуждение

В данном исследовании фильтрат культуры *T. viride* (Экодерма) привел к максимальной степени ингибирования прорастания телиоспор *N. indica* (93,15%); также он значительно отличался от других фильтратов культур агентов биологической борьбы.

Антагонизм считается следствием антибиоза. Dennis & Webster (1971a и 1971b) сообщили о выработке антибиоза *Trichoderma* spp. *T. harzianum* выделяет β-1, 3-глюканазу и хитиназу в фильтрат культуры, которые воздействуют на клеточную оболочку (Elad et al., 1982, Elad et al., 1983, Ridout et al., 1988). Claydon и Allan (1987) сообщили о выработке алкилопронов *T. harzianum* в фильтрате культуры.

Ингибирующее воздействие *T. viride* на прорастание телиоспор может быть объяснено наличием антибиотиков, например, глиовирин, пираноны, пептабиолы и других уже подробно описанных веществ (Vey et al., 2001). Помимо того, выработка

Обработка	Прорастание телиоспор (%) при различных концентрациях (%)*				Ингибирование прорастания телиоспор (%) при различных концентрациях (%)*			
	25	50	75	100	25	50	75	100
<i>Trichoderma harzianum</i>	24.09	21.13	10.05	4.54	4.14 (11.64)	15.93 (23.41)	59.99 (50.75)	81.95 (64.85)
<i>Trichoderma koningii</i>	23.38	19.72	7.77	2.83	6.95 (14.86)	21.54 (27.63)	69.07 (56.19)	88.74 (70.54)
<i>Trichoderma viride</i> (Ecoderma)	23.08	14.77	5.70	1.72	8.15 (16.12)	41.23 (38.96)	77.32 (60.46)	93.15 (74.08)
<i>Trichoderma viride</i>	23.19	15.82	6.31	2.10	7.72 (15.98)	37.05 (37.48)	74.91 (59.92)	91.64 (73.17)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	23.87	19.72	8.64	4.20	5.02 (12.77)	21.54 (27.63)	65.62 (54.08)	83.27 (65.84)
<i>Bacillus subtilis</i>	24.09	21.97	12.04	4.33	4.14 (11.64)	12.57 (20.75)	52.10 (46.19)	82.77 (65.45)
Контроль (в обычной воде)	25.13	25.13	25.13	25.13	-	-	-	-
KP (P=0.05)	HЗ	0.80	0.90	0.23	HЗ	3.22	2.19	2.20

*В среднем в трех повторах.

Прорастание телиоспор регистрировали спустя семь дней после инокуляции. Данные в скобках — значения арксинуса.

большого количества летучих вторичных метаболитов *Trichoderma*, таких, как этилен, цианистоводородная кислота, спирты, альдегиды, аламетицины и кетоны с длиной цепи до C₄, также играет важную роль в биологической борьбе (Landreau et al., 2002).

Заключение

Фильтрат культуры *T. viride* (Экодерма) вызвал наибольшую степень ингибирования прорастания телиоспор (93,15%) *N. indica*; также он значительно отличался от других фильтратов культур агентов биологической борьбы.

Благодарности

Этими словами благодарности и уважения мы хотим в полной мере выразить признательность своему уважаемому учителю и широко известному заместителю директора — доктору Дханбиру Сингху из Центра исследований в области горного сельского хозяйства и Центра неформального образования для фермеров (Дхаулакуан, округ Сирмур) — за помощь в проведении данного исследования.

Литература

- Anonymous (2011) Food Grains Production. *Chronicle* vol. xxii (2) pp. 90.
- Claydon N. and Allan M. (1987) Antifungal Alkylpyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transaction of British Mycological Society* 88: 503–513.
- Dennis C. and Webster J. (1971a) Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* — I production of non-volatile antibiotics. *Transaction of British Mycological Society* 57: 25–39.
- Dennis C. and Webster J. (1971b) Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* — II production of volatile antibiotics. *Transaction of British Mycological Society* 57: 41–48.
- Elad Y., Chet I. and Heniz Y. (1982) Degradation of plant pathogenic fungi by *T. harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* 28: 719–725.
- Elad Y., Chet I., Bayle P. and Heniz Y. (1983) Parasitism of *Trichoderma* spp. on *R. solani* and *Sclerotium rolfsii* — Scanning electron microscopy and Fluorescent microscopy. *Phytopathology* 73: 85–88.
- Landreau A., Pouchus Y.F., Salenave-Namont C., Biard J.F., Boumard

M.C., Robiou du P.T., Mondeguer F., Goulard C. and Verbist J.F. (2002) Combined use of LC/MS and a biological test for rapid identification of marine mycotoxins produced by *Trichoderma koningii*. *Journal of Microbiology Method* 48: 181–194.

8. Lari M. Carris, Lisa A. Castlebury and Goates Blair J. (2006) Non-systemic Bunt Fungi — *Tilletia indica* and *T. horrida*: A review of History, Systematics and Biology. *Annual Review of Phytopathology* 44: 113–133.

9. Mitra M. (1931) A new bunt on wheat in India. *Annals of Applied Biology* 18 (2): 178–179. pp. 311–346.

10. Ridout C.J., Caley-Smith J.R. and Lynch J.M. (1988) Fractionation of extracellular enzymes from mycoparasitic strain of *T. harzianum*. *Enzymes and Microbial Technology* 10: 180–187.

11. Vey A., Hoagland R.E. and Butt T.M. (2001) Toxic metabolites of fungal bio-control agents. *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*, Butt T.M., Jackson C. and Magan N., ed.^{3rd}, CAB International, Bristol.

12. Vincent J.H. (1947) Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors. *Nature* 159: 850.

EFFICACY OF CULTURE FILTRATES of Bio-control Agents on Teliospores Germination Inhibition of *Neovossia indica*

Shrvan Kumar, IAS, Banaras Hindu University, Varanasi (India)

Asha Sinha, IAS, Banaras Hindu University, Varanasi (India)

Dhanbir Singh, Department of Plant Pathology CSK HPKV (India)

Subhash Dhancholia, Department of Plant Pathology CSK HPKV (India)

Introduction

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is the most popular grain of the world and is the staple food of millions of people. The geographical concentration of wheat is found between 30–55°N latitude in the Northern hemisphere and between 20–40°S in Southern hemisphere (Anonymous, 2011). The

Karnal bunt, also referred to as ‘Partial bunt’ caused by *Neovossia indica* (Mitra) Mundkur was reported first by Mitra in 1931 on wheat (*Triticum aestivum* L.) from an experimental seed material grown at Botanical Station, Karnal (Haryana) in India and hence the name Karnal bunt. Approximate-

ly 70 countries place quarantine restriction on movement of wheat from countries where Karnal bunt is known to occur (Lari et al., 2006). Its widespread prevalence and effects on the quality and viability of seed has caused concern to agroscientists. Karnal bunt causes heavy losses in wheat produc-

Teliospores germination inhibition of *N. indica* by culture filtrate of bio-control agents

Treatment	Teliospores germination (%) at different concentrations (%)*				Teliospores germination inhibition (%) at different concentrations (%)			
	25	50	75	100	25	50	75	100
<i>Trichoderma harzianum</i>	24.09	21.13	10.05	4.54	4.14 (11.64)	15.93 (23.41)	59.99 (50.75)	81.95 (64.85)
<i>Trichoderma koningii</i>	23.38	19.72	7.77	2.83	6.95 (14.86)	21.54 (27.63)	69.07 (56.19)	88.74 (70.54)
<i>Trichoderma viride</i> (Ecoderma)	23.08	14.77	5.70	1.72	8.15 (16.12)	41.23 (38.96)	77.32 (60.46)	93.15 (74.08)
<i>Trichoderma viride</i>	23.19	15.82	6.31	2.10	7.72 (15.98)	37.05 (37.48)	74.91 (59.92)	91.64 (73.17)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	23.87	19.72	8.64	4.20	5.02 (12.77)	21.54 (27.63)	65.62 (54.08)	83.27 (65.84)
<i>Bacillus subtilis</i>	24.09	21.97	12.04	4.33	4.14 (11.64)	12.57 (20.75)	52.10 (46.19)	82.77 (65.45)
Control (in plain water)	25.13	25.13	25.13	25.13	-	-	-	-
CD (P=0.05)	NS	0.80	0.90	0.23	NS	3.22	2.19	2.20

* Average of three replications.

Teliospores germination was recorded after 7 days of inoculation.

Figure in parenthesis are arc sine values.

tion mainly in Northern and Central India. All efforts to control the disease through cultural practices and chem-

Its widespread prevalence and effects on the quality and viability of seed has caused concern to agroscientists.

ical treatment have been futile. The only alternative and long term control measures to avert this disease. Some antagonistic agents such as, *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* have been found effective against *Neovossia indica*.

Materials and methods

Liquid culture of *Trichoderma harzianum* (SMA-4), *T. koningii* (JMA-11), *T. viride*-H and *T. viride* (Ecoderma) were grown on potato dextrose broth and bacterial antagonists, *Pseudomonas fluorescens* (TNAU) and *Bacillus subtilis* (GB03) were grown on nutrient broth for 7 days at 25 ± 1 °C. In order to get extract free from mycelial bits and spores were filtered through double layered

cheese cloth and centrifuged at 3500 rpm for 20 minutes. The supernatant was filtered through Whatmann No. 41 filter paper. The supernatant (pure stock 100%) was filter sterilized with millipores filter syringes (0.2 μ pore size) under aseptic conditions and further dilutions were made to different concentrations of 25, 50 and 75 per cent. In each concentration spore suspension was prepared. Teliospores germination in sterilized distilled water served as control. Teliospores germination was recorded after 7 days of incubation at 20 ± 1 °C. Per cent inhibition of teliospores calculated as per Vincent (1947) formula.

$$I (\%) = \frac{(C-T)}{C} \times 100,$$

where, I = Per cent inhibition of teliospores germination, C = No. of germinated teliospores in control and T = No. of germinated teliospores in treatment.

Results

The results on behaviour of culture filtrate of bio-control agent on the teliospores germination of *N. indica* are presented in Table and Fig. The data re-

vealed that culture filtrate of all bio-control agents gave significant reduction of teliospores germination as compared to control. Per cent inhibition increased with the increase in concentration of culture filtrate of bio-control agents. However, maximum teliospores inhibition (93.15%) was achieved with culture filtrate of *T. viride* (Ecoderma) followed by *T. viride* (91.64%), *T. koningii* (88.74%) and *Pseudomonas fluorescens* (83.27%) at 100 per cent concentration. *Bacillus subtilis* and *T. harzianum* resulted in 82.77 and 81.95 per cent inhibition, respectively. Minimum teliospores inhibition was observed in culture filtrate of *B. subtilis* at 50 per cent concentration.

Discussions

In present investigation, culture filtrate of *T. viride* (Ecoderma) resulted in maximum inhibition of teliospores germination (93.15%) of *N. indica* and differed significantly from the culture filtrates of other bio-control agents.

The mechanism of antagonism was attributed to antibiosis in culture filtrates. Dennis and Webster (1971a and 1971b) reported the production of antibiosis by *Trichoderma* spp. *T. harzianum* excreted β-1, 3-gluconase and chitinase in culture filtrate which affected the cell wall (Elad et al., 1982, Elad et al., 1983, Ridout et al.,

1988). Claydon and Allan (1987) reported the production of Alkyloprones by *T. harzianum* in culture filtrate.

The inhibitory effect of *T. viride* on the teliospores germination can be attributed to the presence of antibiotics compounds like gliovirin, pyrones, peptabiols and others which have been described extensively (Vey et al., 2001). Besides, the production of a large variety of volatile secondary metabolites by *Trichoderma* like ethylene, hydrogen cyanide, alcohols, aldehydes, alamethicine and ketones up to C4 chain-length also play an important role in bio-control (Landreau et al., 2002).

Conclusions

Culture filtrate of *T. viride* (Ecoderma) resulted in maximum teliospores germination inhibition (93.15%) of *N. indica* and differed significantly from the culture filtrates of other bio-control agents.

Acknowledgements

I beseech the entire array of words of thanks given and reverence to fall in judiciously with their full expression to mark gratitude to my 'Reverent teacher' and renowned Associate Director of

Research Dr. Dhanbir Singh, Hill Agricultural Research and Extension Centre, Dhaulakuan, District-Sirmour (H.P.) for help in my research.

References

1. Anonymous (2011) Food Grains Production. *Chronicle* vol. xxii (2) pp. 90.
2. Claydon N. and Allan M. (1987) Antifungal Alkylpyrones of *Trichoderma harzianum*. *Transaction of British Mycological Society* 88: 503–513.
3. Dennis C. and Webster J. (1971a) Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* — I production of non-volatile antibiotics. *Transaction of British Mycological Society* 57: 25–39.
4. Dennis C. and Webster J. (1971b) Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* — II production of volatile antibiotics. *Transaction of British Mycological Society* 57: 41–48.
5. Elad Y., Chet I. and Heniz Y. (1982) Degradation of plant pathogenic fungi by *T. harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* 28: 719–725.
6. Elad Y., Chet I., Bayle P. and Heniz Y. (1983) Parasitism of *Trichoderma* spp. on *R. solani* and *Sclerotium rolfsii* — Scanning electron microscopy and Fluorescent microscopy. *Phytopathology* 73: 85–88.

7. Landreau A., Pouchus Y.F., Salenave-Namont C., Biard J.F., Boumard M.C., Robiou du P.T., Mondeguer F., Goulard C. and Verbist J.F. (2002) Combined use of LC/MS and a biological test for rapid identification of marine mycotoxins produced by *Trichoderma koningii*. *Journal of Microbiology Method* 48: 181–194.

8. Lari M. Carris, Lisa A. Castlebury and Goates Blair J. (2006) Non-systemic Bunt Fungi — *Tilletia indica* and *T. horrida*: A review of History, Systematics and Biology. *Annual Review of Phytopathology* 44: 113–133.

9. Mitra M. (1931) A new bunt on wheat in India. *Annals of Applied Biology* 18 (2): 178–179. pp. 311–346.

10. Ridout C.J., Caley-Smith J.R. and Lynch J.M. (1988) Fractionation of extracellular enzymes from mycoparasitic strain of *T. harzianum*. *Enzymes and Microbial Technology* 10: 180–187.

11. Vey A., Hoagland R.E. and Butt T.M. (2001) Toxic metabolites of fungal bio-control agents. *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*, Butt T.M., Jackson C. and Magan N., ed. 3rd, CAB International, Bristol.

12. Vincent J.H. (1947) Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors. *Nature* 159: 850.

НЕПАРНЫЙ ШЕЛКОПРЯД (*LYMANTRIA DISPAR*): ВЫДЕЛЕНИЕ ВНУТРИВИДОВЫХ КОМПЛЕКСОВ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИДЕНТИФИКАЦИИ АЗИАТСКОГО ПОДВИДА

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

Е.С. Мазурин, заместитель директора ФГБУ «ВНИИКР»

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

Введение

Непарный шелкопряд (*Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758)) — политипический транспалеарктический вид с вторичным ареалом на северо-востоке Северной Америки, относящийся к семейству волнянок (Lymantriidae) и являющийся одним из значимых филофагов в лесных экосистемах (рис. 1–2).

В.В. Внуковским (1926) на основе сборов из Алтая, Западных Саян, Амурского края и Приморья был описан подвид непарного шелкопряда¹, получивший название *Lymantria dispar asiatica* Vnukovskij, 1926. Для этого подвида характерны крупные размеры, особенно у самок (рис. 2), и светлый тон окраски: самцы со светлым, коричневато-серым тоном окраски и слабо выраженным рисунком крыльев, у самок рисунок сильно редуцирован, общий тон окраски светлый с желтовато-дымчатым оттенком. Как указывает Внуковский, все перечисленные признаки сближают данную форму с японской, *L. d. japonica* (Motschulsky, 1860). Однако существуют разные мнения о таксономическом статусе азиатского

подвида непарного шелкопряда (Schintlmeister, 2004; Pogue, Schaefer, 2007).

Высокая степень полифагии, способность самок к полету, короткая диапауза (Баранчиков, 1987; Баранчиков и др., 1994), наряду с фактами обнаружения кладок непарного шелкопряда на российских морских судах, прибывших в Северную Америку, и выявления летающих самок данного вида на территории Германии, послужили основой для включения азиатского подвида непарного шелкопряда в перечень карантинных вредных объектов для Российской Федерации в целях предотвращения распространения данного вида (Ижевский, 1992; Вредные организмы..., 2009). Указанные причины определили проведение многолетнего мониторинга видов рода *Lymantria* с помощью феромонных ловушек на территории Дальнего Востока в рамках международной программы (Магомедов, Фрейман, 2013).

В то же время существуют определенные трудности в идентификации азиатского подвида непарного шелкопряда. Настоящая работа посвящена обзору представлений о внутривидовой дифференциации непарного шелкопряда на основе классических методов и молекулярно-генетических подходов с возможностью их практического применения.

Морфологическая изменчивость и внутривидовые комплексы непарного шелкопряда

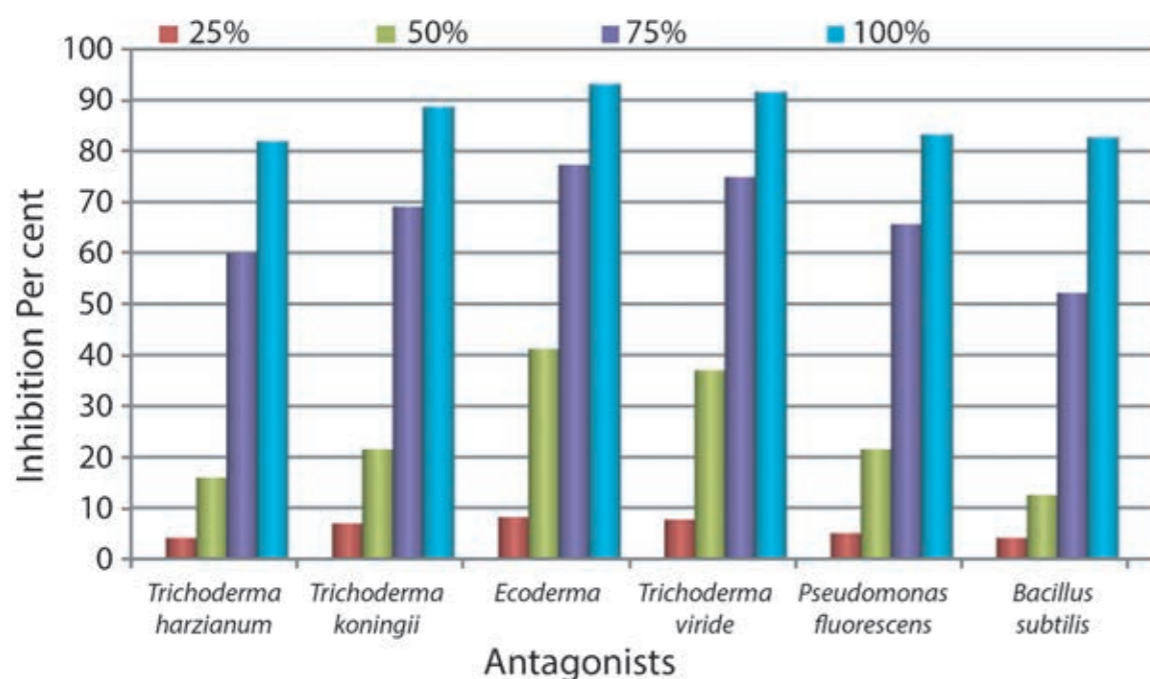
Виды с широким ареалом характеризуются высоким уровнем морфологической изменчивости, механизмы которой могут быть различными. Зачастую у данных видов сложно провести четкую дифференциацию внутривидовых группировок по внешним признакам.

Поскольку существуют разночтения в понимании используемых авторами внутривидовых единиц, то следует привести их общепринятые определения. В то же время следует отметить, что подобная неопределенность в критериях различения внутривидовых группировок связана с экологической пластичностью вида и происходящими микроэволюционными процессами.

Подвид — таксономическая категория, представляющая собой совокупность географически (реже экологически) обособленных популяций вида, в которых большинство особей отличаются одним или

Исследование изменчивости бабочек под воздействием разных факторов среды проводилось еще в середине XIX века.

Effect of culture filtrates of bio-control agents on teliospores germination inhibition of *N. indica*



¹ Автором в статье применяется термин «раса», тогда как предложенное латинское название — триномен для данной внутривидовой категории сопровождается сокращением «subsp. n.», что согласно МКЗН недвусмысленно указывает на описание именно подвида, а не другой внутривидовой категории.

несколькими (обычно морфологическими) признаками от особей остальных популяций того же вида (по Биология: БЭС, 2001). Это низшая таксономическая категория, к которой применяются требования Международного кодекса зоологической номенклатуры (МКЗН, 2004).

Форма — внутривидовая категория, в зоологической номенклатуре синоним вариетета, применяемая к любым подразделениям, связанным с изменчивостью (мутации, возрастные изменения окраски, географическая изменчивость). Согласно МКЗН, название «вариетета» или «формы», опубликованное после 1960 г., считается инфраподвидовым и не регулируется кодексом. К инфраподвидовым названиям относятся «varietas», «forma», «abberatio», «morpha» и их сокращения.

Термин «раса» используется также как внутривидовая межпопуляционная единица, не имеющая таксономического ранга. Выделяют географические, биологические, экологические расы (подробнее см. Майр, 1974).

Исследование изменчивости бабочек под воздействием разных факторов среды проводилось еще в середине XIX века. Краткий обзор наиболее важных работ приводится в монографии Т.Х. Моргана (Morgan, 1907). Для непарного шелкопряда изучались различия в рисунке и цвете крыльев под влиянием вида пищевого объекта (A. Pictet, по Morgan, 1907). Кормление гусениц листьями грецкого ореха приводило к заметному уменьшению размеров бабочек уже во втором поколении (рис. 3), окраска крыльев становилась светлее, рисунок крыльев самцов упрощался. Кроме того, изучалось влияние смены объектов питания (чередование листьев дуба, грецкого ореха и др. видов растений) в поколениях. Приведенные данные наглядно демонстрируют ограниченность применения исключительно морфологического подхода при разграничении подвидов или рас непарного шелкопряда, что неоднократно подчеркивает в своей работе Р. Гольдшмидт (Goldschmidt, 1940, 1960).

Разнообразным вопросам биологии непарного шелкопряда были посвящены многолетние исследования (1910–1940-е гг.) Рихарда Гольдш-

Российскими исследователями предложена собственная классификация географических форм непарного шелкопряда в пределах Северной Азии: западносибирская, среднеазиатская, восточносибирская и дальневосточная.

мидта, обобщенные им в монографии «The Material Basis of Evolution» (Goldschmidt, 1940, 1960). Им выделено две группы рас непарного шелкопряда, различающихся по окраске брюшка самок: «северная» с темно-коричневой окраской (Германия, Россия: Сибирь) и «южная» со светло-желтой окраской (Средиземноморская область, Средняя Азия, Дальний Восток, Япония), последние отличаются друг от друга по размерам. Наименьшими показателями характеризовались средиземноморские особи, наибольшими — японские, в то время как все остальные относились к среднему размерному классу. При этом отмечается, что такие факторы, как скорость развития и размер тела, не полностью коррелируют друг с другом, например, при одинаковых темпах развития южно-европейские бабочки непарного шелкопряда меньше таковых из северной Японии (рис. 4). Выделение половых рас непарного шелкопряда было основано на результатах скрещивания особей из разных популяций. Кроме того, выявлена связь между количеством линек у обоих полов и географическим положением популяций.

Р. Гольдшмидт на основании географического распространения популяций, количества линек у обоих полов, числа половых рас, продолжительности диапаузы, морфологических признаков (окраска гусениц и имаго) выделил 7 подвидов непар-

ного шелкопряда (приводится условная размерная группа, распространение):

dispar — мелкие, Северная Европа; *mediterranea* — мелкие, Южная Европа;

bocharae — мелкие, Средняя Азия; *hokkaidoensis* — мелкие, остров Хоккайдо, Япония;

japonica — крупные, большая часть Японии;

obscura — крупные, префектура Гифу, Япония;

chosenensis — крупные, иногда мелкие, Корея.

В. Рейнигом (Reinig, 1938, по Кожанчикову, 1950) предложена внутривидовая система непарного шелкопряда, в которой выделяют японский (*L. d. japonica*), амурский (*L. d. praeteria* Kardakoff, 1928), европейский (*L. d. dispar* (Linnaeus, 1758)) и иберийский (*L. d. andalusiaca* Reinig, 1938) подвиды. Первые два характеризуются крупными размерами, тогда как последняя форма относится к мелким формам. По мнению И.В. Кожанчикова (1950), достоверно могут быть выделены лишь две географические формы

Рис. 1. Бабочки непарного шелкопряда (фото Ю.А. Ловцовой), самец: Тюменская область (из колл. В.Л. Пономарева)

Fig. 1. An adult male of the gypsy moth (photo by Y.A. Lovtsova): Tyumen region (from the collection of V.L. Ponomarev)



Рис. 2. Бабочки непарного шелкопряда (фото Ю.А. Ловцовой), самки: сверху — Астраханская обл. (из колл. В.Л. Пономарева), снизу — Приморский край (сборы Т.Я. Фрейман, колл. ФГБУ «ВНИИКР»)

Fig. 2. Adult females of the gypsy moth (photo by Y.A. Lovtsova): top — Astrakhan region (from the collection of V. L. Ponomarev), bottom — Primorsky krai (collections of T.Y. Freiman, FGBU VNIICR collection)

непарного шелкопряда — крупные, темноокрашенные восточноазиатские и мелкие, более светлые формы, заселяющие территорию от Забайкалья до Атлантического океана.

В последние 15 лет вышли две крупные работы, посвященные роду *Lymantria*. В первой из них (Schintlmeister, 2004) были оставлены только два подвида *L. dispar*: *L. d. dispar* (Linnaeus, 1758) и *L. d. japonica* (Motschulsky, 1861). Первый включил в себя *L. d. asiatica* Vnukowskij, 1926, *L. d. praeteria*, *L. d. hokkaidoensis* Goldschmidt, 1940, *L. d. mediterranea* Goldschmidt, 1940, *L. d. bocharae* Goldschmidt, 1940, *L. d. chosenensis* Goldschmidt, 1940, *L. d. andalusiaca* Reinig, 1938 и др. Основанием для объединения этих подвидов в один, по мнению автора, служит способность особей непарного шелкопряда к активному расселению в пределах континента (приводится ссылка на работу по миграции бабочек из Средней Азии в Финляндию (Kaisila, 1962). Было отмечено, что размах крыльев у популяций европейско-

го подвида непарного шелкопряда имеет тенденцию к увеличению: по этому параметру популяции, обитающие на востоке Евразии, крупнее таковых, распространенных на западе Евразии. Выделенный Р. Гольдшмидтом *L. d. obscura* Goldschmidt, 1940 отнесен к *L. d. japonica*. При этом следует отметить, что голотипы ревидируемых подвидов в подавляющем большинстве случаев автором исследованы не были.

В другой монографии (Pogue, Schaefer, 2007), напротив, приводятся три подвида непарного шелкопряда: *L. d. dispar*, *L. d. japonica* и отдельно *L. d. asiatica*. Последний отличается от европейского подвида по окраске брюшка и крыльев и морфометрическим показателям (длина передних крыльев самца азиатского подвида — 23–28 мм (по измерениям 10 экз.), европейского — 14–22 мм; длина передних крыльев самок азиатского подвида — 28–41 мм, европейского — 20–30 мм). Указывается распространение азиатского подвида: Россия (на восток от Уральских

гор до Приморья), Монголия, 2/3 северного Китая, Гималаи и Корейский полуостров. Как и в предыдущей работе, экземпляры подвидов, по которым проводили их первописание, авторами изучены не были.

Российскими исследователями предложена собственная классификация географических форм непарного шелкопряда в пределах Северной Азии: западносибирская, среднеазиатская, восточносибирская и дальневосточная (Пономарев и др., 2012). Фактически такое деление основано на предпочитаемых кормовых растениях в различных климатических условиях. Для самок всех географических форм отмечается способность к полету, большей частью в пределах нескольких сотен метров для откладки яиц, но также и на большие расстояния. Авторы относят все указанные выше группировки к азиатскому подвиду непарного шелкопряда (Pogue, Schaefer, 2007). Здесь будет уместно отметить, что способность к полету самок непарного шелкопряда отмечается и для популяций из Германии, Прибалтики, Польши (Keena et al., 2008).

Таким образом, в настоящее время общепринятой внутривидовой системы непарного шелкопряда нет, что связано с высоким уровнем морфологического полиморфизма вида, существенный вклад в который, по-видимому, вносят факторы среды (модификационная изменчивость). В связи с этим представляется логичным исследовать генотипическую изменчивость непарного шелкопряда с помощью молекулярно-генетических методов для его возможной дифференциации на внутривидовые группировки.

Молекулярно-генетические исследования непарного шелкопряда

Одни из первых генетических исследований непарного шелкопряда были проведены Р. Гольдшмидтом 1910–1920-е гг. Выявлено, что исследованные им географические популяции имеют в гаплоидном наборе 31 хромосому, размеры которых различаются в зависимости от популяции непарного шелкопряда.

Молекулярно-генетические исследования непарного шелкопряда начинают активно проводиться в 1980-е гг. в США с помощью алло-

зимного анализа, исследования сайтов рестрикции митохондриальной ДНК, секвенирования и микросателлитного анализа (Harrison et al., 1983; Harrison, O'Dell, 1989; Bogdanowicz et al., 1993, 1997). Основной вывод этих работ заключается в том, что популяции непарного шелкопряда из США имеют происхождение от европейских популяций, а их низкое генетическое разнообразие обусловлено эффектом «бутылочного горлышка». Кроме того, были показаны различия по сайтам рестрикции между популяциями непарного шелкопряда из Франции, Китая и Японии.

В настоящее время существует несколько молекулярно-генетических подходов, позволяющих в той или иной степени проводить дифференциацию популяций непарного шелкопряда.

Одно из этих направлений базируется на полимеразной цепной реакции случайных амплифицируемых полиморфных фрагментов ДНК (RAPD). На основе этого метода была предложена методика дифференциации азиатской (генотип AA) и североамериканской (генотип NN) популяций с применением праймеров U22 (5'-TATGGTATAGSGGATG-GTGG-3') и L346(5'-ATTTGTTCT-GTTGTTTGRGG-3') на участок FS1 ядерного генома (Garner, Slavicek, 1996; Schreiber et al., 1997). Авторами выделены две группы популяций, а также формы, получившиеся в результате скрещивания двух географически удаленных популяций (генотип AN). Детекция продуктов ПЦР с приведенными выше праймерами позволяет отнести особь к той или иной популяции. Однако проведенные нами исследования говорят о неприменимости данной методики для дифференциации подвидов непарного шелкопряда (табл. 1). Это заключение подтверждается результатами других авторов (Keena et al., 2008). В частности, были получены данные о сравнительно высокой доле особей азиатской популяции в разных регионах Европы, что противоречит имеющимся сведениям по распространению азиатского подвида. В то же время следует отметить, что особи из Приморского края, откуда достоверно известен азиатский подвид непарного шелкопряда, были отнесены исключительно к азиатским популяциям. Из всех полученных

В настоящее время существует несколько молекулярно-генетических подходов, позволяющих в той или иной степени проводить дифференциацию популяций непарного шелкопряда.

ПЦР-продуктов нам удалось секвенировать лишь образцы из Приморского края.

Применение метода полиморфизма длин амплифицированных фрагментов ДНК (AFLP) позволило разграничить популяции непарного шелкопряда различного географического происхождения, однако без четкой дифференциации по подвидам (Reineke et al., 1999).

Микросателлитный анализ, или анализ простых повторяющихся повторов (SSR), достаточно часто используется в различных популяционных исследованиях. Четыре микросателлитных локуса ДНК четырех популяций непарного шелкопряда характеризуются высоким полиморфизмом (до 17 аллелей на locus), при этом уровень гетерозиготности ниже для североамериканских популяций, чем для азиатских (Bogdanowicz et al., 1997). Данный метод в определенной мере применим для различения североамериканских популяций от азиатских (Keena et al., 2008), однако его использование ограничивается высоким уровнем внутри- и межпопуляционной изменчивости (Koshio et al., 2002; Keena et al., 2008).

Исследования последовательностей фрагментов трех генов митохондриальной ДНК (цитохром-с-оксидаза I и II, субъединица I

НАДФ-дегидрогеназы) непарного шелкопряда из разных частей его ареала свидетельствуют о достаточно четкой дифференциации всех исследованных особей на три группы: европейско-североамериканскую, азиатскую и японскую (Bogdanowicz et al., 2000). В данной работе при помощи оригинальных праймеров было выделено 29 гаплотипов непарного шелкопряда. Отмечено низкое разнообразие гаплотипов у особей из Северной Америки (4 экз.). Среднее число замен в последовательностях исследуемого гена непарного шелкопряда из европейской и азиатской частей ареала, исключая Японию, было наименьшим.

Гаплотипы непарного шелкопряда по системе NB выделяют на основе сайтов рестрикции гена цитохром-с-оксидазы I (COI) митохондриальной ДНК: N+ маркирует нуклеотидную замену G в положении 1882 последовательности гена *Drosophila yakuba* Burla, 1954, различая таким образом североамериканскую и все остальные популяции; B+ соответствует нуклеотиду G в позиции 2145 и T в 2148, дифференцируя дальневосточные и японские популяции от всех других (Bogdanowicz et al., 1993, 2000).

В целом объем генома (C-value) непарного шелкопряда оценивает-

Таблица 1. Распределение генотипов непарного шелкопряда, выделенных на основе RAPD-PCR с помощью праймеров U22/L346 по различным регионам Палеарктики (оригинальные данные)

Регион	Процент особей,%			Всего, экз.
	Азиатские популяции (AA)	Европейские популяции (NN)	Гибридные популяции (AN)	
Европа (Испания, Франция, Чехия)	28,6	42,9	28,6	14
Калининградская обл.	60,0	12,0	28,0	25
Московская обл.	90,9	-	9,1	11
Забайкальский край	100,0	-	-	11
Приморский край	100,0	-	-	57
				118

Таблица 2. Краткая характеристика мест сбора непарного шелкопряда и объема исследуемого материала

Место сбора		Условное обозначение	Количество экз.
Страна	Регион, город		
Россия	Амурская обл.	LAO	8
	Забайкальский край	LZA	2
	Калининградская обл.	LKL	7
	Московская обл.	LMO	7
	Пензенская обл.	LPZ	3
	Пермская обл.	LPE	2
	Приморский край	LPR	23
	Республика Удмуртия	LUD	1
	Ростовская обл.	LRO	2
Сахалинская обл.	LSA	3	
Азербайджан		LAZ	1
Иран		LJ	8
Испания	Барселона	LEU013-014	2
Украина	Херсонская обл.	LU	1
Франция	Париж	LEU008-012	5
Чехия	Прага	LEU001-007	7
Греция	о. Тасос	LG	3
Всего			85

ся в 1,03 пг (Petitpierre, 1996), что соответствует примерно 1 млрд пар оснований. Митохондриальный геном данного вида полностью секвенирован. Он содержит 15569 пар оснований, из них 435 приходится на контрольную область, или d-петлю (Zhu et al., 2010). Эти исследования могут послужить основой для дальнейшего поиска молекулярно-генетических маркеров, позволяющих дифференцировать подвиговые группировки *Lymantria dispar*. Практическому применению данных о последовательностях фрагмента гена цитохром-с-оксидазы I в целях диагностики популяций непарного шелкопряда посвящена экспериментальная часть настоящей работы.

Материалы и методы

Сбор материала проводили ручным способом или с помощью феромонных ловушек типа «Дельта» (дельтовидных ловушек) производства ФГБУ «ВНИИКР (в большинстве мест сбора), ловушек коробчатого типа (Приморский край).

Всего было исследовано 85 особей непарного шелкопряда (*Lymantria dispar*) из 17 географических регио-

нов (табл. 2) и 12 особей шелкопряда-монашенки (*Lymantria monacha* (Linnaeus, 1758)) с территории Республики Удмуртия, Московской, Амурской, Пермской и Калининградской областей.

Молекулярно-генетические методы

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

Постановка ПЦР. Фрагменты митохондриального гена COI амплифицировали с праймерами, предложенными исследователями (Bogdanowicz et al., 2000): S1859 (5'-GGAACIGGATGAAC(A/T)GTTTA(C/T)CCICC-3') и A2191 (5'-CCCGGTAATAAATAATAA ACTTC-3'), в термоциклере VeritiTM (Applied Biosystems, США). Состав реакционной смеси: готовая смесь для ПЦР ScreenMix-HS (ЗАО «Евроген»). Условия ПЦР: денатурация

при 95 °С в течение 10 мин, затем 35 циклов, включающих 15 сек при 95 °С, отжиг праймеров 30 сек при 55 °С, элонгация — 90 сек при 72 °С; финальная элонгация при 72 °С.

Секвенирование осуществлялось по общепринятой методике на генетическом анализаторе Genetic Analyzer AB-3500 (Applied Biosystems, США). Первичное сравнение полученных последовательностей с базой данных ГенБанка проводилось с помощью 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». Парные генетические расстояния между последовательностями определены по двухпараметрической модели Кимуры. Построение дендрограмм проводили с использованием метода максимального правдоподобия (ML), реализованных в пакете программ MEGA 6.0. Устойчивость дендрограмм рассчитывали с помощью бутстреп-анализа («bootstrap») путем построения 1000 альтернативных деревьев, значения даны в процентах. Доступные в ГенБанке гомологичные исследуемым генам последовательности ДНК проанализированы вместе со вновь секвенированными последовательностями.

Результаты исследования

ПЦР с праймерами S1859/A2191 во всех случаях позволила получить одинаковый продукт — фрагмент участка гена примерно 380 п.о. (рис. 5). В дальнейшем полученные ампликоны были секвенированы (см. рис. 6). По последовательности нуклеотидов исследуемого фрагмента гена COI бабочки непарного шелкопряда хорошо отличаются от других видов рода *Lymantria* количеством нуклеотидных замен.

Исследуемый участок гена COI непарного шелкопряда содержит небольшое количество нуклеотидных замен у особей из разных частей ареала, т.е. достаточно консервативен. Сопоставление последовательностей данного фрагмента гена у особей в зависимости от их географического происхождения позволило выявить стабильные различия в нуклеотидном составе, которые могут трактоваться как популяционные (табл. 3). Две нуклеотидные замены



Рис. 3. Изменчивость окраски и размеров непарного шелкопряда в зависимости от вида пищи (из Pictet по Morgan, 1907): 1, 2 – самец и самка, выращенные на листьях дуба; 3, 4 – самец и самка первого поколения, выращенного на листьях грецкого ореха; 5, 6 – самец и самка второго поколения, выращенного на листьях грецкого ореха

Fig. 3. Food type-related variations in the gypsy moth color and size (from Pictet, according to Morgan, 1907): 1, 2 – male and female reared on oak leaves; 3, 4 – first generation male and female reared on walnut leaves; 5, 6 – second generation male and female reared on walnut leaves

выявлены для всех бабочек из Забайкальского, Амурского, Приморского краев и Сахалинской области: G в положении 2145 и C в положении 2160. Полученные данные согласуются с результатами американских исследователей (Bogdanowicz et al., 2000), а их сравнение с последовательностями базы данных ГенБанка позволяет заключить, что описываемая дальневосточная популяция относится к азиатскому подвиду непарного шелкопряда (*Lymantria*

dispar asiatica). Для иранской популяции бабочек непарного шелкопряда свойственны 4 нуклеотидные замены, три из которых отмечены для шелкопряда-монашенки, а одна для Приморской и Забайкальской популяций непарного шелкопряда.

Построение дендрограммы сходства (рис. 7) на основе изученных последовательностей исследуемого фрагмента гена COI методом максимального правдоподобия показало, что непарный шелкопряд хорошо дифференцируется от других видов рода *Lymantria*, при этом исследуемые особи вида подразделяются по

географическому принципу на три основные группировки: иранскую, дальневосточную (азиатскую) и европейскую (рис. 8). Данная дифференциация, за исключением ранее неизученных особей из иранской популяции (рис. 9), согласуется с результатами молекулярно-генетических исследований непарного шелкопряда (Waard et al., 2010).

Заключение

Непарный шелкопряд – вид, характеризующийся высоким уровнем морфологической изменчивости, что существенно затрудняет построение его внутривидовой системы и, как следствие, идентификацию подвидов классическими методами. Азиатский подвид, описанный В.В. Внуковским на основе морфологических признаков, из-за расселительной способности самок представляет интерес с точки зрения карантина растений. Поэтому требуется его надежная идентификация, которая может быть основана на молекулярно-генетических методах, рассматриваемых в настоящей работе. Одним из таких методов является исследование последовательностей фрагмента митохондриального генома непарного шелкопряда.

Авторы выражают благодарность за помощь в проведении данной работы сотрудникам лаборатории бактериологии и молекулярных методов: зав. лабораторией К.П. Корневу, м.н.с. И.М. Игнатевой, м.н.с. Н.А. Корниловой, за помощь в сборе материала – зав. лабораторией Приморского филиала ФГБУ «ВНИИКР» Т.Я. Фрейман, зав. лабораторией Ростовского филиала ФГБУ «ВНИИКР» Д.Г. Касаткину, м.н.с. отдела синтеза и применения феромонов Д.С. Тимофеевой, н.с. энтомологического музея Ю.А. Ловцовой, зав. лабораторией испытания и применения феромонов отдела синтеза и применения феромонов В.Л. Пономареву, м.н.с. лаборатории микологии Т.А. Суриной, с.н.с. научно-экспериментального отдела Ю.Ю. Кулаковой, сотрудникам Забайкальского филиала ФГБУ «ВНИИКР», сотрудникам ФГБУ «Калининградская МВЛ».

Литература

1. Баранчиков Ю.Н. Трофическая специализация чешуекрылых. Красноярск, 1987. 172 с.

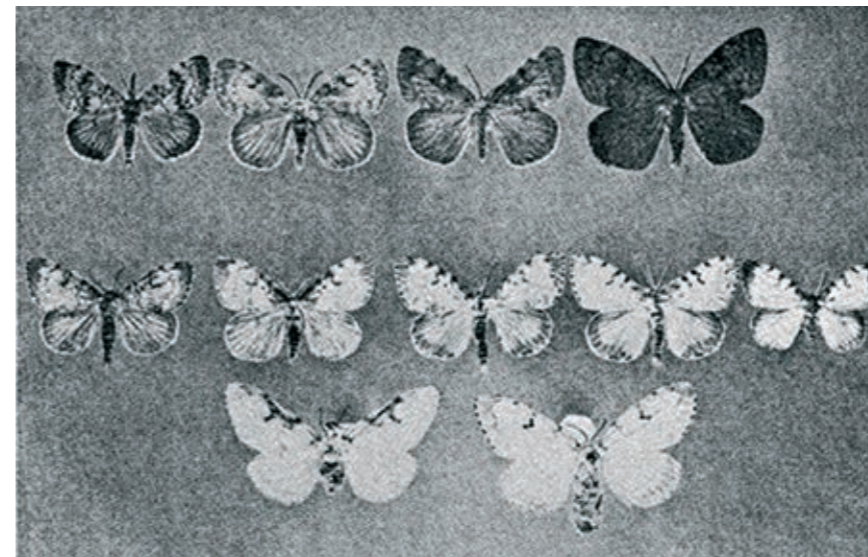


Рис. 4. Изменчивость в окраске крыльев бабочек непарного шелкопряда из разных частей Японии (Goldschmidt, 1960)

Fig. 4. Color variations in the gypsy moth originating from different parts of Japan (Goldschmidt, 1960)

2. Баранчиков Ю.Н., Вшивкова Т.А., Монгомери М.Е. Экспериментальное сравнение интенсивности роста и развития гусениц европейской, азиатской и американской популяции непарного шелкопряда. Красноярск, 1994. 24 с.

3. Биология: большой энциклопедический словарь / гл. ред. М.С. Гиляров. 3-е (репр.) изд. М.: Большая рос. энциклопедия, 2001. 863 с.

4. Внуковский В.В. Новые формы *Lymantria dispar* L. из Сибири и Семиречья // *Revue Russe d'Entom.* 1926. XX. P. 78–81.

5. Вредные организмы, имеющие карантинное фитосанитарное значение для Российской Федерации / Под ред. С.А. Данкверта, М.И. Маслова, У.Ш. Магомедова, Я.Б. Мордковича. Воронеж: Научная книга, 2009. 449 с.

6. Ижевский С.С. Новые проблемы со «старым» шелкопрядом // *Защита растений.* 1992. № 11. С. 37–39.

7. Кожанчиков И.В. Волнянки (Orgyidae) // Фауна СССР. Насекомые чешуекрылые. 1950. Т. XII. М.-Л.: Изд-во АН СССР. 583 с.

8. Магомедов У.Ш., Фрейман Т.Я. Международное сотрудничество по программе мониторинга лимантриид на Дальнем Востоке Российской Федерации // «Агробезопасность. Карантин растений. Наука и практика». 2013. № 3. С. 37–44.

9. Майр Э. Популяции, виды и эволюция. М.: Мир, 1974. 461 с.

10. Международный кодекс зоологической номенклатуры. М.: КМК, 2004. 223 с.

11. Пономарев В.И., Ильиных А.В., Гниненко Ю.И., Соколов Г.И., Андреева Е.М. Непарный шелкопряд в Зауралье и Западной Сибири. Екатеринбург: УрО РАН, 2012. 320 с.

12. Bogdanowicz S.M., Schaefer P.W., Harrison R.G. (2000) Mitochondrial DNA variation among worldwide populations of gypsy moths, *Lymantria dispar*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 487–495.

13. Bogdanowicz S.M., Wallner W.E., Bell J., Odell T.M., Harrison R.G. (1993) Asian gypsy moths (Lepidoptera: Lymantriidae) in North America: evidence from molecular data // *Annals of the Entomological Society of America*. Vol. 86. P. 710–715.

14. Bogdanowicz S.M., Mastro V.C., Prasher D.C., Harrison R.G. (1997) Microsatellite DNA variation among Asian and North American gypsy moths (Lepidoptera: Lymantriidae) // *Annals of the Entomological Society of America* 90: 768–775.

15. Clary D.O., Wolstenholme D.R. (1985) The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code // *Journal of Molecular Evolution*. Vol. 22. № 3. P. 252–271.

16. Garner K., Slavicek J.M. (1996) Identification and characterization of a RAPD-PCR marker for distinguishing Asian and North American gypsy moths // *Insect Molecular Biology*. Vol. 5. P. 81–91.

17. Goldschmidt R. (1960) The material basis of evolution. Pageant books, Inc., 436 p.

18. Goldschmidt R. (1940) The material basis of evolution. New Haven CT: Yale Univ. Press, 436 p.

19. Harrison R.G., O'Dell T.M. (1989) Mitochondrial DNA as a tracer of gypsy moth origins // *Proceedings, Lymantriidae: A Comparison of Features of New and Old World Tussock Moths*. P. 265–273.

20. Harrison R.G., Wintermeyer S.F., O'Dell T.M. (1983) Patterns of genetic variation within and among gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) populations // *Ann. Entomol. Soc. Am.* 76. P. 652–656.

21. Kaisila J. (1962) Immigration und Expansion der Lepidopteren in Finnland in der Jahren 1869–1960 // *Acta Entomologica Fennica*. Vol. 18. P. 1–452.

22. Keena M.A., Cote M.-J., Grinberg P.S., Wallner W.E. (2008) World distribution of female flight and genetic variation in *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) // *Environmental Entomology*. Vol. 37. P. 636–649.

23. Koshio C., Tomishima M., Shimizu K., Kim H.-S., Takenaka O. (2002) Microsatellites in the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) // *Applied Entomology and Zoology*. Vol. 37. P. 309–312.

24. Morgan T.H. (1907) *Experimental Zoology*. London. 454 p.

25. Petitpierre E. (1996) Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera // *International Journal of Insect Morphology & Embryology*. Vol. 25. P. 115–133.

26. Pogue M.G., Schaefer P.W. (2007) A review of selected species of *Lymantria* Hübner [1819] including three new species (Lepidoptera: Noctuidae: Lymantriinae) from subtropical and temperate regions of Asia, some potentially invasive to North America. *FHTET*, 221 p.

27. Reineke A., Zebitz C.W. (1999) Suitability of polymerase chain reaction-based approaches for identification of different gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) genotypes in central Europe // *Annals of the Entomological Society of America*. Vol. 92. P. 737–741.

28. Reinig W.F. Die genetisch-chorologischen Grundlagen der gerichteten geographischen Variabilität // *Deutsche Ges. F. Vererb.* P. 260–308.

29. Schintlmeister A. (2004) The Taxonomy of the genus *Lymantria* Hübner

[1819] (Lepidoptera: Lymantriidae) // *Quadrifina*. V. 7. P. 1–248.

30. Waard de J.R., Mitchell A., Keena M.A., Gopurenko D., Boykin L.M., Armstrong K.F., Pogue M.G., Lima J.,

Floyd R., Hanner R.H., Humble L.M. (2010) Towards a global barcode library for *Lymantria* (Lepidoptera: Lymantriidae) tussock moths of biosecurity concern // *PLoS ONE*. Vol. 5. № 12. P. 1–10.

31. Zhu Y.J., Zhou G.L., Fang R., Ye J., Yi J.P. (2010) The complete sequence determination and analysis of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) mitochondrial genome // *Plant Quarantine*. Vol. 4. P. 6–11.

DISTINGUISHING BETWEEN the Gypsy Moth (*Lymantria dispar*) Intraspecific Groups and Molecular Genetic Approaches to the Identification of the Asian Subspecies

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

Evgeny S. Mazurin, FGBU VNIKR's Deputy Director

Andrey V. Shipulin, Junior Researcher of FGBU VNIKR's

Research and Testing Department

Introduction

The gypsy moth (*Lymantria dispar* (Linnaeus, 1758)) is a polytypic trans-paleartic moth species in the family Lymantriidae. Its secondary native range lies in the northeastern part of North America. This species is one of the major phylophages in forest ecosystems (Fig. 1–2).

V.V. Vnukovskij (1926) described a subspecies¹ of the gypsy moth named *Lymantria dispar asiatica* Vnukovskij, 1926, based on the collections from Altai, Western Sayan, Amur region and Primorsky Krai. The subspecies is characterized by a large size, especially in females (Fig. 2), and light color: males are light brownish-grey with feebly marked wing pattern; females are light with yellowish smoky hue and significantly reduced wing pattern. Accord-

¹The author uses the term "race". Meanwhile, while the proposed Latin name for this intraspecific rank — trinomen — is followed by an abbreviation "subsp. n." which, according to ICZN, unambiguously indicates the description of a subspecies rather than other intraspecific rank.

ing to Vnukovskij, this form is similar to the Japanese form of the species, *L.d. japonica* (Motschulsky, 1860), in terms of all the above-mentioned characteristics. However, opinions differ regarding the taxonomic status of the Asian subspecies of the gypsy moth (Schintlmeister, 2004; Pogue, Schaefer, 2007).

Taking into account the high degree of polyphagia, flight ability of females, short diapause (Baranchikov, 1987; Baranchikov et al., 1994), as well as interceptions of egg masses of the gypsy moth on Russian sea vessels coming to North America, and detection of flying females in Germany, the Asian subspecies of the gypsy moth was added to the list of pests quarantine for the Russian Federation with the view to prevent its spread (Izhevsky, 1992; Harmful pests..., 2009). These reasons determined the necessity of a long-term monitoring of the genus *Lymantria* in the Far East using pheromone traps. The monitoring was conducted within the framework of the International Co-operative Program (Magomedov, Freeman, 2013).

However, the identification of the Asian subspecies of the gypsy moth is difficult. The present paper reviews the opinions on the intraspecific differentiation of the gypsy moth using conventional methods and molecular genetic approaches, as well as their practical application.

Morphological variability and intraspecific groups of the gypsy moth

Species with a wide native range are characterized by the high level of morphological variability that may be generated by various mechanisms. Intraspecific groups within such species are often difficult to clearly differentiate by their external morphological features.

Since there is inconsistency in interpretation of the intraspecific units used by various authors, it is necessary to give their generally accepted definitions. However, it is worth mentioning that the uncertainty of criteria used to differentiate between intraspecific

groups is due to phenotypic plasticity of species and ongoing microevolutionary processes.

A subspecies is a taxonomic rank of a geographically (more rarely, ecologically) isolated set of populations of a species. The majority of individuals in a subspecies population differ from those of other populations of the same species by one or more (usually morphological) characteristics (Biology:

The effect of dietary changes was investigated in the course of several generations.

Encyclopedic Unabridged Dictionary, 2001). A subspecies is the lowest taxonomic rank subject to the rules of the International Code of Zoological Nomenclature (ICZN, 2004).

A form is an intraspecific rank. In the zoological nomenclature, this term is interchangeably used with the term 'variety'. A form is used for any variation-based subdivisions (mutation, age-related changes in coloration, geographic variations). In compliance with the International Code of Zoological Nomenclature, all references to variety and form published after 1960 should be considered infrasubspecific and not regulated by the Code. These include 'varietas', 'forma', 'abberatio', 'morph' and their abbreviated forms.

Studies on the variability of moths driven by various environmental factors were performed as early as mid-nineteenth century. T.H. Morgan provided a brief overview of the most important works in his monograph (Morgan, 1907). The effect of food type on the wing pattern and color of the gypsy

moth was studied (A. Pictet, according to Morgan, 1907). Feeding larvae with walnut leaves leads to significantly reduced size, lighter wing coloration, and simplification of male wing pattern as early as the second generation (Fig. 3). Moreover, the effect of dietary changes was investigated in the course of several generations (alternating oak and walnut leaves as well as various parts of certain other plants). The data provided clearly shows that the use of only morphology-based approach to the differentiation between the gypsy moth subspecies or races has its limitations. This was repeatedly indicated by R. Goldschmidt (Goldschmidt, 1940, 1960).

Richard Goldschmidt performed a study of various aspects of the gypsy moth biology over several years (1910–1940). The results were presented in his monograph "The Material Basis of Evolution" (Goldschmidt, 1940, 1960). The author distinguished two groups of races of the gypsy moth based on the color of the abdominal wool of females: all northern forms had dark-brown wool (from Germany, Russian Siberia), and all southern forms (Mediterranean, Central Asian, Far Eastern, Japanese) had light yellow wool. The Mediterranean forms were the smallest while the Japanese forms were the largest. The rest were described as medium-sized. However, it was observed that the body size and rate of development were not completely correlated. For instance, southern European and Japanese forms had the same rate of development, but the former were smaller than the latter (Fig. 4). The sex races of the gypsy moth were distinguished based on the results of crossing between different populations. Moreover, the correlation

between the number of molts in both sexes and the geographic location of populations was observed.

Based on the geographic distribution of populations, number of molts in both sexes, number of sex races, diapause duration and morphological traits (the color of larvae and imago), Goldschmidt recognized seven subspecies of the gypsy moth (size groups and distribution are given):

dispar — small; Northern Europe;
mediterranea — very small; Southern Europe;
bocharae — small; Central Asia;
hokkaidoensis — small; Island of Hokkaido, Japan;
japonica — large; most of Japan;
obscura — very large; Gifu region, Japan;
chosenensis — large, sometimes small; Korea.

V. Reinig (Reinig, 1938 according to Kozhanchikov, 1950) proposed a system of the gypsy moth subspecies comprised of the Japanese (*L. d. japonica*), Amur (*L. d. praeterita* Kardakoff, 1928), European (*L. d. dispar* (Linnaeus, 1758)) and Iberian (*L. d. andalusiaca* Reinig, 1938) subspecies. The first two subspecies are large while the latter belongs to the medium-sized form. According to I.V. Kozhanchikov (1950), only two geographic forms could be reliably distinguished: the large dark-colored East Asian form and small lighter-colored form occurring in the area from Trans-Baikal to the Atlantic Ocean.

Two comprehensive studies on the genus *Lymantria* have been performed over the past fifteen years. The first study (Schintlmeister, 2004) only recognized two subspecies of *L. dispar*: *L. d. dispar* (Linnaeus, 1758) and *L. d. japonica* (Motschulsky, 1861). Thus, *L. d. dispar* comprised *L. d. asiatica* Vnukovskij, 1926, *L. d. praeterita*, *L. d. hokkaidoensis* Goldschmidt, 1940,

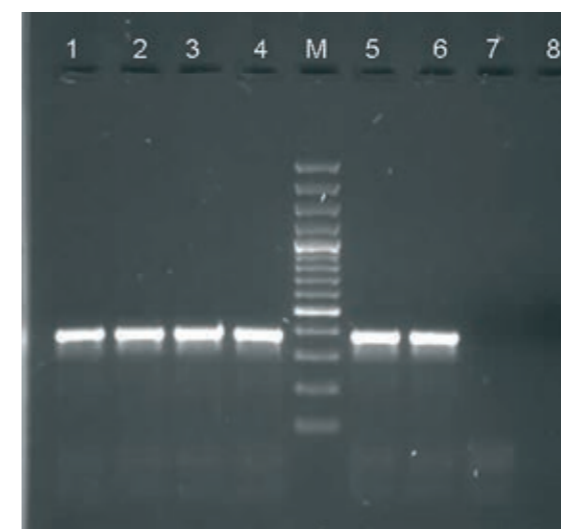


Fig. 5. Electrophoretogram of conventional PCR amplification products: 1–3 — specimens from Primorsky Krai (LPR004-006), 4–6 — specimens from France (LEU010-012), 7 — DNA extraction control, 8 — amplification control, M — molecular weight marker

Рис. 5. Электрофорезграмма продуктов амплификации «классической» ПЦР: 1–3 — образцы из Приморского края (LPR004-006), 4–6 — образцы из Франции (LEU010-012), 7 — контроль при выделении ДНК, 8 — контроль при постановке амплификации, M — маркер молекулярного веса

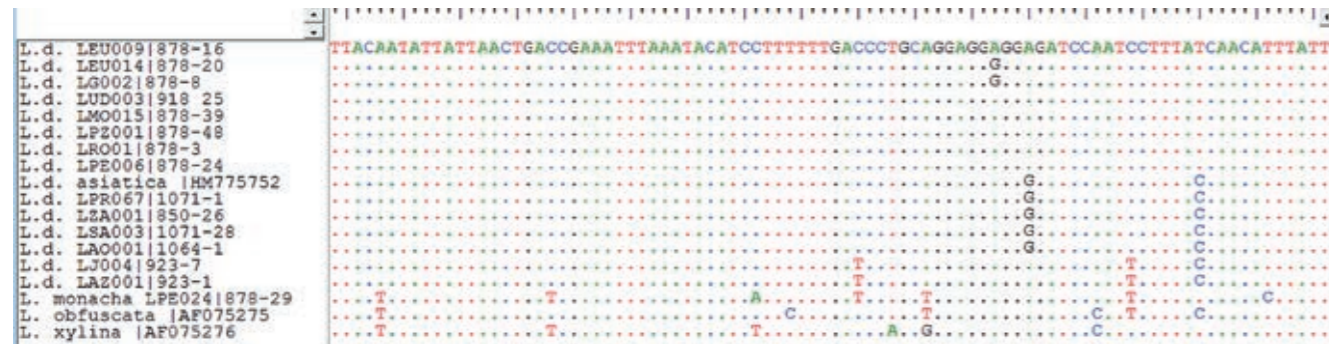


Fig. 6. Sequences of the COI gene fragment, corresponding to 2083-2171 region in the mitochondrial DNA of *Drosophila yakuba* (Clary, Wolstenholme, 1985), for the investigated individuals of the gypsy moth (*L. d.*) from different geographic locations and some other species of the genus *Lymantria*. Dots represent the identity of nucleotides in the sequences. Names of collection sites are given in Table 2. GeneBank numbers are given for reference sequences of *L. d. asiatica*, *L. monacha*, *L. obfuscatum*

Рис. 6. Последовательности фрагмента гена COI, соответствующего участку 2083-2171 в митохондриальном геноме *Drosophila yakuba* (Clary, Wolstenholme, 1985), для изученных особей непарного шелкопряда (*L. d.*) из разных географических точек и для некоторых видов рода *Lymantria*. Точками показана идентичность нуклеотидов в последовательностях. Расшифровка мест сбора приводится в табл. 2. Для референсных последовательностей *L. d. asiatica*, *L. monacha*, *L. obfuscatum* даны номера базы данных ГенБанка

L. d. mediterranea Goldschmidt, 1940, *L. d. bocharae* Goldschmidt, 1940, *L. d. chosonenis* Goldschmidt, 1940, *L. d. andalusiaca* Reinig, 1938, etc. According to the author, these subspecies are treated as one due to the ability of the gypsy moth to rapidly disperse within a continent (the reference is given to the work on the moth migration from Central Asia to Finland (Kaisila, 1962)). It has been observed that in the European subspecies the wingspan range tends to be larger in populations occurring in the east of Eurasia than those occurring in the west of Eurasia. The subspecies distinguished by Goldschmidt — *L. d. obscura* Goldschmidt 1940 — was

identified as belonging to *L. d. japonica*. However, it is worth mentioning that the author did not study the majority of holotypes of the species reviewed by Schintlmeister.

Meanwhile, another study (Pogue, Schaefer, 2007) described three subspecies of the gypsy moth — *L. d. dispar*, *L. d. japonica* and *L. d. asiatica* — the latter being treated as an individual subspecies. It differs from the European subspecies in the color of abdomen and morphometric measurements (the length of male forewings in the Asian subspecies is 23–28 mm (based on measurements of 10 specimens), in the European subspecies — 14–22 mm; the

length of female forewings in the Asian subspecies is 28–41 mm, in the European subspecies — 20–30 mm. The distribution of the Asian subspecies is given as follows: Russia — from east of the Urals to Primorsky krai; Mongolia, 2/3 of northern China, the Himalayas and the Korean Peninsula. As in the previous work, the specimens of the subspecies used in the first description of the subspecies were not studied by Pogue and Schaefer.

Russian scientists proposed their own classification of the geographic forms of the gypsy moth occurring in North Asia: West Siberian, Central Asian, East Siberian and Far Eastern (Ponomarev et al., 2012).

This division is virtually based on the host plant preferences of the pest under different climatic conditions. Females of all geographic forms were observed to be able to fly in search of sites suitable for laying eggs, often within a few hundred meters but also over longer distances. The authors identify all the above mentioned groups as belonging to the Asian subspecies of the gypsy moth (Pogue, Schaefer, 2007). It is pertinent to note that the flight ability of females was also observed in the gypsy moth populations from Germany, the Baltic States and Poland (Keena et al., 2008).

Thus, currently there is no universally accepted system of the gypsy moth subspecies due to the high level of morphological polymorphism of the species which is apparently significantly influenced by environmental factors (phenotypic plasticity). Consequently, it only seems logical to study the genotypic variation within the gypsy moth using molecular genetic methods with a view to differentiate between the subspecies.

Molecular-genetic analysis of the gypsy moth

Richard Goldschmidt was among the first to perform genetic analysis in 1910–1920s. The analyzed geograph-

ic populations were observed to have a haploid set of 31 chromosomes. The size of the chromosomes differed in different gypsy moth populations.

In 1980s, molecular-genetic analysis of the gypsy moth using allozyme analysis, analysis of mtDNA restriction site, sequencing and microsatellite analysis became increasingly popular (Harrison et al., 1983; Harrison, O'Dell, 1989; Bogdanowicz et al., 1993, 1997).

Russian scientists proposed their own classification of the geographic forms of the gypsy moth occurring in North Asia: West Siberian, Central Asian, East Siberian and Far Eastern.

The main conclusion in these studies is that the gypsy moth populations occurring in the United States originate from the European populations, and the low genetic diversity is due to the “bottleneck” effect. Moreover, differences in restriction sites among the gypsy moth populations from France, China and Japan were demonstrated.

Currently, there are several molecular genetic approaches that, to a varying degree, allow for differentiating between populations of the gypsy moth.

One of these approaches is based on amplification of random polymorphic DNA fragments by polymerase chain reaction (RAPD-PCR). A modified version of this method was proposed for differentiation between Asian (AA genotype) and North American (NN

genotype) populations using primers U22 (5'-TATGGTATAGSGGATGGTGG-3') and L346 (5'-ATTGTTCTGTTGTTTGRGG-3') for diagnostic fragments (designated as the FS1 marker) of the nuclear DNA (Garner, Slavicek, 1996; Schreiber et al., 1997). The authors distinguished between two groups of populations as well as cross forms resulting from the cross breeding

of two geographically distant populations (AN genotype). Detection of PCR products using the above mentioned primers allows identifying a moth as belonging to a particular population. However, our results show inapplicability of this approach for the subspecies differentiation (Table 1). Our conclusion is also confirmed by other authors (Keena et al., 2008). Specifically, data was obtained on the presence of a relatively large number of moths belonging to the Asian population in various European regions which contradicts the data on current distribution of the Asian subspecies. It is also worth mentioning that moths from the Primorsky krai where the Asian subspecies is known to occur were identified as belonging only to the Asian population. Only the PCR-products from the specimens originating from the Primorsky Krai could be successfully sequenced.

Application of the amplified fragment length polymorphism (AFLP) allowed for differentiating between populations of the gypsy moth of different geographic origins but with no clear differentiation of the subspecies (Reineke et al., 1999).

Microsatellite analysis also known as simple sequence repeats (SSRs) is often used for various population studies. Four microsatellite DNA loci of four populations of the gypsy moth are characterized by high polymorphism (up to 17 alleles per locus), while the heterozygosity is lower in North American populations than in Asian ones (Bogdanowicz et al., 1997).

To a certain extent, this method is applicable for distinguishing between the North American and Asian populations (Keena et al., 2008), but its use is limited due to high levels of intra- and inter-population variability (Koshio et al., 2002; Keena et al., 2008).

Studying the fragment sequences of three mitochondrial DNA genes (cytochrome *c* oxidase subunits I and II, NADH dehydrogenase subunit 1) of the gypsy moth from different parts of its native range demonstrates a rather clear division of all analyzed specimens into three groups: the European-North American, Asian and Japanese (Bogdanowicz et al., 2000).

In this paper twenty nine haplotypes of gypsy moth were isolated using original primers. Very low haplotype variation was observed in the North American specimens (4 specimens).

Table 2. Brief description of the gypsy moth collection sites and the amount of analyzed material

Collection site		Reference characters	Number of specimens
Country	Region, city (town)		
Russia	Amur region	LAO	8
	Trans-Baikal krai	LZA	2
	Kaliningrad region	LKL	7
	Moscow region	LMO	7
	Penza region	LPZ	3
	Perm region	LPE	2
	Primorsky krai	LPR	23
	Republic of Udmurtia	LUD	1
	Rostov region	LRO	2
	Sakhalin region	LSA	3
Azerbaijan		LAZ	1
Iran		LJ	8
Spain	Barcelona	LEU013-014	2
Ukraine	Kherson oblast	LU	1
France	Paris	LEU008-012	5
Czech Republic	Prague	LEU001-007	7
Greece	Thasos island	LG	3
Total			85

The average number of substitutions in the sequences of the analyzed gene of the gypsy moth from the European and Asian parts of its native range, except for Japan, was the lowest.

According to the NB system, the haplotypes are distinguished based on the restriction sites of the cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) gene of the mitochondrial DNA: N+ marks G substitution at position 1882 of the gene sequence of *Drosophila yakuba* Burla, 1954 thus distinguishing the North-American population from the rest; B+ corresponds to G nucleotide at position 2145 and T at 2148 differentiating the Far Eastern and Japanese populations from the rest (Bogdanowicz et al., 1993, 2000).

Generally, the amount of DNA (C-value) of the gypsy moth is estimated to be 1.03 picograms (Petitpierre, 1996) which corresponds to about 1 billion bp. The mitochondrial DNA of this species was fully sequenced. It contains 15569 bp, 435 of which occur in the control area or d-loop (Zhu et al., 2010).

These studies could lay foundation for further search of molecular genetic markers that would allow for differentiating between the subspecies groups of *Lymantria dispar*. The experimental part of this paper is devoted to the practical use of the data on the sequences of cytochrome *c* oxidase subunit I gene fragment for identification of gypsy moth populations.

Materials and methods

The material was collected either manually or by pheromone trapping using Delta traps of FGBU VNIKR production (on most collection sites) and box-type traps (the Primorsky krai).

A total of 85 specimens of the gypsy moth (*Lymantria dispar*) from 17 geographic regions (Table 2) and 12 individuals of the nun moth (*Lymantria monacha* (Linnaeus, 1758)) from the Republic of Udmurtia, Moscow, Amur, Perm and Kaliningrad regions were studied.

Molecular genetic methods

The extraction of DNA from the material under study (heads and legs of the moths) was performed by treating the specimens with Proteinase K followed by removal of proteins with no extraction with organic solvents.

A DNA-Ekstran-2 set № NG-511-100 (Synthol, Moscow) was used.

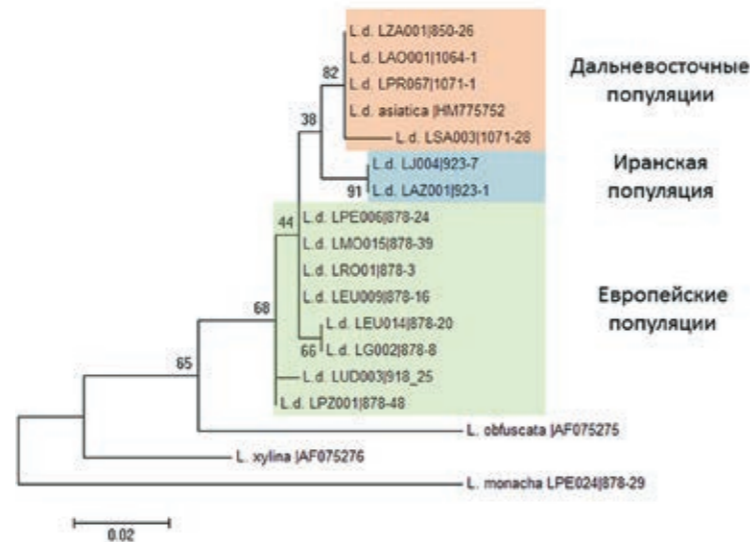


Fig. 7. Tree diagram for sequence similarity of the COI gene of the gypsy moth built using the maximum likelihood method. Reliability evaluated via Bootstrap Test (500 alternative trees) is given in per cent above the branches

Рис. 7. Дендрограмма сходства последовательностей гена COI ДНК непарного шелкопряда, построенная с помощью метода максимального правдоподобия. Устойчивость, определенная бутстреп-анализом (500 альтернативных дендрограмм), дана в процентах над ветвями

PCR

Fragments of the mitochondrial COI gene were amplified using primers proposed by Bogdanowicz et al. (Bogdanowicz et al., 2000): S1859 (5'-GGAACIG-GATGAAC(A/T)GTTTA(C/T)CCICC-3') and A2191 (5'-CCCGG-TAAAATTTAAATATAACTTC-3'), in a Veriti™ thermocycler (Applied Biosystems, USA). The reaction mixture was as follows: ready-to-use PCR mixture ScreenMix-HS (Evrogen, Russia). PCR conditions: denaturation at 95 °C for 10 min. followed by 35 cycles, including 15 sec. at 95 °C; primer annealing for 30 sec. at 55 °C; elongation for 90 sec. at 72 °C; final elongation at 72 °C.

Sequencing was performed following the generally-accepted protocol

using Genetic Analyzer AB-3500 (Applied Biosystems, USA). Initial comparison of the resulting sequences with the GeneBank genetic sequence database was conducted via NCBI BLAST web site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). The sequence checking, alignment and editing was conducted using BioEdit v.7.0.5.3, sequence alignment editor. Pairwise genetic distances between the sequences were identified by Kimura's two parameter model. The tree diagrams were built using the maximum likelihood method (ML method) available in MEGA 6.0 software. The reliability of the diagrams was analyzed via Bootstrap Test by building 1000 alternative trees. The results are given in percentage values. The DNA sequences

Table 3. Description of diagnostically significant base pair substitutions in geographic populations of the gypsy moth

Geographic location of the population	Number of specimens	Position of a base pair in the COI gene				
		2130	2145	2154	2160	2191
Iran, Azerbaijan	9	T	A	T	C	T
Primorsky krai Trans-Baikal krai Amur region Sakhalin region	36	C	G	C	C	C
Spain, France, Czech Republic, Ukraine, Greece, the European part of Russia	40	C	A	C	T	C

Currently, there are several molecular genetic approaches that, to a varying degree, allow for differentiating between populations of the gypsy moth.

available in the GeneBank homologous to those tested were analyzed along with the newly sequenced ones.

Results

PCR using primers S1859/A2191 in all cases allowed obtaining one and the same product — a fragment of the gene site of about 380 bp (Fig. 5). Then, the resulting amplicons were sequenced (Fig. 6). The gypsy moth adults are clearly distinguishable from those of other *Lymantria* species by the number of base pair substitutions in the nucleotide sequences.

The analyzed fragment of the COI gene of the gypsy moth shows a small rate of base pair substitutions in moths originating from different parts of the native range, i.e. it is quite conserved. The comparison of the sequences in this gene fragment of moths revealed

stable differences in the base composition. These differences could be interpreted as population specific (Table 3). Substitution of two base pairs was revealed in moths from Trans-Baikal, Amur and Primorsky krajs as well as Sakhalin region: G at position 2145 and C at position 2160. These results are in conformity with the results obtained by the American researcher (Bogdanowicz et al., 2000), and their comparison with the sequences available in the GeneBank carry inference that the described Far Eastern population belongs to the Asian subspecies of the gypsy moth (*Lymantria dispar asiatica*). The Iranian population of the gypsy moth is characterized by the substitution of four base pairs three of which were observed in the nun moth and one — in the Primorsky and Trans-Baikal populations of the gypsy moth.

Building the tree diagram for sequence similarity (Fig. 7) based on the analyzed sequences of the COI gene fragment using the maximum likelihood method (ML method) demonstrated that the gypsy moth could be easily distinguished from other *Lym-*

ntria species. Therewith, the analyzed gypsy moths fall within three main groups based on their geographic location: Iranian, Far Eastern (Asian) and European (Fig. 8). This division, except for the previously uninvestigated moths from the Iranian population (Fig. 9), are in conformity with the results of the molecular genetic analysis of the gypsy moth (Waard et al., 2010).

Conclusion

The gypsy moth is a species characterized by the high level of morphological variability which complicates the development of its intraspecific system and, as a consequence, identification of its subspecies using conventional methods. The Asian subspecies described by V.V. Vnukovskij based on the morphological characteristics is of quarantine concern due to the distribution ability of its females. Therefore, a reliable identification method is required which could be based on molecular genetic approaches that are discussed in this paper. One of such methods is the analysis of the fragment sequences of the gypsy moth mitochondrial DNA.

Acknowledgements

The authors express gratitude to the employees of the Bacteriology and Molecular Methods Laboratory for their assistance in collecting the material: K.P. Kornev, head of Laboratory, I.M. Ignatyeva, junior researcher, N.A. Kornilova, junior research; and to T.Ya. Freiman, head of Laboratory of FGBU VNIKR's Primorye Branch; D.G. Kasatkin, head of Laboratory of FGBU VNIKR's Rostov Branch; D.S. Timofeeva, junior researcher of the Pheromone Synthesis and Use Department, Y.A. Lovtsova, researcher of the Entomological Museum, V.L. Ponomarev, head of the Pheromone Synthesis and Use Laboratory of the Pheromone Synthesis and Use Department; T.A. Surina, junior researcher of the Mycology Laboratory, Y.Y. Kulakova, senior researcher of the Research and Testing Department; employees of FGBU VNIKR's Trans-Baikal Branch and Kaliningrad Interregional Veterinary Laboratory.

References

1. U.N. Baranchikov. (1987) Nutritional Preferences of Lepidopterous Insects. Krasnoyarsk, P. 172.

Fig. 8. Map of the gypsy moth native range (according to Kozhanchikov, 1950) compared with the results of the molecular genetic analysis of the fragment sequences of the COI gene (original data). Figures represent subspecies distinguished by V. Reinig (Reinig, 1938, Kozhanchikov, 1950): 1. Japanese (*L. d. japonica*), 2. Amur (*L. d. fumida* (=praeteria)), 3. European (*L. d. dispar*), 4. Iberian (*L. d. bordigalensis* (=andalusiaca)) subspecies. Colored circles represent populations distinguished via molecular genetic analysis: green — European, blue — Iranian, red — Far Eastern

Рис. 8. Карта ареала непарного шелкопряда (по Кожанчикову, 1950), сопоставленная с результатами молекулярно-генетического исследования последовательностей фрагмента гена COI (ориг. данные). Цифрами на карте обозначены подвиды, выделенные В. Рейнигом (Reinig, 1938, Кожанчиков, 1950): 1. японский (*L. d. japonica*), 2. амурский (*L. d. fumida* (=praeteria)), 3. европейский (*L. d. dispar*), 4. иберийский (*L. d. bordigalensis* (=andalusiaca)) подвиды. Цветными кружочками обозначены выделенные по молекулярно-генетическим методам популяции: зеленый — европейская, синий — иранская, красный — дальневосточная

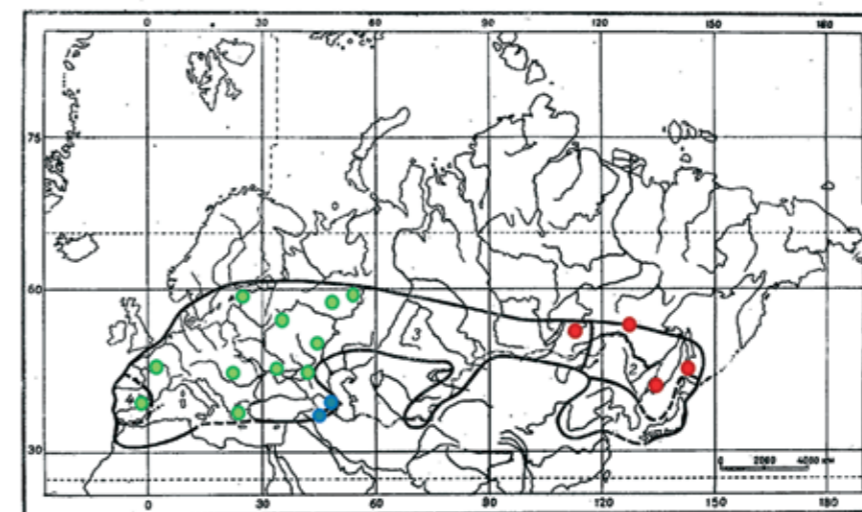




Fig. 9. External view of a gypsy moth male of the Iranian population (collections of D.G. Kasatkin, FGBU VNIKR collection, photo by Y.A. Lovtsova)

Рис. 9. Внешний вид самца непарного шелкопряда иранской популяции (сборы Д.Г. Касаткина, колл. ФГБУ «ВНИИКР», фото Ю.А. Ловтцовой)

2. U.N. Baranchikov, T.A. Vshivkova, M.E. Montgomery (1994) Experimental comparison of the growth rate and development of the larvae of European, Asian and American populations of the gypsy moth. Krasnoyarsk, P. 24.

3. Biology: Encyclopedic Unabridged Dictionary (2001) / Editor-in-chief. M.S. Gilyarov. Third edition. M.: Russia Unabridged Encyclopedia, P. 863.

4. V.V. Vnukovskij (1926) New forms of *Lymantria dispar* L. from Siberia and Zhetysu // Revue Russe d'Entom. XX. P. 78–81.

5. Pests of quarantine concern for the Russian Federation (2009) / Edited by S.A. Dankvert, M.I. Maslov, U.S. Magomedov, Y.B. Mordkovich. Voronezh: Nauchnaya Kniga, P. 449.

6. S.S. Izhevsky (1992) Emerging concerns related to the "old" gypsy moth // Plant Protection. № 11. P. 37–39.

7. I.V. Kozhanchikov (1950) Orgyidae // Fauna of the USSR. Lepidopterous Insects. T. XII. M.-L.: AN USSR Publishing House. P. 583.

8. U.S. Magomedov, T.Y. Freiman (2013) International Cooperative Program on Lymantriidae Monitoring in the Far East of the Russian Federation // Agrobepozanost. Plant Quarantine: Research and Practice. № 3. C. 37–44.

9. E. Mayr (1974) Populations, species and evolution. M.: Mir, P. 461.

10. International Code of Zoological Nomenclature. M.: KMK, 2004. P. 223.

11. V.L. Ponomarev, A.V. Ilinikh, M.U. Gninenko, G.I. Sokolov, E.M. Andreeva (2012) The gypsy moth in Trans-Urals and Western Siberia. Yekaterinburg: Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, P. 320 c.

12. Bogdanowicz S.M., Schaefer P.W., Harrison R.G. (2000) Mitochondrial DNA variation among worldwide populations of gypsy moths, *Lymantria dispar*. Molecular Phylogenetics and Evolution 15: 487–495.

13. Bogdanowicz S.M., Wallner W.E., Bell J., Odell T.M., Harrison R.G. (1993) Asian gypsy moths (Lepidoptera: Lymantriidae) in North America: evidence from molecular data // Annals of the Entomological Society of America. Vol. 86. P. 710–715.

14. Bogdanowicz S.M., Mastro V.C., Prasher D.C., Harrison R.G. (1997) Microsatellite DNA variation among Asian and North American gypsy moths (Lepidoptera: Lymantriidae) // Annals of the Entomological Society of America 90: 768–775.

15. Clary D.O., Wolstenholme D.R. (1985) The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code // Journal of Molecular Evolution. Vol. 22. № 3. P. 252–271.

16. Garner K., Slavicek J.M. (1996) Identification and characterization of a RAPD-PCR marker for distinguishing Asian and North American gypsy moths // Insect Molecular Biology. Vol. 5. P. 81–91.

17. Goldschmidt R. (1960) The material basis of evolution. Pageant books, Inc., 436 p.

18. Goldschmidt R. (1940) The material basis of evolution. New Haven CT: Yale Univ. Press, 436 p.

19. Harrison R.G., O'Dell T.M. (1989) Mitochondrial DNA as a tracer of gypsy moth origins // Proceedings, Lymantriidae: A Comparison of Features of New and Old World Tussock Moths. P. 265–273.

20. Harrison R.G., Wintermeyer S.F., O'Dell T.M. (1983) Patterns of genetic variation within and among gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) populations // Ann. Entomol. Soc. Am. 76. P. 652–656.

21. Kaisila J. (1962) Immigration und Expansion der Lepidopteren in Finnland in der Jahren 1869–1960 // Acta Entomologica Fennica. Vol. 18. P. 1–452.

22. Keena M.A., Cote M.-J., Grinberg P.S., Wallner W.E. (2008) World

distribution of female flight and genetic variation in *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) // Environmental Entomology. Vol. 37. P. 636–649.

23. Koshio C., Tomishima M., Shimizu K., Kim H.-S., Takenaka O. (2002) Microsatellites in the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) // Applied Entomology and Zoology. Vol. 37. P. 309–312.

24. Morgan T.H. (1907) Experimental Zoology. London. 454 p.

25. Petitpierre E. (1996) Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera // International Journal of Insect Morphology & Embryology. Vol. 25. P. 115–133.

26. Pogue M.G., Schaefer P.W. (2007) A review of selected species of *Lymantria* Hübner [1819] including three new species (Lepidoptera: Noctuidae: Lymantriinae) from subtropical and temperate regions of Asia, some potentially invasive to North America. FHTET, 221 p.

27. Reineke A., Zebitz C.W. (1999) Suitability of polymerase chain reaction-based approaches for identification of different gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) genotypes in central Europe // Annals of the Entomological Society of America. Vol. 92. P. 737–741.

28. Reinig W.F. Die genetisch-chorologischen Grundlagen der gerichteten geographischen Variabilität // Deutsche Ges. F. Vererb. P. 260–308.

29. Schintlmeister A. (2004) The Taxonomy of the genus *Lymantria* Hübner [1819] (Lepidoptera: Lymantriidae) // Quadriana. V. 7. P. 1–248.

30. Waard de J.R., Mitchell A., Keena M.A., Gopurenko D., Boykin L.M., Armstrong K.F., Pogue M.G., Lima J., Floyd R., Hanner R.H., Humble L.M. (2010) Towards a global barcode library for *Lymantria* (Lepidoptera: Lymantriinae) tussock moths of biosecurity concern // PLoS ONE. Vol. 5. № 12. P. 1–10.

31. Zhu Y.J., Zhou G.L., Fang R., Ye J., Yi J.P. (2010) The complete sequence determination and analysis of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) mitochondrial genome // Plant Quarantine. Vol. 4. P. 6–11.

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, <http://www.vniikr.ru>